



**UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE  
BARCELONA**

**DEPARTAMENT D'ENGINYERIA QUÍMICA  
ESCOLA D'ENGINYERIA**

**Avances en el desarrollo de  
bioprocesos: adición aldólica  
catalizada por ramnulosa-1-  
fosfato aldolasa recombinante**

---

**Memoria para optar al grado de doctor por  
la Universitat Autònoma de Barcelona**

**Inés Ardao Palacios  
Noviembre, 2009**

**Título:** Avances en el desarrollo de bioprocesos: adición aldólica catalizada por ramnulosa-1-fosfato recombinante

**Realizado por:** Inés Ardao Palacios

**Dirigido por:** M. Dolors Benaiges Massa  
Gregorio Álvaro Campos

Programa de Doctorado en Biotecnología

Departament d'Enginyeria Química

Escola d'Enginyeria

Universitat Autònoma de Barcelona

MARIA DOLORS BENAIGES MASSA, como profesora titular del Departament d'Enginyeria Química de la Universitat Autònoma de Barcelona y GREGORIO ÁLVARO CAMPOS como profesor agregado del Departament d'Enginyeria Química de la Universitat Autònoma de Barcelona.

**CERTIFICAMOS:**

Que Inés Ardao Palacios ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo que con el título **"Avances en el desarrollo de bioprocesos: adición aldólica catalizada por ramnulosa-1-fosfato aldolasa recombinante"** presenta en esta memoria y que constituye su Tesis para optar al grado de Doctor por la Universitat Autònoma de Barcelona.

Y para que conste a los efectos oportunos, presentamos en la Escola d'Enginyeria de la Universitat Autònoma de Barcelona la mencionada Tesis, firmando el presente certificado en

Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), 19 de Octubre de 2009

Dra. Maria Dolors Benaiges Massa

Dr. Gregorio Álvaro Campos



*A Carlos y a mis padres*



# AGRADECIMIENTOS

Como todo en esta vida llega, aunque muchas veces parezca imposible, ha llegado el momento de agradecer a todas las personas que han contribuido a que esta Tesis esté, al fin, lista para la defensa.

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores, Dolors Benaiges y Gregorio Álvaro, por su asesoramiento y disponibilidad, por su calidad humana y su apoyo y por el sprint final de las últimas semanas. Quería agradecer asimismo a Josep López Santín y a Gloria Caminal, Gloria González y Carles de Mas por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación, por las discusiones científicas y por el apoyo recibido durante estos años.

A Trinitat por toda su ayuda en los comienzos y en gran parte de la Tesis; a Carmen, por traer aires de la tierra al laboratorio y por su apoyo y amistad; a Jordi, por su ayuda con el modelo cinético y por estar dispuesto siempre a echar una mano. Al resto de “aldolaseros”: Jaume, Luis, Cristina, Max, Milja, Alfred y JuanMi, por las largas horas de laboratorio compartidas.

Quiero agradecer a David C. Stuckey la oportunidad de realizar la estancia en sus laboratorios en el Imperial College. A Dalija y a Iohanis por su ayuda y amabilidad durante los meses que estuve allí.

Agradezco también a Víctor Puntos por la colaboración con su grupo del Institut Català de Nanotecnologia. A Joan, por ayudarme a entender las peculiaridades del mundo nano y por todo el trabajo realizado.

Agradezco la financiación recibida del Fondo Social Europeo, del Plan Nacional Español de I+D+i y de la Generalitat de Catalunya.

A mis compañeros de despacho y agregados: Jero, Carlos, Núria, Edu, Josiño, Laura, Torà y Marcel, por las risas y los buenos momentos y por hacer más llevaderas las largas horas frente al ordenador.

A todos los que han compartido conmigo una sonrisa por el pasillo, un café o una charla en el laboratorio, por contribuir a crear un buen ambiente de trabajo. A quienes no menciono explícitamente pero también han contribuido a que este momento haya llegado.

A mis padres, por vuestro apoyo, cariño y comprensión, por tantos sacrificios durante estos años, por ayudarme en todo lo que habéis podido y más. A Raquel, que a pesar de la distancia tu apoyo siempre está conmigo. A mi abuelo, por sus siempre sabios consejos, aunque la piedra filosofal tendrá que esperar un poco más. Al resto de la familia, por vuestro cariño. A los amigos que me han dado ánimos para seguir hacia delante.

A Nuria y Goyo, por vuestro cariño y apoyo y por todo lo que habéis hecho por mí, no hay palabras. A Dani y Paula, por ser como sois, por lo mucho que me habeis alegrado en malos días; por las mejores fiestas de cumpleaños que nunca he tenido y por la mejor compinche que existe.

Y a Carlos, ¡qué decir! Porque con tu apoyo incondicional, tu cariño y tu alegría me has dado las fuerzas para llegar hasta aquí. Por todo el tiempo por recuperar. Porque esta Tesis también es tuya y ¡ya está aquí!



# RESUMEN

En la actualidad existe un creciente interés en el desarrollo de procesos industriales biocatalíticos eficientes desde el punto de vista económico y medioambiental. Uno de los procesos más prometedores para la industria es la biocatálisis de la formación de enlaces C-C para la producción de compuestos de estereoquímica definida, de aplicación en diversos campos y, en especial, en la industria farmacéutica.

El presente trabajo de Tesis Doctoral es una aportación al desarrollo de un bioproceso catalítico empleando ramnulosa-1-fosfato aldolasa recombinante como biocatalizador para la producción estereoselectiva de un compuesto precursor de inhibidores de glicosidasas de acción terapéutica mediante adición aldólica de dihidroxiacetona fosfato y (S)-Cbz-alaninal.

En primer lugar, se ha procedido a la obtención de un modelo cinético de la reacción catalizada por la enzima soluble en un medio acuoso con dimetilformamida como cosolvente para permitir la disolución simultánea de ambos reactivos. Este modelo cinético incluye la reacción secundaria de degradación enzimática de dihidroxiacetona fosfato que tiene lugar paralelamente a la reacción de síntesis.

En segundo lugar, y con el fin de aumentar la estabilidad de la enzima y mejorar la operación en biorreactor, se estudió la inmovilización de la enzima en dos tipos de soportes: soportes de afinidad metálica y nanopartículas de oro. El primer soporte permite realizar la purificación e inmovilización en un solo paso de la enzima, con el consiguiente ahorro de etapas y aumento del rendimiento global del proceso. El segundo tipo de soporte permite reducir las limitaciones difusionales que aparecen con frecuencia en los soportes porosos convencionales y obtener elevadas

cargas enzimáticas específicas. Los biocatalizadores inmovilizados por ambas técnicas se emplearon en la catálisis de la adición aldólica de interés en un medio acuoso con dimetilformamida como cosolvente, evaluando su estabilidad en el medio.

Por último, se estudiaron otras estrategias de reacción para mejorar la solubilidad simultánea de los reactivos de la reacción. Por un lado se analizó el empleo de novedosos medios de reacción, los líquidos iónicos, como alternativa al empleo de cosolventes orgánicos en la biocatálisis de interés. Por otro lado, se evaluó la aplicación de un biorreactor de membrana empleando un medio bifásico acuoso/orgánico en el mismo sistema biocatalítico.

# TABLA DE CONTENIDOS

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	i
<b>RESUMEN</b> .....	iii
<b>TABLA DE CONTENIDOS</b> .....	v
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	ix
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	xi
<b>CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1. Enzimas en la industria .....	1
1.2. Obtención de biocatalizadores recombinantes .....	9
1.3. Purificación enzimática .....	10
1.4. Inmovilización enzimática .....	13
1.4.1. Tipos de inmovilización .....	14
1.4.2. Limitaciones difusionales en partículas porosas .....	18
1.5. Aldolasas en síntesis estereoselectiva .....	22
1.5.1. Clasificación de las aldolasas.....	22
1.5.2. Aldolasas dependientes de dihidroxiacetona fosfato .....	24
1.5.3. Ramnulosa-1-fosfato aldolasa y fuculosa-1-fosfato aldolasa .....	26
1.6. Reacciones de adición aldólica catalizadas por aldolasas .....	28
1.7. Ingeniería del medio de reacción.....	31
1.8. Cinética enzimática.....	32
1.8.1. Inhibición enzimática.....	35
<b>CAPÍTULO 2. OBJETIVOS</b> .....	39
2.1. Objetivo general.....	39
2.2. Objetivos específicos .....	39
<b>CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	41
3.1. Materiales .....	41
3.2. Síntesis de sustratos enzimáticos.....	42
3.2.1. Síntesis de L-ramnulosa-1-fosfato y L-fuculosa-1-fosfato .....	42
3.2.2. Síntesis de (S)-Cbz-alaninal .....	45
3.3. Obtención de aldolasas recombinantes .....	48
3.3.1. Producción en cultivos de alta densidad.....	48
3.3.2. Purificación mediante cromatografía IMAC .....	51

3.4.	Inmovilización de aldolasas recombinantes.....	52
3.4.1.	Inmovilización en soportes de afinidad a metales .....	54
3.4.2.	Inmovilización en nanopartículas de oro.....	56
3.5.	Estabilidad enzimática de aldolasas recombinantes .....	58
3.5.1.	Estabilidad en medio acuoso con dimetilformamida como cosolvente.....	58
3.5.2.	Estabilidad en medio acuoso con [BMIM][BF <sub>4</sub> ] como cosolvente .....	59
3.6.	Reacciones catalizadas por aldolasas recombinantes .....	60
3.6.1.	Degradación enzimática de dihidroxiacetona fosfato .....	60
3.6.2.	Adición aldólica de dihidroxiacetona fosfato y (S)-Cbz-alaninal .....	61
3.6.3.	Software empleado en la determinación de parámetros cinéticos .....	66
3.7.	Métodos analíticos .....	67
3.7.1.	Determinación de la actividad enzimática de aldolasas.....	67
3.7.2.	Determinación de la concentración de dihidroxiacetona fosfato .....	69
3.7.3.	Determinación de la concentración de proteína .....	70
3.7.4.	Determinación del contenido de metal en aldolasas .....	72
3.7.5.	Análisis mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) .....	72

#### **CAPÍTULO 4. MODELIZACIÓN DE LA ADICIÓN ALDÓLICA ENTRE DIHIDROXIACETONA FOSFATO Y (S)-CBZ-ALANINAL CATALIZADA POR RAMNULOSA-1-FOSFATO ALDOLASA..... 75**

4.1.	Introducción.....	75
4.2.	Estudio cinético de degradación enzimática de DHAP .....	77
4.2.1.	Determinación de los parámetros cinéticos de reacción secundaria .....	79
4.3.	Estudio cinético de la adición aldólica entre DHAP y (S)-Cbz-alaninal .....	85
4.3.1.	Determinación de los parámetros cinéticos de la adición aldólica .....	87
4.4.	Validación del modelo cinético .....	94
4.5.	Conclusiones .....	96

#### **CAPÍTULO 5. BIOCATÁLISIS CON ALDOLASAS RECOMBINANTES INMOVILIZADAS EN SOPORTES DE AFINIDAD A METALES ..... 99**

5.1.	Introducción.....	99
5.2.	Inmovilización de fuculosa-1-fosfato aldolasa recombinante .....	103
5.2.1.	Optimización de las condiciones de inmovilización .....	103
5.2.2.	Estudio de la purificación de FucA recombinante .....	106
5.2.3.	Contenido en metal de FucA purificada .....	108
5.2.4.	Biocatálisis con fuculosa-1-fosfato aldolasa inmovilizada .....	110
5.2.5.	Limitaciones difusionales en derivados inmovilizados de FucA .....	117
5.2.6.	Carga enzimática máxima del soporte Co-IDA con FucA.....	120
5.3.	Inmovilización de ramnulosa-1-fosfato aldolasa recombinante .....	122
5.3.1.	Limitaciones difusionales en derivados inmovilizados de RhuA.....	124
5.3.2.	Estabilidad de derivados inmovilizados de RhuA .....	128
5.3.3.	Adición aldólica catalizada por derivados inmovilizados de RhuA.....	129
5.4.	Conclusiones .....	131

<b>CAPÍTULO 6. BIOCATÁLISIS CON RAMNULOSA -1-FOSFATO ALDOLASA INMOVILIZADA EN NANOPARTÍCULAS DE ORO .....</b>	<b>135</b>
6.1. Introducción .....	135
6.2. Inmovilización de RhuA en nanopartículas de oro .....	139
6.3. Estabilidad del derivado inmovilizado de RhuA .....	146
6.4. Adición aldólica catalizada por RhuA inmovilizada .....	148
6.5. Conclusiones.....	151
<b>CAPÍTULO 7. ESTRATEGIAS DE REACCIÓN EN MEDIOS ALTERNATIVOS.....</b>	<b>153</b>
7.1. Introducción .....	153
7.2. Biocatálisis con RhuA en líquidos iónicos como medio de reacción .....	154
7.2.1. Selección de la composición del medio de reacción .....	156
7.2.2. Estabilidad de RhuA en presencia de [BMIM][BF <sub>4</sub> ].....	159
7.2.3. Solubilidad de (S)-Cbz-alaninal y dihidroxiacetona fosfato.....	163
7.2.4. Adición aldólica entre DHAP y (S)-Cbz-alaninal catalizada por RhuA.....	164
7.3. Biocatálisis con RhuA en reactor de membrana .....	166
7.3.1. Selección del sistema bifásico .....	169
7.3.2. Adición aldólica en MBB con medio bifásico acetato de etilo:H <sub>2</sub> O.....	172
7.4. Conclusiones.....	175
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>177</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>183</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>195</b>
A.1. Calibrados de los métodos analíticos.....	195



# ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Enzimas de uso industrial. ....	5
Tabla 1.2. Ecuaciones cinéticas de los distintos tipos de inhibición en una reacción enzimática con un sustrato. ....	37
Tabla 3.1. Concentración inicial de dihidroxiacetona fosfato (A0) y (S)-Cbz-alaninal (B0) y actividad enzimática ofrecida (E0) en los experimentos empleados en la determinación de los parámetros cinéticos de la adición aldólica catalizada por ramnulosa-1-fosfato aldolasa a 4°C en medio medio 50 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 20% v/v DMF, pH 7,0. ....	62
Tabla 3.2. Reactivos añadidos inicialmente en la determinación de la concentración de dihidroxiacetona fosfato (DHAP). ....	70
Tabla 4.1. Estimación inicial de los parámetros KM y ks obtenidos de la linealización de tipo Lineweaver-Burk de los datos experimentales en la degradación de DHAP catalizada por ramnulosa-1-fosfato aldolasa (RhuA) a 4°C en medio 50 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 20% v/v DMF, pH 7,0 y comparación con los obtenidos en la catálisis con fuculosa-1-fosfato aldolasa (FucA) en las mismas condiciones. ....	82
Tabla 4.2. Determinación de los parámetros KM, ks y kiC obtenidos del ajuste a los datos experimentales de la degradación de DHAP catalizada por ramnulosa-1-fosfato aldolasa (RhuA) a 4°C en medio 50 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 20% v/v DMF, pH 7,0 y comparación con los valores obtenidos con fuculosa-1-fosfato aldolasa (FucA) en las mismas condiciones. ....	83
Tabla 4.3. Definición de los parámetros del modelo cinético de la adición aldólica entre dihidroxiacetona fosfato (A) y (S)-Cbz-alaninal (B) catalizada por fuculosa-1-fosfato aldolasa (extraído de Suau y col. 2008). ....	86
Tabla 4.4. Determinación de los parámetros del modelo de adición aldólica entre DHAP y (S)-Cbz-alaninal catalizada por ramnulosa-1-fosfato aldolasa a 4°C en medio 50 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 20% v/v DMF, pH 7,0 y comparación con los valores obtenidos con fuculosa-1-fosfato aldolasa en las mismas condiciones. ....	91
Tabla 4.5. Efecto de la relación de concentraciones iniciales de reactivos (B0/A0) sobre el rendimiento y selectividad de la adición aldólica entre dihidroxiacetona fosfato (A) y (S)-Cbz-alaninal (B) catalizada por ramnulosa-1-fosfato aldolasa a 4°C en medio 50 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 20% v/v DMF, pH 7,0. ....	96
Tabla 5.1. Parámetros del estudio de soportes de afinidad a metales en la inmovilización de fuculosa-1-fosfato aldolasa purificada. ....	103
Tabla 5.2. Rendimiento de inmovilización y actividad retenida en la inmovilización de FucA purificada en soportes de afinidad a metales Ni-IDA y Ni-NTA a 4°C y 24°C. ....	104
Tabla 5.3. Rendimiento de inmovilización y actividad retenida de la inmovilización de FucA purificada en soporte de GE Healthcare (IDA) cargado con cobalto y níquel a 4°C. ....	107
Tabla 5.4. Resumen del rendimiento de los diferentes pasos de la purificación de un lisado celular de FucA mediante IMAC en columna cargada con Ni+2 (24700 UA y 7410 mg de proteína) y Co+2 (8760 UA y 4870 mg de proteína). ....	108

Tabla 5.5. Contenido en metal de fuculosa-1-fosfato aldolasa tras purificaciones en columna de afinidad cargada con níquel o cobalto y porcentaje respecto del contenido teórico de zinc de la enzima nativa (42,1 $\mu\text{mol Zn}^{+2}/\text{g}$ de proteína).....	109
Tabla 5.6. Rendimiento de inmovilización y actividad retenida de la inmovilización de FucA proveniente de un lisado celular en soporte de GE Healthcare (IDA) cargado con cobalto y níquel a 4°C.....	112
Tabla 5.7. Velocidad inicial de reacción, rendimiento y selectividad en la adición aldólica entre dihidroxiacetona fosfato y (S)-Cbz-alaninal a 25°C catalizada por fuculosa-1-fosfato aldolasa soluble e inmovilizada en soportes IDA cargados con níquel y cobalto. Condiciones iniciales: 30 mM DHAP, 49 mM (S)-Cbz-alaninal y 3 UA/mL de reacción.....	116
Tabla 5.8. Rendimiento y selectividad en la adición aldólica entre dihidroxiacetona fosfato y (S)-Cbz-alaninal a 4°C catalizada por fuculosa-1-fosfato aldolasa inmovilizada en soportes Co-IDA. Condiciones iniciales: 31 mM DHAP, 47 mM (S)-Cbz-alaninal y 3 UA/mL de reacción.....	117
Tabla 5.9. Rendimiento de inmovilización y actividad retenida de la inmovilización a 4°C de ramnulosa-1-fosfato aldolasa de lisado celular en soporte Co-IDA.....	124
Tabla 5.10. Rendimiento y selectividad en la adición aldólica entre dihidroxiacetona fosfato y (S)-Cbz-alaninal a 4°C catalizada por ramnulosa-1-fosfato aldolasa soluble e inmovilizada en soporte Co-IDA. Condiciones iniciales RhuA soluble: 24,0 mM DHAP, 33,1 mM (S)-Cbz-alaninal, 3 UA/mL de reacción; condiciones iniciales RhuA inmovilizada: 31,0 mM DHAP, 47,3 mM (S)-Cbz-alaninal, 3 UA/mL de reacción.....	131
Tabla 7.1. Porcentaje de disolvente en la membrana tras incubación a 4°C y 20°C durante 24 horas.....	171
Tabla 7.2. Coeficiente de reparto de dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y (S)-Cbz-alaninal a 4°C en medio bifásico acetato de etilo:H <sub>2</sub> O.....	172



# ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Volumen de ventas de enzimas industriales por sectores en 2003 en el mundo, siendo el volumen de ventas global 2,3 billones de dólares. ....	4
Figura 1.2. Esquema general de la obtención y aplicación de catalizadores enzimáticos inmovilizados. ....	10
Figura 1.3. Esquema general del proceso de obtención de enzimas intracelulares producidas mediante cultivos microbianos. ....	12
Figura 1.4. Esquema de las distintas etapas de difusión y reacción que se producen en el interior de una partícula catalítica. ....	18
Figura 1.5. Perfil de temperatura y concentración de reactivos en el interior de una partícula catalítica porosa para una reacción isotérmica y sin limitaciones a la transferencia de materia en la película externa: (a) Sin limitaciones difusionales a la transferencia interna de materia y (b) con fuertes limitaciones difusionales. ....	19
Figura 1.6. Variación del factor de eficacia en función del número de Thiele para cinéticas de distinto orden de reacción. ....	21
Figura 1.7. Esquema general de una reacción de adición aldólica. ....	22
Figura 1.8. Clasificación de aldolasas según su mecanismo catalítico. ....	23
Figura 1.9. Estereoquímica de las reacciones catalizadas por aldolasas dependientes de dihidroxiacetona fosfato (DHAP). ....	25
Figura 1.10. Estructura tridimensional de dos aldolasas dependientes de DHAP de E. coli: (a) fuculosa-1-fosfato aldolasa y (b) ramnulosa-1-fosfato aldolasa. ....	28
Figura 1.11. Síntesis enzimática de N-Cbz-aminopolioles lineales y posterior síntesis del correspondiente iminociclitol. ....	29
Figura 1.12. Reacción de adición aldólica entre (S)-Cbz-alaninal y dihidroxiacetona fosfato (DHAP) catalizada por fuculosa-1-fosfato aldolasa (FucA). ....	29
Figura 1.13. Reacción de adición aldólica entre (S)-Cbz-alaninal y dihidroxiacetona fosfato (DHAP) catalizada por ramnulosa-1-fosfato aldolasa (RhuA). ....	29
Figura 1.14. Mecanismo de isomerización y descomposición de dihidroxiacetona fosfato (DHAP). ....	30
Figura 1.15. Reacción de degradación enzimática de dihidroxiacetona fosfato (DHAP) catalizada por aldolasas de tipo II. ....	30
Figura 1.16. Esquema general de una reacción enzimática con un sustrato. ....	33
Figura 1.17. Esquema general de inhibición competitiva en una reacción enzimática con un sustrato. ....	36
Figura 1.18. Esquema general de inhibición no competitiva en una reacción enzimática con un sustrato. ....	36
Figura 1.19. Esquema general de inhibición anticompétitiva en una reacción enzimática con un sustrato. ....	37
Figura 3.1. Síntesis enzimática de L-ramnulosa-1-fosfato y de L-fuculosa-1-fosfato a partir de dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y L-lactaldehído catalizada por ramnulosa-1-fosfato aldolasa (RhuA) y fuculosa-1-fosfato aldolasa (FucA). ....	42
Figura 3.2. Síntesis de L-lactaldehído a partir de D-treonina y ninhidrina. ....	44
Figura 3.3. Reacción secundaria de la síntesis de L-lactaldehído. ....	44

Figura 3.4. Síntesis de (S)-Cbz-alaninal a partir de la oxidación de (S)-Cbz-alaninol con ácido o-iodoxibenzoico (IBX) en dimetilsulfóxido anhidro (DMSO). .....	45
Figura 3.5. Reacción de protección del grupo amino de (S)-alaninol con el grupo Cbz.....	47
Figura 3.6. Síntesis del oxidante IBX (ácido o-iodoxibenzoico) .....	48
Figura 3.7. Sistema de expresión de fuculosa-1-fosfato aldolasa en la cepa E. coli XL1 Blue MRF'/pTrcfuc: (a) plásmido comercial pTrcHis y (b) plásmido pTrcfuc. ....	50
Figura 3.8. Sistema de expresión de ramnulosa-1-fosfato aldolasa en la cepa E. coli M15ΔglyA/pQEαβrham: (a) plásmido comercial pQE-40; (b) plásmido pQEαβrham y (c) plásmido comercial pREP-4.....	50
Figura 3.9. Transcurso de la inmovilización enzimática y cálculo del rendimiento de inmovilización y la actividad retenida. ....	54
Figura 3.10. Ensayo enzimático para la cuantificación de ramnulosa-1-fosfato aldolasa (RhuA).....	68
Figura 3.11. Ensayo enzimático para la cuantificación de fuculosa-1-fosfato aldolasa (FucA). ....	68
Figura 3.12. Ensayo enzimático para la cuantificación de dihidroxiacetona fosfato (DHAP).....	69
Figura 3.13. Esquema de la reacción entre Coomassie® y la proteína en la cuantificación de la concentración de proteína mediante el método Bradford.....	71
Figura 4.1. Adición aldólica entre dihidroxiacetona fosfato y (S)-Cbz-alaninal catalizada por ramnulosa-1-fosfato aldolasa .....	77
Figura 4.2. Degradación enzimática de dihidroxiacetona fosfato catalizada por ramnulosa-1-fosfato aldolasa .....	77
Figura 4.3. Esquema de la degradación enzimática de dihidroxiacetona fosfato (A) catalizada por ramnulosa-1-fosfato aldolasa (E) para dar lugar a metilglioxal (C) y fosfato (D) .....	78
Figura 4.4. Estimación del valor de KM y ks de la degradación enzimática de dihidroxiacetona fosfato catalizada por ramnulosa-1-fosfato aldolasa a 4°C en medio 50 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 20% v/v DMF, pH 7,0. ....	81
Figura 4.5. Modelización de la degradación enzimática de dihidroxiacetona fosfato catalizada por ramnulosa-1-fosfato aldolasa a 4°C y medio 50 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 20% v/v DMF, pH 7,0 a una concentración inicial: (a) 12,5; (b) 38,2; (c) 40,5; (d) 62,7; (e) 63,7; (f) 65,1; (g) 128,6 y (g) 133,2 mM. (·): datos experimentales; (-): modelo. ....	84
Figura 4.6. Esquema de las reacciones involucradas en la adición aldólica entre dihidroxiacetona fosfato (A) y (S)-Cbz-alaninal (B) catalizada por ramnulosa-1-fosfato aldolasa (E) para dar lugar al producto de adición (P). Presenta una reacción secundaria en la que el complejo formado por la dihidroxiacetona fosfato y enzima (EA) da lugar a metilglioxal (C) y fosfato (D) .....	85
Figura 4.7. Concentración inicial de dihidroxiacetona fosfato (A0) y (S)-Cbz-alaninal (B0) en los experimentos empleados en la determinación de los parámetros cinéticos de la adición aldólica catalizada por ramnulosa-1-fosfato aldolasa a 4°C en medio medio 50 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 20% v/v DMF, pH 7,0. (a) A0 42,3 mM, B0 47,0 mM; (b) A0 13,2 mM, B0 27,2 mM; (c) A0 12,8 mM, B0 35,4 mM; (d) A0 13,3 mM, B0 45,9 mM; (e) A0 21,9 mM, B0 14,4 mM; (f) A0 30,8 mM, B0 33,0 mM y (g) A0 35,0 mM, B0 39,7 mM.....	87
Figura 4.8. Modelización de la adición aldólica entre DHAP (A) y (S)-Cbz-alaninal (B) catalizada por ramnulosa-1-fosfato aldolasa a 4°C en medio 50 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 20% v/v DMF, pH 7,0: (a) A0 42,3 mM, B0 47,0 mM; (b) A0 13,2 mM, B0 27,2 mM; (c) A0 12,8 mM, B0 35,4 mM; (d) A0 13,3 mM, B0 45,9 mM; (e) A0 21,9 mM, B0 14,4 mM; (f) A0 30,8 mM, B0 33,0 mM y (g) A0 35,0 mM, B0 39,7 mM. (·): datos experimentales; (-): modelo. ....	93
Figura 4.9. Concentración inicial de DHAP (A0) y (S)-Cbz-alaninal (B0) de los experimentos empleados en la modelización y validación del modelo cinético de la adición aldólica entre DHAP y (S)-Cbz-alaninal catalizada por ramnulosa-1-fosfato aldolasa a 4°C en medio 50 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 20% v/v DMF, pH 7,0. (a) A0 42,3 mM, B0 47,0 mM; (b) A0	

13,2 mM, B0 27,2 mM; (c) A0 12,8 mM, B0 35,4 mM; (d) A0 13,3 mM, B0 45,9 mM; (e) A0 21,9 mM, B0 14,4 mM; (f) A0 30,8 mM, B0 33,0 mM; (g) A0 35,0 mM, B0 39,7 mM y (validación) A0 24,0 mM, B0 33,1 mM.....	94
Figura 4.10. Validación del modelo de adición aldólica entre dihidroxiacetona fosfato y (S)-Cbz-alaninal catalizada por ramnulosa-1-fosfato aldolasa a 4°C en medio 50 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 20% v/v DMF, pH 7,0.....	95
Figura 5.1. Similitud entre la estructura química del aminoácido histidina y del compuesto imidazol.....	100
Figura 5.2. Esquema de la estructura química del soporte de afinidad Ni-IDA. ....	101
Figura 5.3. Esquema de la estructura química del soporte de afinidad Ni-NTA. ....	101
Figura 5.4. Rendimiento de inmovilización y actividad retenida en la inmovilización a 4°C de FucA purificada en soportes de afinidad a metales IDA de alta (20-35 $\mu\text{mol Me}^{+2}/\text{mL}$ de soporte) y baja densidad (5-20 $\mu\text{mol Me}^{+2}/\text{mL}$ de soporte) cargados con Ni <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> y Co <sup>2+</sup> . ....	106
Figura 5.5. Esquema de los fenómenos de inactivación enzimática: equilibrio reversible entre la estructura nativa (N) y estructura parcialmente desplegada (D) e inactivación irreversible debido a fenómenos de agregación, proteólisis, modificación de residuos de aminoácidos, eliminación de coenzimas, pérdida de monómeros en proteínas oligoméricas o plegamientos incorrectos de la proteína. ....	113
Figura 5.6. Estabilidad de FucA soluble e inmovilizada en Ni-IDA y Co-IDA en el medio de reacción de la adición aldólica de interés (50 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 20% v/v DMF, pH 7,0): (a) incubación a 4°C y (b) incubación a 24°C.....	114
Figura 5.7. Efecto de la carga enzimática de fuculosa-1-fosfato aldolasa sobre la actividad retenida en el biocatalizador inmovilizado.....	119
Figura 5.8. Limitaciones difusionales de los derivados inmovilizados de ramnulosa-1-fosfato aldolasa inmovilizada en soportes de afinidad a metales Co-IDA.....	126
Figura 5.9. Limitaciones difusionales en la adición aldólica entre dihidroxiacetona fosfato y (S)-Cbz-alaninal a 4°C de los derivados inmovilizados de ramnulosa-1-fosfato aldolasa inmovilizada en soportes de afinidad a metales Co-IDA.....	127
Figura 5.10. Estabilidad de ramnulosa-1-fosfato aldolasa soluble e inmovilizada en Co-IDA a 4°C en el medio de reacción de la adición aldólica (50 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 20% v/v DMF, pH 7,0).....	129
Figura 5.11. Adición aldólica entre dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y (S)-Cbz-alaninal catalizada por ramnulosa-1-fosfato aldolasa inmovilizada en Co-IDA (actividad ofrecida 23 UA/mL de soporte) en medio de reacción 50 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 20% v/v DMF, pH 7,0.....	130
Figura 6.1. Evolución del número de publicaciones que contienen el concepto Bionanotecnología y Nanobiotecnología entre los años 2000 y 2007.....	136
Figura 6.2. Esquema de empaquetamiento hexagonal y su celda unitaria.....	140
Figura 6.3. Efecto de la carga de enzima ofrecida en la inmovilización de ramnulosa-1-fosfato aldolasa en nanopartículas de oro sobre la longitud de onda del pico en el espectro UV-Visible y su absorbancia máxima y el tamaño de las partículas obtenido mediante dispersión dinámica de luz (DLS). ....	142
Figura 6.4. Inmovilización a 4°C de ramnulosa-1-fosfato aldolasa en nanopartículas de oro.....	145
Figura 6.5. Imágenes de nanopartículas de oro recubiertas por una monocapa de ramnulosa-1-fosfato aldolasa recombinante obtenidas mediante microscopía de transmisión de electrones (TEM) con tinción negativa. ....	145

Figura 6.6. Estabilidad a 4°C del derivado inmovilizado de ramnulosa-1-fosfato aldolasa en nanopartículas de oro en medio de reacción 50 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 20% v/v DMF, pH 7,0.....	148
Figura 6.7. Adición aldólica entre dihidroxiacetona fosfato y (S)-Cbz-alaninal a 4°C catalizada por ramnulosa-1-fosfato aldolasa inmovilizada en nanopartículas de oro. Primer ciclo del biocatalizador. ....	150
Figura 6.8. Adición aldólica entre dihidroxiacetona fosfato y (S)-Cbz-alaninal a 4°C catalizada por ramnulosa-1-fosfato aldolasa inmovilizada en nanopartículas de oro. Segundo ciclo del biocatalizador. ....	151
Figura 7.1. Estructura del líquido iónico 1-butil-3-metil-imidazolio tetrafluoroborato ([BMIM][BF <sub>4</sub> ]). ....	156
Figura 7.2. Diagrama de fases de mezclas [BMIM][BF <sub>4</sub> ]:H <sub>2</sub> O.....	158
Figura 7.3. Regla de la palanca para un sistema bifásico genérico.....	159
Figura 7.4. Estabilidad de ramnulosa-1-fosfato aldolasa a 4°C en mezclas de [BMIM][BF <sub>4</sub> ] en tampón fosfato (80 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,4). ....	161
Figura 7.5. Estabilidad de ramnulosa-1-fosfato aldolasa a 4°C en [BMIM][BF <sub>4</sub> ] al 85% v/v en tampón fosfato (80 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,4). ....	162
Figura 7.6. Degradación enzimática de DHAP catalizada por ramnulosa-1-fosfato aldolasa a 4°C en medio 80 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 150 mM NaCl, 15% v/v [BMIM][BF <sub>4</sub> ], pH 7,4 y en medio 50 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 20% v/v DMF, pH 7,0.....	165
Figura 7.7. Adición aldólica entre dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y (S)-Cbz-alaninal catalizada por ramnulosa-1-fosfato aldolasa a 4°C en medio 80 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 150 mM NaCl, 15% v/v [BMIM][BF <sub>4</sub> ], pH 7,4 y en medio 50 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 20% v/v DMF, pH 7,0. ....	166
Figura 7.8. Configuración del biorreactor de membrana para biotransformaciones (MBB) en semicontinuo. ....	168
Figura 7.9. Evolución de la concentración de producto en la fase orgánica (Porg) y en la fase acuosa (Pac) en la adición aldólica entre DHAP y (S)-Cbz-alaninal a 4°C catalizada por ramnulosa-1-fosfato aldolasa inmovilizada en Co-IDA en reactor de membrana con medio bifásico acetato de etilo:H <sub>2</sub> O. ....	174
Figura 7.10. Evolución de la concentración de dihidroxiacetona fosfato en la fase acuosa (Aac) en la adición aldólica entre DHAP y (S)-Cbz-alaninal a 4°C catalizada por ramnulosa-1-fosfato aldolasa inmovilizada en Co-IDA en reactor de membrana con medio bifásico acetato de etilo:H <sub>2</sub> O. ....	175
Figura A.1. Calibrado para la determinación de la concentración de dihidroxiacetona fosfato (DHAP) a partir de la variación de absorbancia observada a 340 nm.....	195
Figura A.2. Calibrado para la determinación de la concentración de (S)-Cbz-alaninal y producto de adición a partir del área de pico obtenido mediante HPLC: (a) medio 50 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 20% v/v DMF, pH 7,0 y (b) acetato de etilo.....	195
Figura A.3. Ejemplos de calibrados a partir de patrones de albúmina de sérum bobino (BSA) en la determinación de la concentración de proteína total mediante el método de Bradford: (a) rango 100-1500 µg/mL y (b) rango 1-25 µg/mL.....	196
Figura A.4. Ejemplos de calibrados a partir de patrones de ramnulosa-1-fosfato aldolasa (RhuA) en la determinación de la concentración de proteína total a partir de la medida de la absorbancia a 595 nm (Abs <sub>595nm</sub> ) menos la absorbancia del blanco a 595 nm (Abs <sub>0595nm</sub> ) mediante el método de Bradford: (a) rango 100-1000 µg/mL y (b) rango 1-25 µg/mL. ....	196

# Capítulo 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Enzimas en la industria

Las enzimas son proteínas que se encuentran en las células de los organismos vivos y cuya función es catalizar las reacciones que tienen lugar en el metabolismo celular. Por esto también reciben el nombre de biocatalizadores. Como cualquier otro catalizador químico, son capaces de aumentar la velocidad de reacción en un factor de  $10^5$ - $10^{12}$  respecto de la reacción sin catalizar, son eficaces en una concentración muy baja y no resultan alteradas tras la catálisis. Dado que su medio natural es el interior de los organismos, las enzimas catalizan habitualmente reacciones en medios acuosos, a presión atmosférica y en condiciones suaves de temperatura (20-40°C) y pH (5-8). Por otro lado, presentan con frecuencia una elevada selectividad respecto de la reacción que catalizan, una gran especificidad por el sustrato de la reacción y un alto grado de regio- y/o estereoselectividad. Estas características les permiten catalizar una reacción concreta para obtener un producto determinado dentro del gran número de reacciones que tienen lugar en el metabolismo celular y que involucran un número muy elevado de sustratos diferentes (Mathews y Van Holde, 1990).

El gran potencial de las enzimas en procesos industriales radica principalmente en que son eficaces catalizadores de reacciones que resultan excesivamente costosas en cuanto a consumo de recursos, energía o que generan un elevado impacto ambiental si se realizan mediante procesos químicos convencionales (Beilen y Li, 2002). La elevada especificidad y selectividad que presentan permite, en

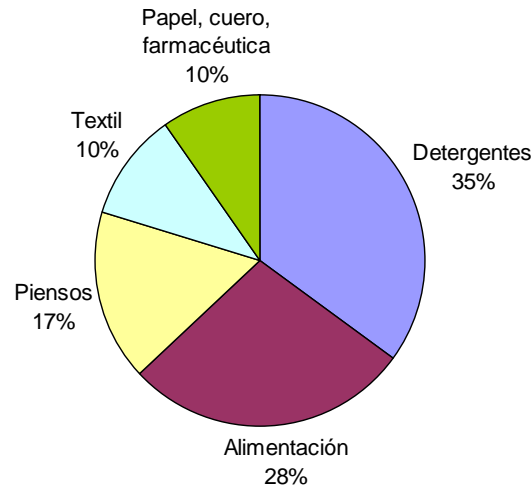
muchos casos, reducir el número de etapas del proceso y el número de reacciones secundarias, lo que facilita la purificación del producto. Estas ventajas, junto con la posibilidad de operar en medios acuosos y condiciones suaves de presión, temperatura y pH, contribuyen al ahorro en agua, energía y materias primas y a la reducción de los costes de operación y de tratamiento de residuos (Schmid y col., 2002; Buchholz y Seibel, 2008). En los últimos años se están llevando a cabo en Europa diversas iniciativas para potenciar el desarrollo de procesos industriales sostenibles a través de la incorporación de la biocatálisis en sus procesos (Lorenz y Eck, 2005). Por un lado, el Séptimo Programa Marco de Investigación y Desarrollo Tecnológico de la Unión Europea ha considerado a la biotecnología como una valiosa herramienta en la producción sostenible de compuestos químicos, energéticos, ambientales y de alto valor añadido (<http://cordis.europa.eu/fp7>). Por otro lado, la Comisión Europea y EuropaBio han creado la Plataforma Tecnológica Europea de Química Sostenible para dar un empuje a la industria química en Europa contribuyendo al desarrollo de tecnologías sostenibles ([www.suschem.org](http://www.suschem.org)). Dentro de esta Plataforma, la biotecnología aplicada a procesos industriales representa uno de sus tres pilares básicos junto con la tecnología de materiales y la ingeniería de procesos. El empleo de enzimas como un componente importante del desarrollo industrial sostenible también ha sido reconocido en un estudio de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OECD) realizado en 2001, según el cual el empleo de bioprocesos enzimáticos contribuyó a la reducción de energía, materias primas y costes de operación entre un 9-90% en los quince procesos estudiados (Beilen y Li, 2002).

El auge del empleo de enzimas y microorganismos en procesos industriales ha llevado al desarrollo de un nuevo campo dentro de la biotecnología moderna denominado biotecnología industrial o biotecnología blanca (*industrial or white biotechnology*). Este término fue acuñado en 2003 por la Asociación Europea de

Bioindustrias (EuropaBio) ([www.europabio.org](http://www.europabio.org)) y se basa en la aplicación de enzimas libres o microorganismos en la producción de bienes y servicios en bioprocesos a gran escala, competitivos y sostenibles (Beilen y Li, 2002; Lorenz y Eck, 2005). Sin embargo, las enzimas se han empleado desde la antigüedad en la elaboración de alimentos como quesos, yogures, cerveza, vino y vinagre así como en el curtido de cueros y en la fabricación de tejidos como el lino (Kirk y col., 2002). Tras la Revolución Industrial en el siglo XIX y el nacimiento de las Ciencias Aplicadas, se descubrió el elevado potencial de las enzimas como biocatalizadores pero también quedó patente la necesidad de alcanzar un conocimiento detallado de su comportamiento a lo largo de la reacción que catalizan (Wohlgemuth, 2009). Desde entonces, se han realizado enormes progresos en el conocimiento de las enzimas y en el desarrollo de procesos industriales que explotan las ventajas que ofrecen respecto otros procesos alternativos.

La producción mundial de enzimas para su empleo en aplicaciones industriales en 1998 movió en torno a 1,5 billones de dólares (Beilen y Li, 2002), aumentando hasta los 2,3 billones de dólares en 2003 (Lorenz y Eck, 2005) y se prevé que continúe su crecimiento en los próximos años ([www.freedoniagroup.com](http://www.freedoniagroup.com)) (figura 1.1). El sector que genera un mayor volumen de negocio es la industria de detergentes, que incorpora proteasas y lipasas en sus productos para mejorar su eficacia en la eliminación de manchas. A continuación se encuentra la industria alimentaria, de bebidas y panadera que emplean lipasas, proteasas, amilasas y pectinasas en el desarrollo de aromas y mejora de la textura de los alimentos. Diversas amilasas e isomerasas, principalmente glucosa isomerasa, se emplean en la industria del almidón para la producción de azúcares. En el campo de la alimentación animal, fitasas y xilanasas se utilizan en piensos para mejorar la digestibilidad y la absorción de fósforo. Otras industrias, como la textil, curtidos y papelera emplean celulasas,

amilasas y proteasas para degradar las fibras y mejorar el acabado superficial del producto (tabla 1.1).



**Figura 1.1.** Volumen de ventas de enzimas industriales por sectores en 2003 en el mundo, siendo el volumen de ventas global 2,3 billones de dólares (extraído de Lorenz y Eck, 2005).

El consumo de enzimas en estos campos industriales ha experimentado un elevado ritmo de crecimiento durante los últimos años, alcanzando en la actualidad la madurez de mercado, por lo que se estiman unas tasas de crecimiento moderadas en los próximos años en estos sectores (*www.freedoniagroup.com*). Sin embargo, se prevé un gran auge del empleo de enzimas en otros campos industriales potenciado principalmente por la creciente presión por parte de las autoridades y consumidores para reducir el impacto medioambiental y el consumo de recursos. Por un lado, la necesidad de encontrar fuentes de energía renovables que permitan sustituir a los combustibles fósiles ha llevado al desarrollo de tecnologías que emplean enzimas (celulasas, amilasas y lipasas) para la producción de biocombustibles (bioetanol y biodiésel) y también para la obtención de productos de alto valor añadido empleando biomasa como materia prima. Por otro lado, se prevé un gran crecimiento en la industria farmacéutica y de química fina debido al endurecimiento de la legislación en aspectos medioambientales para reducir la elevada cantidad de residuos que estas



industrias generan. Por último, se está implantando el uso de enzimas en nuevos campos como en la fabricación de polímeros, en el tratamiento de aguas residuales, en el desarrollo de conservantes, colorantes y aromas alimentarios y en el de la higiene personal, en el que se emplean las propiedades antimicrobianas de las peroxidasas en la elaboración de pastas dentífricas (tabla 1.1) (Beilen y Li, 2002; Kirk y col., 2002; Aehle, 2004).

**Tabla 1.1.** Enzimas de uso industrial (adaptación de Aehle, 2004, Kirk, 2002).

<i>Tipo de enzima</i>	<i>Uso industrial</i>
Oxidoreductasas	
Glucosa oxidasa	Industria panadera, cervecera, textil y cosmética
Lacasas	
Peroxidasas	
Transferasas	
Transglutaminasa	Industria alimentaria, cervecera y biocombustibles
Dextranucrasa	
Ciclodextrin-glicosil transferasas	
Hidrolasas	
$\alpha$ - y $\beta$ -amilasas	Industria alimentaria, panadera, cervecera, detergentes, bebidas, textil, papelera, alimentación animal, cuero, biocombustibles y síntesis orgánica
Endopeptidasas	
Proteasas	
Lipasas y fosfolipasas	
Fitasas	
Celulasas	
Acilasas	
Liasas	
$\alpha$ -acetolactato descarboxilasa	Industria alimentaria, cervecera y textil
Pectato liasa	
Pectina liasa	
Isomerasas	
Xilosa isomerasa	Industria alimentaria y biocombustibles
Glucosa isomerasa	

La biocatálisis aplicada en síntesis orgánica de compuestos para la industria química y farmacéutica se ha considerado desde hace décadas como una prometedora alternativa a los procesos químicos tradicionales. Esto se debe principalmente a la elevada especificidad por sustrato y a la regio- y estereoselectividad que normalmente presentan los biocatalizadores, lo que permite reducir en gran medida el número de etapas sintéticas y el uso de grupos protectores, pudiéndose llevar a cabo el proceso en condiciones suaves de presión, temperatura y pH (Tao y Xu, 2009). Estas características son particularmente útiles en la producción de compuestos enantioméricamente puros es decir, la producción aislada de uno solo de los posibles isómeros de compuestos químicos empleados como medicamentos (Beilen y Li, 2002). El interés por estos compuestos surgió cuando se descubrió que los enantiómeros de ciertos medicamentos pueden presentar diferentes actividades biológicas a raíz de la comercialización de la talidomida en los años 60, cuyo enantiómero R poseía efectos sedantes mientras que el S provocaba deformaciones importantes en los fetos cuando se administraba a mujeres embarazadas. Debido al incremento de las restricciones legislativas relativas a la seguridad de los medicamentos se prevé un creciente aumento del mercado de estos compuestos en los próximos años (Beilen y Li, 2002).

A pesar del gran potencial que la biocatálisis ofrece en este sector, la incorporación de la catálisis enzimática a sus procesos se ha realizado a un ritmo inferior al esperado (Beilen y Li, 2002). Esto es debido principalmente al excesivo coste en tiempo e inversión que requiere el desarrollo de un proceso de base biotecnológica. Estos dos factores son cruciales debido a la limitada vida de las patentes y la gran inversión en investigación y pruebas clínicas necesaria para la salida al mercado de un nuevo medicamento. No obstante, diversas aplicaciones de la biocatálisis se han implementado en la industria satisfactoriamente llegándose a obtener productividades del orden de toneladas anuales. Este es el caso de la producción de (S)-3,5-bistrifluorometilfenil etanol mediante catálisis con alcohol

deshidrogenasa de *Rhodococcus erythropolis* llevada a cabo por Merck and Co. con una productividad de 10 ton/año. Otras aplicaciones disponibles actualmente a escala comercial son la producción de alcoholes, amidas, ácidos carboxílicos y novedosas penicilinas semisintéticas enantioméricamente puros mediante catálisis con lipasas, nitrilasas y acilasas llevadas a cabo por BASF, Chimotech y Degussa alcanzando una producción de 100-1000 ton/año (Schmid y col., 2002).

En un futuro se prevé un auge de estas tecnologías ya que la presión hacia el desarrollo de procesos sostenibles afecta principalmente a esta industria. Esto es debido a que el nivel de residuos generados por los procesos tradicionales de síntesis orgánica para la industria farmacéutica, normalmente cuantificados por el llamado factor E (relación entre los residuos generados y la cantidad de producto obtenida), es uno de los más elevados dentro de las industrias químicas (Woodley, 2008). Las enzimas pueden contribuir a disminuir este factor debido principalmente a la reducción del número de etapas y del empleo de disolventes orgánicos u otros compuestos tóxicos y, por otro lado, el operar en condiciones suaves de pH también contribuye a la reducción del volumen de residuos a tratar. Es por esto que cada vez se está considerando más la incorporación de procesos biocatalíticos en este tipo de industrias (Lorenz y Eck, 2005; Woodley, 2008; Tao y Xu, 2009).

El empleo de enzimas a nivel industrial está condicionado principalmente a disponer de elevadas cantidades y bajo coste de un biocatalizador que presente la funcionalidad adecuada y con una elevada actividad y estabilidad en las condiciones de operación (Lorenz y Eck, 2005; Woodley, 2008). También se requiere la integración de las etapas de *up-* y *down-stream*, la reducción de los tiempos de desarrollo y tener en cuenta aspectos medioambientales para que un proceso biocatalítico pueda ser económicamente viable (Woodley, 2008; Wohlgemuth, 2009).

Se han realizado numerosos avances en los últimos tiempos para la obtención de enzimas comerciales con la adecuada funcionalidad y a bajo coste. Por un lado, los

avances en el desarrollo de enzimas mediante ingeniería de proteínas y evolución dirigida han permitido obtener biocatalizadores con nuevas funcionalidades, cambios de estereoquímica y la supresión de inhibiciones por producto o sustrato. Mediante estas técnicas también se ha conseguido incrementar la actividad y estabilidad en las condiciones de operación. Todos estos avances han permitido la mejora de biocatalizadores ya existentes y la obtención de nuevos biocatalizadores que pueden ser empleados en campos en los que anteriormente no era factible su aplicación (Kirk y col., 2002; Schmid y col., 2002; Lorenz y Eck, 2005; Wohlgemuth, 2009). Por otro lado, las técnicas de producción de enzimas recombinantes han permitido la obtención de elevadas productividades y, por lo tanto, disponer de enzimas en mayor cantidad y a un menor coste (Kirk y col., 2002).

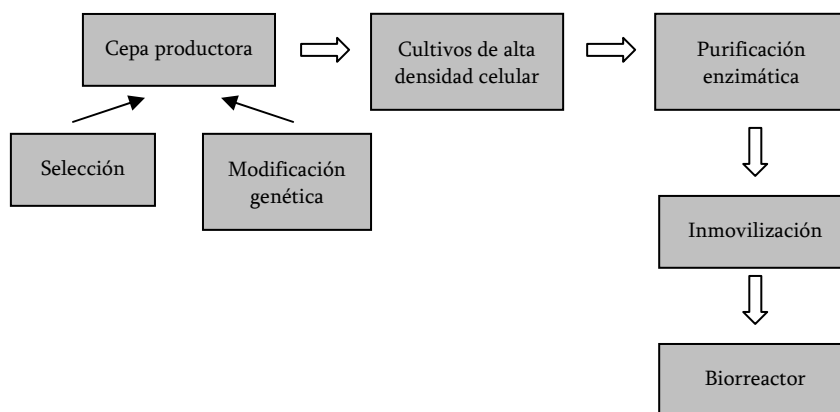
Respecto a la integración de procesos, actualmente se está trabajando en la realización de reacciones en cascada, empleando varias enzimas simultáneamente por separado o formando complejos enzimáticos como pueden ser enzimas de fusión (Torres-Pazmiño y col., 2008) o megasintasas (Bernhardt y O'Connor, 2009). Estas reacciones permiten reducir el número de etapas y también las etapas de purificación de los compuestos intermedios, análogamente a lo que ocurre en las rutas metabólicas (Wohlgemuth, 2009). También se han desarrollado diversas estrategias para realizar la recuperación del producto *in situ* obteniéndose resultados prometedores (Buque-Taboada y col., 2004; Hilker y col., 2006; Woodley y col., 2008). Por último, recientes trabajos se han centrado en el desarrollo de tecnologías para acelerar el tiempo de desarrollo de los bioprocesos (Baganz y col., 2007).

## 1.2. Obtención de biocatalizadores recombinantes

La obtención de biocatalizadores mediante tecnología recombinante ha permitido obtener elevadas productividades en un mismo cultivo y así contribuir a la reducción del precio final de la enzima comercial (Kirk y col., 2002). En un primer lugar, es necesario desarrollar una cepa superproductora que permitan productividades enzimáticas muy superiores a las obtenidas con las cepas salvajes. Esto puede obtenerse mediante selección (*screening*) de los microorganismos productores de la enzima para escoger aquel de mayor productividad enzimática o bien modificando estos microorganismos mediante ingeniería genética (Powell y col., 2001; Burton y col., 2002). La modificación genética de estas cepas se realiza normalmente partiendo de microorganismos de fácil cultivo (células huésped) en los que se introduce un plásmido que contiene el gen que codifica para la enzima que se desea producir y ciertas secuencias de nucleótidos que permiten controlar la expresión de dicha enzima y de este modo poder inducir su sobreexpresión. Las enzimas que se empleen en consumo humano deben haber sido producidas por microorganismos huésped admitidos como GRAS (*generally recognized as secure*), siendo los más empleados *Bacillus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger* y *A. oryzae* y *Lactobacillus* y *Streptococcus* lácticos.

A la hora de emplear un biocatalizador en un proceso industrial, es necesario en muchos casos disponer de la enzima pura para evitar la interferencia con otras enzimas celulares. Se necesitan, por tanto, una serie de procesos de purificación posteriores para recuperar la enzima a partir de la biomasa presente en el caldo de cultivo y deben realizarse a un bajo coste para asegurar la viabilidad económica del proceso ya que, en la mayoría de los casos, los costes de purificación representan el porcentaje mayor dentro de los costes totales de la producción de enzimas (Bonner, 2007). Por otro lado, la estructura de las moléculas de enzima es bastante sensible a

cambios de pH, temperatura y composición del medio de reacción y, con mucha frecuencia, estos cambios estructurales provocan la pérdida de su actividad catalítica. La inmovilización enzimática permite mejorar la estabilidad de las enzimas y hace posible la reutilización de los derivados catalíticos en varios ciclos productivos al facilitar su separación del medio de reacción, lo que implica una reducción de costes importante (Cao, 2005). El proceso de inmovilización debe ser optimizado para obtener biocatalizadores con una elevada actividad enzimática y una gran estabilidad durante la operación en el biorreactor. En la figura 1.2 se presenta el esquema general del proceso global, desde la obtención de enzimas recombinantes hasta su empleo como biocatalizadores inmovilizados.



**Figura 1.2.** Esquema general de la obtención y aplicación de catalizadores enzimáticos inmovilizados.

### 1.3. Purificación enzimática

En la selección del proceso de purificación influye no sólo el tipo de enzima a purificar sino también la fuente de producción y la aplicación a la que esté destinada. Aunque en algunos casos se pueden emplear las células con un mínimo tratamiento posterior (extracto de levadura para la industria de fabricación de pan), normalmente se deben obtener elevados grados de pureza para su empleo como biocatalizador o

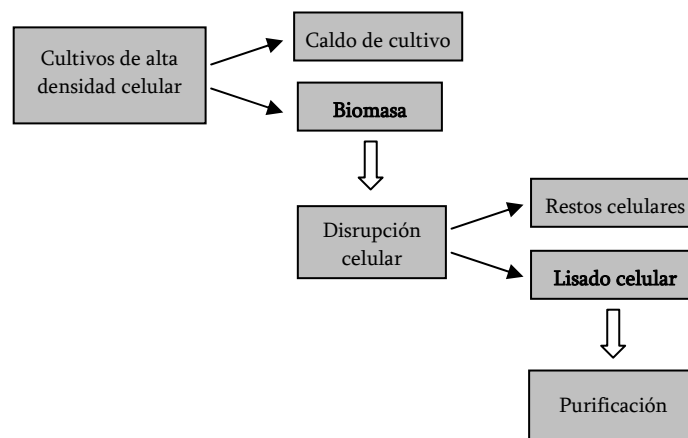
como agente terapéutico. Para la utilización de enzimas en biocatálisis, es necesario separar la enzima del resto de proteínas celulares para evitar la posible interferencia de sus actividades catalíticas en la reacción de interés, produciéndose reacciones secundarias no deseadas. En el caso del empleo de enzimas como agentes terapéuticos, los requisitos de pureza necesarios son mucho más estrictos y están regulados por los organismos competentes de cada país (Bonner, 2007).

En el proceso de purificación de enzimas producidas a partir de cultivos de alta densidad celular de microorganismos y expresadas como proteínas intracelulares (figura 1.3), el primer paso es separar la biomasa, en la que se encuentra la enzima de interés soluble o en forma de partículas insolubles llamadas cuerpos de inclusión, del caldo de cultivo de la fermentación. Esto se suele llevar a cabo por centrifugación, empleada normalmente a nivel de laboratorio, o por filtración tangencial, técnica más empleada en usos industriales ya que permite la operación en continuo y un mejor control del proceso. Esta última técnica permite el lavado simultáneo con tampón (diafiltración) lo que permite mantener el pH y la fuerza iónica en los valores necesarios para evitar la lisis celular y la consecuente pérdida de enzima (Bonner, 2007).

A continuación se procede a la rotura o lisis celular para liberar las proteínas intracelulares al medio. Esta lisis se realiza normalmente por disrupción mecánica a elevada presión aunque también se puede llevar a cabo por ultrasonidos o por métodos no mecánicos como la lisis química (mediante la acción de detergentes), física (choque osmótico, congelación) o enzimática (lisozima). Tras la disrupción se obtiene una mezcla de los componentes solubles e insolubles de la biomasa. Esta mezcla se puede clarificar mediante filtración a presión, a vacío o tangencial donde se han de ajustar cuidadosamente los parámetros de operación para evitar el paso de los pequeños orgánulos celulares al permeado. Otro método para eliminar los restos celulares del lisado es la centrifugación en diversos equipos desarrollados en función

del tamaño de partícula que sea necesario separar (Seetharam y Sharma, 1991; Roe, 2001).

La mezcla de proteínas obtenida se somete a diferentes procesos de purificación en función de la pureza requerida. Estos procesos pueden ser ultra- y nanofiltración, cristalización, electroforesis y cromatografía, siendo esta última la técnica más utilizada. Los métodos cromatográficos para la purificación de enzimas pueden ser de diferentes tipos, en función del tipo de unión que se produzca entre la fase móvil y la matriz de la columna cromatográfica: adsorción, intercambio iónico, gel filtración, afinidad o interacciones hidrofóbicas. Normalmente una sola etapa de purificación no es suficiente para alcanzar la pureza requerida y se necesitan asociar en serie varias etapas para poder obtener la enzima con el grado de pureza que se desea. Esto implica unos mayores costes de purificación y una menor eficacia global del proceso (Roe, 2001; Bonner, 2007).



**Figura 1.3.** Esquema general del proceso de obtención de enzimas intracelulares producidas mediante cultivos microbianos.

Para facilitar la purificación enzimática se ha desarrollado una técnica denominada cromatografía de afinidad a metales inmovilizados, IMAC (*immobilized metal affinity chromatography*) (Hage, 2006). Esta técnica permite la separación de la



enzima de una manera totalmente selectiva, pudiéndose reducir el número de etapas de purificación y obtener, en algunos casos, la purificación en una sola etapa (García-Junceda y col., 1995).

La técnica IMAC está basada en la interacción por coordinación entre los iones metálicos divalentes que se encuentran inmovilizados en la superficie del soporte de la columna cromatográfica con los residuos quelantes de ciertos aminoácidos, principalmente con el anillo imidazol de la histidina. Para una correcta coordinación hace falta la presencia de varios residuos de este tipo adyacentes en la superficie de la enzima y accesibles al soporte. Esto se consigue normalmente mediante ingeniería genética, introduciendo en el vector de expresión de la enzima los nucleótidos necesarios para expresar en uno de los extremos de la cadena de aminoácidos un cierto número de residuos de histidina (normalmente seis). De esta manera, estas enzimas recombinantes de fusión a una cola de poli-histidinas quedarán retenidas en la columna cromatográfica ya que presentan una afinidad por el metal inmovilizado mucho mayor que la del resto de proteínas intracelulares, por lo que se puede realizar una separación altamente selectiva en una sola etapa cromatográfica. Debido a que la unión de las histidinas de la enzima recombinante con el metal inmovilizado es reversible, la recuperación de ésta se hace fácilmente mediante elución con una disolución de imidazol de concentración suficiente para competir con las histidinas por las posiciones de coordinación del metal (Hage, 2006).

#### **1.4. Inmovilización enzimática**

La actividad catalítica de las enzimas está altamente condicionada por sus estructuras terciaria y cuaternaria ya que, en muchos casos, los residuos de aminoácidos que forman parte del centro activo se encuentran muy alejados dentro

de la cadena polipeptídica pero muy cercanos debido al plegamiento propio de la proteína. Sin embargo, la estructura molecular de las enzimas en solución puede sufrir modificaciones bajo ciertas condiciones como alta temperatura, valores extremos de pH o presencia de disolventes orgánicos, que pueden provocar la inactivación irreversible de la enzima. Otro problema del uso de la enzima soluble como biocatalizador es la difícil recuperación de la enzima que permanece activa tras el proceso biocatalítico para su reutilización (Cao, 2005).

La inmovilización enzimática en partículas insolubles puede solucionar en gran medida estos problemas ya que, en muchos casos, estabiliza la estructura de la enzima y facilita la separación de la enzima del medio de reacción. Desde el punto de vista de la economía del proceso biocatalítico, la inmovilización enzimática también presenta ventajas respecto del uso de la enzima en solución. La posibilidad de recuperar mediante procesos sencillos el biocatalizador activo hace que la cantidad de actividad enzimática que hay que reponer por cada kilogramo de producto tras cada ciclo productivo (número de consumo de catalizador) sea mucho menor y los costes se reduzcan de una manera importante. Actualmente, los biocatalizadores inmovilizados se están empleando en numerosas aplicaciones entre las que se encuentran la producción de compuestos útiles por conversión estereo- y regio-selectiva, producción de energía mediante procesos biológicos, tratamiento selectivo de ciertos contaminantes, análisis en continuo y terapia enzimática (De Vos y col., 2000; Cao, 2005).

#### 1.4.1. Tipos de inmovilización

El método de inmovilización se debe seleccionar teniendo en cuenta el tipo de biocatalizador, el tipo de reacción que se desea catalizar y el tipo de biorreactor en el que se va a llevar a cabo la biocatálisis. Otro aspecto a tener en cuenta es que los

biocatalizadores inmovilizados deben tener la suficiente resistencia mecánica y estabilidad física, química y biológica para la operación en el biorreactor durante largos periodos de tiempo y no ser tóxico. No existe de momento ninguna metodología sistemática para la elección del mejor proceso de inmovilización por lo que es necesario realizar la optimización de este proceso para cada caso en particular. El análisis económico de las diferentes alternativas será el que determine el método de inmovilización que se emplee en cada caso (De Vos y col., 2000; Cao, 2005).

Se han desarrollado diferentes técnicas de inmovilización de biocatalizadores que se pueden agrupar en cuatro grandes grupos: inmovilización sobre soportes insolubles preexistentes (enlace covalente, enlace iónico y adsorción), entrecruzamiento o *cross-linking*, atrapamiento, inclusión en geles y técnicas mixtas. La inmovilización sobre soportes insolubles se emplea normalmente en el caso de enzimas, mientras que la inmovilización por atrapamiento es la más empleada para células viables. La inmovilización por entrecruzamiento y las técnicas mixtas pueden emplearse tanto para enzimas o para células no viables (De Vos y col., 2000; Cao, 2005).

a) Enlace covalente: Los grupos funcionales de la superficie del soporte reaccionan covalentemente con algunos residuos de aminoácidos de la superficie de la enzima que no intervengan en la catálisis. Debido a este enlace fuerte entre el soporte y la enzima, se evitan posibles pérdidas de biocatalizador durante la operación y, en la mayoría de los casos, se mejora notablemente la estabilidad enzimática. Sin embargo, bajo las condiciones de inmovilización por enlace covalente ciertos aminoácidos esenciales para la catálisis pueden verse modificados, así como la estructura global de la proteína, lo que provoca pérdidas irreversibles de actividad.

b) Enlace iónico: La unión entre la enzima y el soporte de intercambio iónico se realiza por interacciones de carácter reversible, lo que permite revertir el equilibrio de inmovilización variando, por ejemplo, la fuerza iónica o el pH del

medio. Esto permite la desorción de la enzima inactiva tras un cierto periodo de operación, pudiéndose emplear este soporte en una nueva inmovilización, con la consecuente reducción de costes. Como inconveniente de este método figura el requerimiento de un control preciso de las condiciones de pH, fuerza iónica y temperatura durante la operación en el biorreactor para evitar la desorción de la enzima activa durante la biocatálisis.

c) Adsorción física: En este caso, la enzima se une a la superficie del soporte mediante interacciones reversibles de tipo puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, interacciones hidrofóbicas o una combinación de las mismas. Una vez más, es necesario operar en el biorreactor en las condiciones adecuadas que minimicen la desorción enzimática.

d) Entrecruzamiento o *cross-linking*: Mediante la adición de reactivos bi- o multifuncionales, que reaccionan con los residuos de aminoácidos de moléculas de enzima diferentes por varios puntos, se consigue el entrecruzamiento de las moléculas enzimáticas en forma de agregados conocidos como CLEAS (*cross-linked protein aggregates*). El agente entrecruzante más conocido es el glutaraldehído aunque también pueden emplearse di-isocianato de tolueno o hexametileno. La actividad enzimática retenida mediante esta técnica es normalmente menor que la obtenida mediante otras técnicas de inmovilización. Además, mediante este método es difícil controlar el tamaño de partícula final y la textura del sólido dificulta en gran medida su manejo.

e) Atrapamiento: En este tipo de inmovilización, el biocatalizador se retiene en el interior de partículas sólidas o membranas, separándolo así del medio por una barrera física semipermeable a los sustratos o productos de la reacción catalítica, lo que provoca que la catálisis sea generalmente más lenta que en las otras técnicas de inmovilización. Esta técnica es la más empleada para inmovilizar células viables.

Según la técnica que se emplee para retener el biocatalizador, se pueden distinguir distintos tipos de inmovilización por atrapamiento.

- Microencapsulación mediante polímeros sintéticos semipermeables o membranas de fosfolípidos.
- Retención del biocatalizador en el interior de fibras huecas.
- Separación mediante membranas de ultrafiltración.

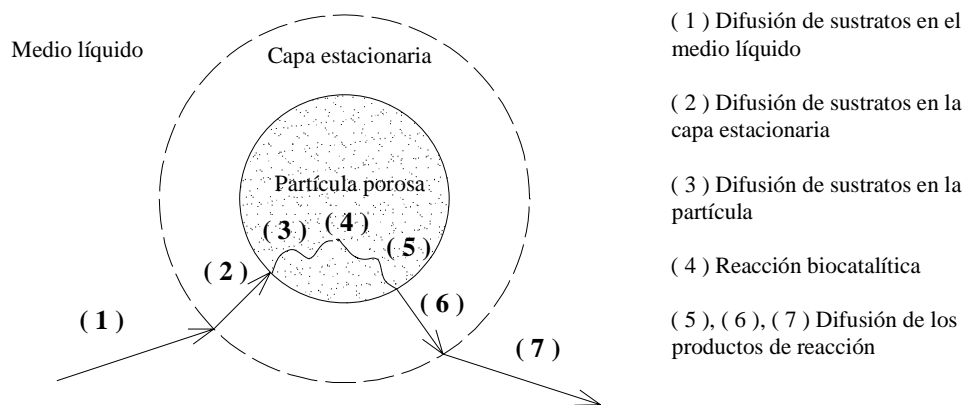
f) Inclusión en geles: En este caso, el biocatalizador se incorpora en una matriz tridimensional porosa, siendo las más empleadas los polímeros naturales como alginatos y carragenatos o polímeros sintéticos como la acrilamida.

g) Técnicas mixtas: Consisten en una combinación de las técnicas de inmovilización mencionadas. En el caso de enzimas, las técnicas mixtas normalmente combinan la inmovilización en un soporte insoluble por adsorción y posterior enlace covalente con el soporte (Mateo y col., 2001) o bien inmovilización por enlace covalente y posterior entrecruzamiento, esta técnica generalmente empleada en enzimas oligoméricas (Balcão y col., 2001; Fernández-Lafuente y col., 2001; Betancor y col., 2003; Pessela y col., 2004).

Actualmente se están desarrollando novedosas técnicas de inmovilización en nanopartículas y nanoestructuras. Las reducidas dimensiones de estos soportes (menos de 100 nm) les confieren unas propiedades muy interesantes en el desarrollo de biocatalizadores inmovilizados, biosensores y aplicaciones terapéuticas. Entre estas propiedades se encuentran la eliminación de las limitaciones difusionales que suelen presentar los derivados inmovilizados convencionales y que las nanopartículas en suspensión en un líquido presentan movimiento Browniano debido a la agitación térmica de las moléculas del fluido, por lo que se podrían reducir las necesidades de agitación en el biorreactor (Jia y col., 2003; Kim y col., 2006a). Los biocatalizadores inmovilizados en nanopartículas se pueden emplear también en microrreactores para el desarrollo acelerado de bioprocesos (Liu y col., 2007).

### 1.4.2. Limitaciones difusionales en partículas porosas

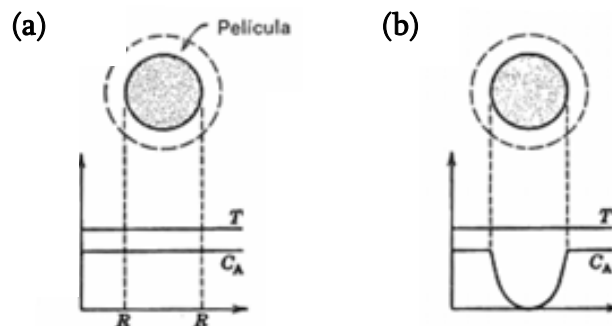
La cinética de la reacción catalizada por un biocatalizador inmovilizado en el interior de una partícula porosa viene condicionada no sólo por la reacción que se lleva a cabo, sino también por los procesos físicos de transporte de reactivos y productos a través del medio líquido y del interior de la partícula (figura 1.4).



**Figura 1.4.** Esquema de las distintas etapas de difusión y reacción que se producen en el interior de una partícula catalítica.

En sistemas con suficiente agitación externa, la transferencia de materia entre el medio líquido y la superficie de la partícula (etapas 1, 2, 6 y 7) se puede considerar que no ejerce ninguna limitación sobre la velocidad de conversión de sustratos. Esta velocidad vendrá determinada, por tanto, por el transporte de materia en el interior de la partícula (etapas 3 y 5) y la propia reacción biocatalítica (4). En función de la velocidad de estos dos procesos, se establecen diferentes gradientes de concentración de sustratos y productos en el interior de la partícula (figura 1.5). Si la velocidad de transferencia de materia es lo suficientemente rápida como para compensar el consumo de sustratos debido a la reacción catalítica, toda la partícula se encontrará a la misma concentración de reactivos que en el seno del fluido por lo que se dice que la partícula no presenta limitaciones difusionales. Por el contrario, si la velocidad de

la reacción es suficientemente rápida respecto la velocidad de transporte de reactivos, se establece un gradiente de concentración en el interior de la partícula. En este caso, no todo el biocatalizador inmovilizado está en contacto con la concentración de sustrato del exterior por lo que se dice que la partícula presenta limitaciones difusionales (Levenspiel, 1998).



**Figura 1.5.** Perfil de temperatura y concentración de reactivos en el interior de una partícula catalítica porosa para una reacción isotérmica y sin limitaciones a la transferencia de materia en la película externa: (a) Sin limitaciones difusionales a la transferencia interna de materia y (b) con fuertes limitaciones difusionales (extraído de Levenspiel, 1998).

La velocidad global de reacción es decir, la velocidad de consumo de sustratos y aparición de producto calculada a partir de la variación de la concentración en el seno del líquido, depende, por tanto, de la influencia relativa entre la velocidad de la reacción catalítica y la de transporte de reactivos. Estas dos velocidades están interrelacionadas ya que la velocidad de transporte depende del gradiente de concentración, siendo mayor cuanto mayor sea la diferencia de concentración entre la superficie y el interior de la partícula. Por otro lado, la velocidad de la reacción catalítica depende de la concentración de sustrato de manera que a menor concentración de sustrato, menor velocidad de reacción. Por lo tanto, la aparición de un gradiente de concentración en el interior de la partícula favorece el incremento de la velocidad de difusión y ralentiza la velocidad de la reacción catalítica. La velocidad global de reacción vendrá dada por el equilibrio final que se establezca entre estos dos procesos.

Debido a la dificultad de obtener una ecuación matemática que describa la aparición de limitaciones difusionales en partículas catalíticas porosas dada la complejidad de los procesos involucrados, normalmente se suele recurrir al empleo de parámetros y correlaciones empíricas que describan el sistema. Un parámetro ampliamente utilizado es el factor de eficacia  $\eta$ , definido como la relación entre la velocidad de la reacción observada y la velocidad de la reacción que se obtendría en ausencia de limitaciones por difusión (concentración de reactivos y productos uniformes en toda la partícula e iguales a las de la superficie externa). Otro parámetro que se emplea con frecuencia en el estudio de procesos con transferencia de materia por difusión y reacción química, es el número adimensional llamado módulo de Thiele ( $\Phi$ ) que representa el cociente entre la velocidad de reacción y la velocidad de difusión. La expresión de este módulo para una cinética de tipo Michaelis-Menten se muestra en la ecuación 1.1.

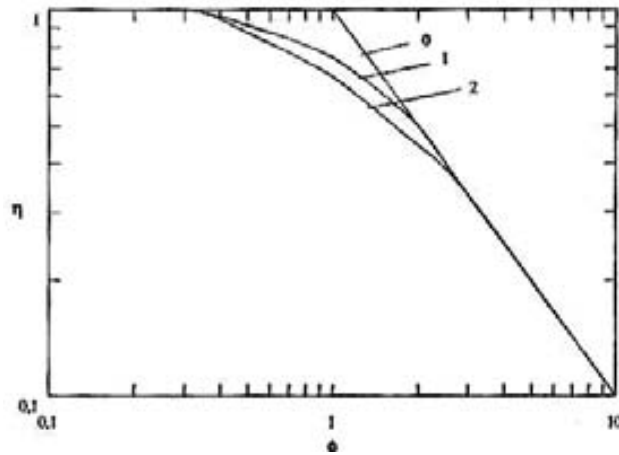
$$\Phi^2 = \frac{r_m}{K_M \cdot D_s} \cdot \left(\frac{R}{3}\right)^2 \quad (1.1)$$

Donde  $r_m$  es la velocidad máxima de reacción (mol/L·s);  $K_M$ , la constante de Michaelis-Menten (mol/L);  $D_s$ , la difusividad efectiva del sustrato en la partícula (cm<sup>2</sup>/s) y  $R$ , el radio de la partícula (cm).

El factor de eficacia y el módulo de Thiele pueden relacionarse de manera empírica resultando un comportamiento similar para distintas cinéticas de reacción (figura 1.6). Para valores bajos del número de Thiele, el factor de eficacia es la unidad lo que implica que la velocidad de reacción observada coincide con la velocidad de reacción en ausencia de limitaciones por difusión. De la definición de módulo de Thiele se puede deducir que un valor bajo de este parámetro se obtiene cuando la velocidad de difusión de reactivos es bastante mayor a la de la reacción catalítica. Al aumentar el valor del módulo de Thiele, aparece un cierto valor umbral a partir del



cual el factor de eficacia disminuye indicando la aparición de limitaciones difusionales en la velocidad de reacción global.



**Figura 1.6.** Variación del factor de eficacia en función del número de Thiele para cinéticas de distinto orden de reacción (extraído de Gòdia y López-Santín, 1998).

Desde el punto de vista de la optimización del proceso de inmovilización y operación en biorreactor, interesa la obtención de biocatalizadores inmovilizados con la máxima carga que sea posible pero en ausencia de limitaciones difusionales es decir, próximos al valor umbral de aparición de limitaciones por difusión. De la definición del módulo de Thiele (ecuación 1.1) se desprende que, para modificar su valor en una reacción biocatalítica definida, los únicos parámetros que se pueden variar son la velocidad máxima de reacción (carga de biocatalizador) y el tamaño de la partícula. Estos dos parámetros se deben evaluar experimentalmente en cada caso concreto para encontrar las mejores condiciones de inmovilización que den lugar al biocatalizador inmovilizado óptimo para el proceso catalítico y el biorreactor seleccionado.

## 1.5. Aldolasas en síntesis estereoselectiva

Las aldolasas forman parte del grupo de enzimas denominado liasas que catalizan la formación o lisis selectiva de enlaces carbono-carbono, carbono-oxígeno o carbono-nitrógeno. Las aldolasas, en particular, catalizan la formación de enlaces carbono-carbono mediante reacciones de adición aldólica (figura 1.7) en las que el carbono  $\alpha$  desprotonado de un aldehído o cetona donador ataca al grupo carbonilo de otro aldehído o cetona aceptor, generando un  $\beta$ -hidroxialdehído o una  $\beta$ -hidroxicetona (Machajewski y Wong, 2000).

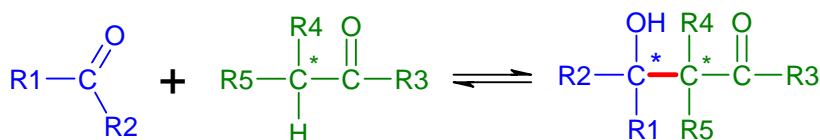


Figura 1.7. Esquema general de una reacción de adición aldólica.

La formación de enlaces C-C y la generación de compuestos con dos centros estereogénicos contiguos de una forma altamente estereoselectiva y en condiciones suaves de pH, temperatura y presión hace que estas enzimas tengan un gran potencial industrial en la síntesis orgánica de compuestos con actividad terapéutica y en especial, en la producción de compuestos enantioméricamente puros (Breuer y Hauer, 2003; García-Junceda y col., 2004).

### 1.5.1. Clasificación de las aldolasas

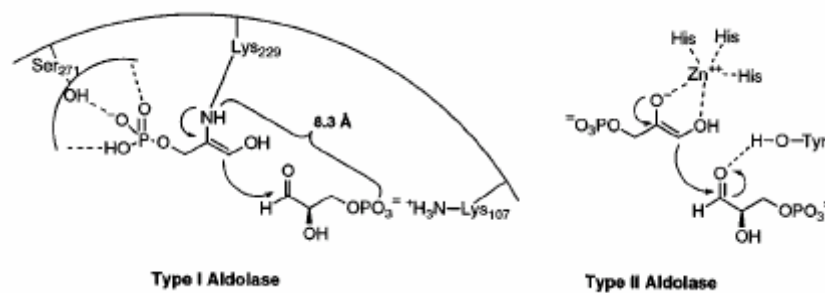
Existen más de 30 aldolasas identificadas hasta la fecha. Las aldolasas pueden clasificarse en dos grandes grupos según el mecanismo empleado en la catálisis: aldolasas de tipo I y de tipoII (Boyer, 1972; Takayama y col., 1997).

- Aldolasas de tipo I.

El mecanismo de catálisis de este tipo de aldolasas se basa en la formación de un compuesto intermedio (base de Schiff) entre el sustrato donador y un residuo lisina del centro activo de la enzima, añadiéndose después al aceptor (figura 1.8). Este tipo de aldolasas son las que predominan en animales superiores y plantas.

- Aldolasas de tipo II.

Este tipo de aldolasas necesitan como cofactor un catión divalente (generalmente  $Zn^{+2}$ ) que actúa como ácido de Lewis en la catálisis para facilitar la desprotonación del sustrato (figura 1.8). Este tipo de aldolasas se encuentran principalmente en procariotas, levaduras, algas y hongos.



**Figura 1.8.** Clasificación de aldolasas según su mecanismo catalítico (extraído de Takayama y col., 1997).

Por otro lado, las aldolasas que han sido investigadas por su potencial en síntesis asimétrica se clasifican normalmente atendiendo a la naturaleza del sustrato donador, obteniéndose cuatro grupos principales:

- Aldolasas dependientes de dihidroxiacetona fosfato (DHAP): Este tipo de aldolasas presentan una elevada especificidad por el sustrato donador, DHAP, pudiendo admitir una amplia variedad de aldehídos como sustratos aceptores para formar cetosas-1-fosfato (Wong y Whitesides, 1994; Fessner y Helaine, 2001). En este grupo se conocen cuatro aldolasas: D-fructosa-1,6-bifosfato aldolasa, D-tagatosa-1,6-bifosfato aldolasa, L-fuculosa-1-fosfato aldolasa, L-ramnulosa-1-fosfato aldolasa.

- Aldolasas dependientes de acetaldehído: Este grupo incluye únicamente la 2-desoxiribosa-5-fosfato aldolasa (DERA) que emplea acetaldehído como sustrato donador y otros aldehídos como aceptores para producir 2-desoxialdehídos. Es la única aldolasa conocida que cataliza la adición aldólica reversible de dos aldehídos y no requiere sustratos fosforilados como la mayoría de las demás aldolasas.

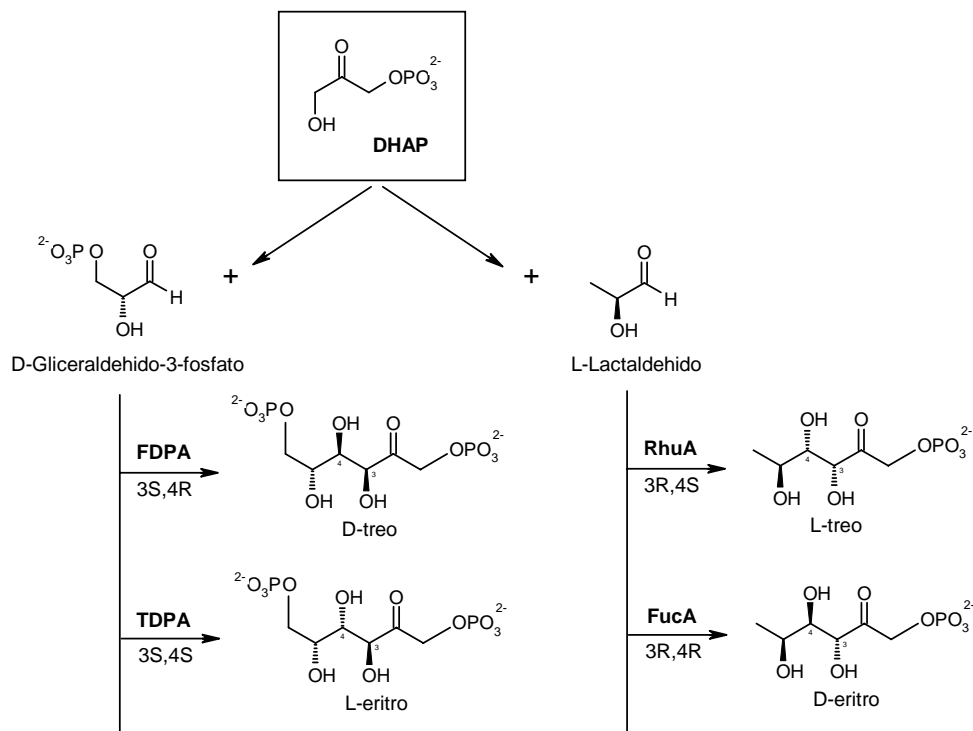
- Aldolasas dependientes de glicina: Este grupo de aldolasas catalizan la adición aldólica reversible de glicina, como sustrato donador, con varios tipos de aldehídos para formar  $\beta$ -hidroxi- $\alpha$ -aminoácidos. Dentro de este grupo, las enzimas más estudiadas son las treoninas aldolasas.

- Aldolasas dependientes de piruvato o fosfoenolpiruvato (PEP): Estas aldolasas utilizan piruvato o PEP como sustrato donador y varios aldehídos como aceptores para formar 3-desoxi-2-cetoácidos. Dentro de este grupo se encuentra la N-acetilneuraminato aldolasa, también conocida como ácido siálico aldolasa, que depende de piruvato como sustrato donador.

Las aldolasas han sido ampliamente estudiadas por su elevado potencial sintético, dando lugar a numerosas revisiones en los últimos años (Fessner y Walter, 1997; Machajewski y Wong, 2000; Sukumaran y Hanefeld, 2005).

### 1.5.2. Aldolasas dependientes de dihidroxiacetona fosfato

Las cuatro aldolasas dependientes de dihidroxiacetona fosfato (DHAP) que se conocen hasta el momento catalizan *in vivo* la adición reversible de DHAP con D-gliceraldehído-3-fosfato o L-lactaldehído para formar cetosas-1-fosfato cuya estereoquímica en los carbonos C-3 y C-4 resulta complementaria (figura 1.9). Estas cuatro aldolasas son D-tagatosa-1,6-bifosfato aldolasa (TDPA), D-fructosa-1,6-bifosfato aldolasa (FDPA), L-fuculosa-1-fosfato aldolasa (FucA) y L-ramnulosa-1-fosfato aldolasa (RhuA).



**Figura 1.9.** Estereoquímica de las reacciones catalizadas por aldolasas dependientes de dihidroxiacetona fosfato (DHAP).

El potencial sintético de las aldolasas ha sido investigado ampliamente en los últimos años. Sin embargo, la principal limitación del uso de estas enzimas a gran escala radica en el elevado precio de la DHAP. Diversos autores están desarrollando procesos de síntesis enzimática basados en estrategias *one-pot* para la generación de DHAP *in-situ* (Schoevaart y col., 2000; van Herk y col., 2006). Otras investigaciones se centran en eliminar la dependencia de DHAP mediante estrategias de evolución dirigida modificando la especificidad por sustrato de la enzima para que pueda admitir dihidroxiacetona (DHA) en vez de DHAP (Sugiyama y col., 2007).

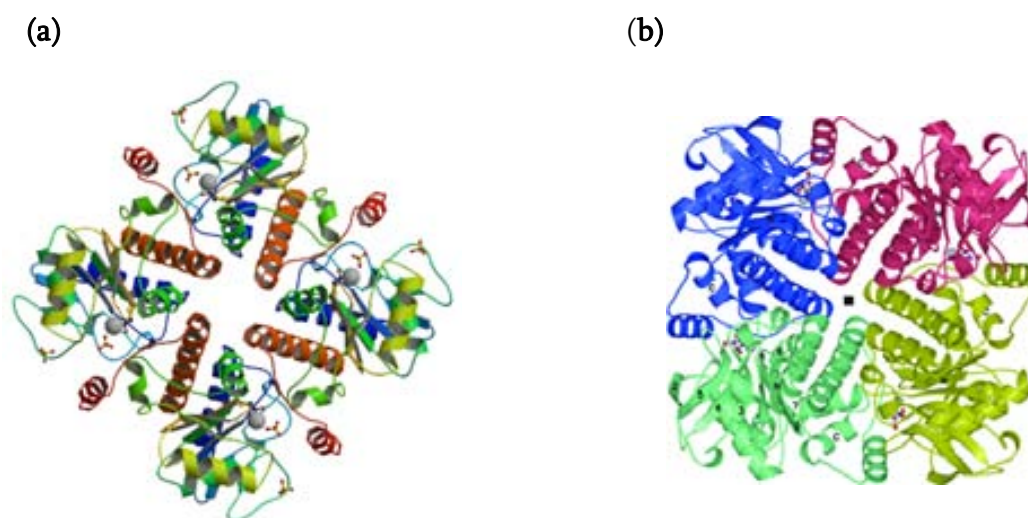
### 1.5.3. Ramnulosa-1-fosfato aldolasa y fuculosa-1-fosfato aldolasa

Las enzimas ramnulosa-1-fosfato aldolasa (RhuA) (EC 4.1.2.19) y fuculosa-1-fosfato aldolasa (FucA) (EC 4.1.2.17) de *Escherichia coli* son dos enzimas de tipo II que pertenecen al grupo de aldolasas dependientes de dihidroxiacetona fosfato y catalizan la adición aldólica entre este compuesto y diferentes aldehídos para dar lugar a dos diastereoisómeros que difieren únicamente en la estereoquímica del carbono en posición 4 (figura 1.9). Además de la elevada similitud de la reacción que catalizan y del producto obtenido, ambas enzimas poseen una estructura, disposición del centro catalítico y mecanismo de reacción muy similar (Kroemer y Schulz, 2002). Sin embargo, la homología de sus secuencias se reduce únicamente a 43 residuos de aminoácidos de los 274 residuos que presenta RhuA y los 215 residuos de FucA, entre los que se incluyen los residuos que forman parte del centro catalítico de estas enzimas (Joerger y col., 2000).

La ramnulosa-1-fosfato aldolasa y la fuculosa-1-fosfato aldolasa son homotetrámeros cuyas subunidades (30 kDa en el caso de RhuA y 24 kDa en FucA) están dispuestas hacia los vértices de un cuadrado en una simetría de tipo  $C_4$  (figura 1.10) (Dreyer y Schulz, 1996b; Kroemer y Schulz, 2002). Esta disposición no es muy frecuente en enzimas multiméricas y es el único caso dentro de este tipo de enzimas. Ambas enzimas presentan cuatro centros activos por molécula de enzima situados en las zonas de contacto entre subunidades contiguas y que contienen un catión  $Zn^{+2}$  unido a tres histidinas y un glutamato en una esfera de coordinación prácticamente tetraédrica. La principal diferencia entre ambas enzimas es que en el caso de FucA el extremo C-terminal se encuentra desordenado y apunta hacia el centro activo de la subunidad adyacente participando en la catálisis (Dreyer y Schulz, 1996a). En el caso de RhuA, el extremo C-terminal es fijo y se encuentra lejos del centro activo por lo que no participa en la catálisis (Kroemer y Schulz, 2002; Kroemer y col., 2003). Sin

embargo, el dominio N-terminal de cada subunidad de RhuA es móvil y se encuentra dispuesto hacia el exterior de la molécula en forma de antena. El movimiento de este dominio resulta esencial para la catálisis (Grueninger y Schulz, 2008). Otra diferencia entre estas dos enzimas es la naturaleza de un quinto ligando del átomo de  $Zn^{+2}$  perteneciente a la subunidad adyacente y que participa en la catálisis. En el caso de FucA este residuo es tirosina y en el caso de RhuA, treonina (Kroemer y Schulz, 2002).

El mecanismo de reacción de fuculosa-1-fosfato aldolasa consiste en primer lugar en la unión de DHAP al residuo Glu73 del dominio C-terminal, la desprotonación del carbono C3 y la estabilización por parte del átomo de  $Zn^{+2}$  del intermedio enediolato formado. Seguidamente se enlaza el aldehído en su cara *si* al residuo Tyr113' de la subunidad adyacente y se forma el enlace C-C con la DHAP. A continuación, se vuelve a protonar el residuo Tyr113' y se disocia el producto volviendo Glu73 a su estado inicial en el centro activo (Dreyer y Schulz, 1996a; Joerger y col., 2000). El mecanismo de reacción de la ramnulosa-1-fosfato aldolasa es muy similar y comienza por la unión y desprotonación de la DHAP por el residuo Glu117 que en este caso se encuentra en el dominio N-terminal. Este dominio se mueve hacia el átomo de  $Zn^{+2}$  que se encuentra coordinado por tres histidinas del dominio C-terminal. Por último, la DHAP ataca la cara *re* del aldehído formándose el enlace C-C, el producto se disocia y los residuos vuelven a su posición inicial (Kroemer y col., 2003; Grueninger y Schulz, 2008).



**Figura 1.10.** Estructura tridimensional de dos aldolasas dependientes de DHAP de *E. coli*: (a) fuculosa-1-fosfato aldolasa (Dreyer y Schulz, 1996) y (b) ramnulosa-1-fosfato aldolasa (Kroemer y Schulz, 2002).

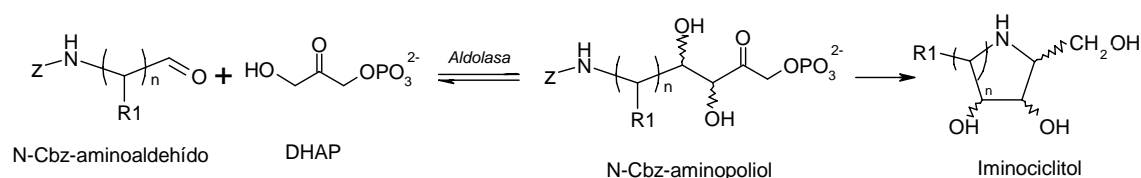
## 1.6. Reacciones de adición aldólica catalizadas por aldolasas

La posibilidad de catalizar estereoselectivamente la unión C-C en condiciones suaves de temperatura y pH hace que las aldolasas sean de gran interés para la síntesis orgánica de compuestos, especialmente para la industria de la química fina, farmacéutica o agroquímica.

Una de las reacciones de síntesis catalizadas por aldolasas que presenta un gran atractivo desde el punto de vista industrial es la síntesis estereoselectiva de aminopoliolés a partir de aminoaldehídos N-protegidos y dihidroxiacetona fosfato (DHAP) (Espelt y col., 2003; Espelt y col., 2005). A partir de aminopoliolés se pueden sintetizar iminociclitolés mediante tratamiento con fosfatasa ácida y una posterior hidrogenación (figura 1.11). Los iminociclitolés son compuestos miméticos de azúcares que pueden actuar como inhibidores de glicosidasas y glicotransferasas por lo que presentan una potencial aplicación como antibióticos, fármacos

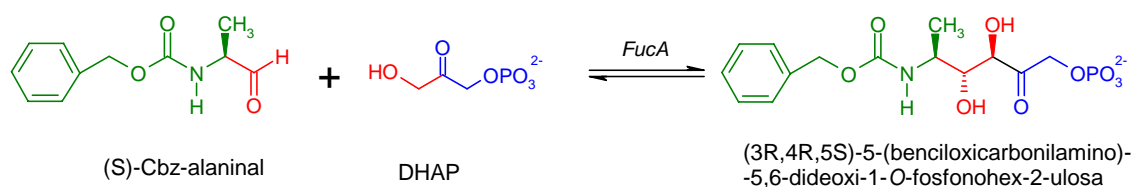


antimetastásicos, antihiper glucémicos o inmunoestimuladores y también son intermedios de gran versatilidad en la síntesis quiral de otras moléculas de interés (Liang y col., 2006; Caines y col., 2007).

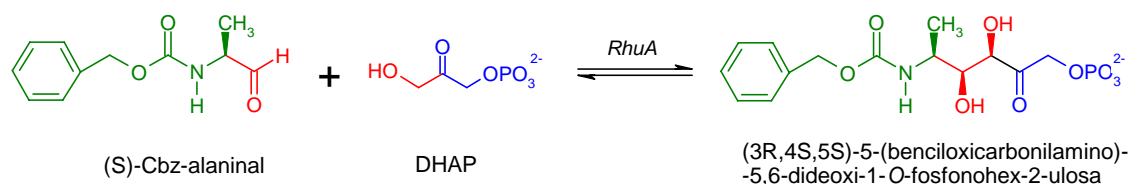


**Figura 1.11.** Síntesis enzimática de N-Cbz-aminopolioles lineales y posterior síntesis del correspondiente iminociclitol.

Como reacción modelo de la síntesis de N-Cbz-aminopolioles en esta tesis se ha seleccionado la adición aldólica entre DHAP y (S)-Cbz-alaninal catalizada por las enzimas fuculosa-1-fosfato aldolasa y ramnulosa-1-fosfato aldolasa debido a las prometedoras propiedades terapéuticas del iminociclitol correspondiente a los productos sintetizados y a la elevada diastereoselectividad, próxima al 100%, que ambas reacciones presentan (figuras 1.12 y 1.13) (Espelt y col., 2003; Espelt y col., 2005).

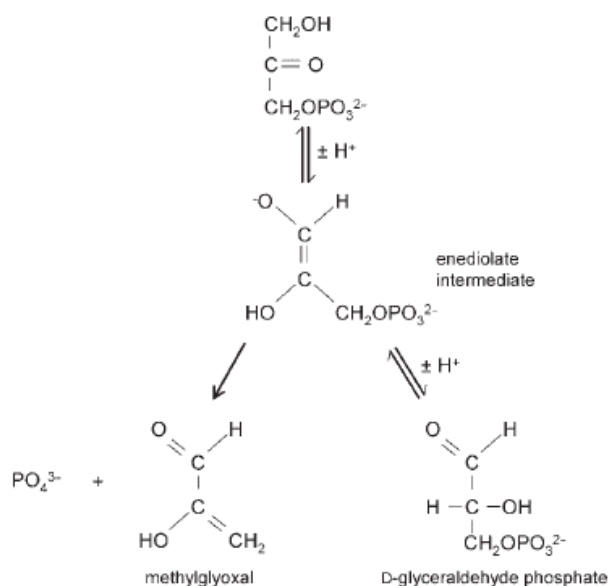


**Figura 1.12.** Reacción de adición aldólica entre (S)-Cbz-alaninal y dihidroxiacetona fosfato (DHAP) catalizada por fuculosa-1-fosfato aldolasa (FucA)

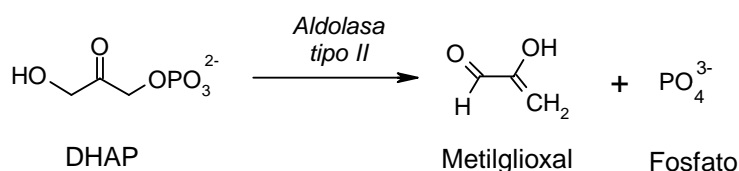


**Figura 1.13.** Reacción de adición aldólica entre (S)-Cbz-alaninal y dihidroxiacetona fosfato (DHAP) catalizada por ramnulosa-1-fosfato aldolasa (RhuA)

La adición aldólica entre dihidroxiacetona fosfato y (S)-Cbz-alaninal presenta dos reacciones secundarias debido a la degradación química y enzimática de la DHAP. Por un lado, la DHAP se degrada químicamente a través de un intermedio enediolato para dar lugar irreversiblemente a metilglioxal y fosfato inorgánico (figura 1.14) (Fessner y Walter, 1997). En trabajos anteriores dentro del grupo de investigación se descubrió que las aldolasas de tipo II también podían catalizar esta reacción de degradación a través de la formación del mismo intermedio enediolato al unirse la DHAP al  $Zn^{+2}$  del centro activo y ser desprotonado por el residuo de ácido glutámico próximo (figura 1.15) (Suau y col., 2006).



**Figura 1.14.** Mecanismo de isomerización y descomposición de dihidroxiacetona fosfato (DHAP) (extraído de Fessner y Walter, 1996).



**Figura 1.15.** Reacción de degradación enzimática de dihidroxiacetona fosfato (DHAP) catalizada por aldolasas de tipo II.

## 1.7. Ingeniería del medio de reacción

Para obtener una elevada eficiencia de la reacción biocatalítica, se ha de seleccionar un medio de reacción que permita una elevada solubilidad de los reactivos, elevada actividad y estabilidad del biocatalizador y favorecer la separación del producto de reacción. Cuando en el medio se encuentran productos de diferente hidrofobicidad, entre las posibles estrategias se encuentran el empleo de medios acuosos con un disolvente orgánico como cosolvente, el uso de medios bifásicos fase orgánica/fase acuosa o el uso de líquidos iónicos (Illanes, 2008).

El empleo de medios acuosos con disolventes orgánicos como cosolventes en biocatálisis permite una mayor solubilidad de compuestos hidrofóbicos respecto de los medios acuosos sin que la enzima se vea afectada en gran medida. Para ello, la concentración de cosolvente en el medio debe encontrarse entre 10-20% para evitar la desactivación de la enzima que suele producirse a concentraciones más elevadas (Budde y Khmelnsky, 1999). Los disolventes más empleados como cosolventes en biocatálisis son dimetilsulfóxido, dimetilformamida, tetrahidrofurano, dioxano, acetona o metanol (Cabral y col., 1994; Faber, 2004).

Los sistemas bifásicos se emplean para separar en diferentes fases la enzima, que normalmente se encuentra disuelta en la fase acuosa, del compuesto hidrofóbico disuelto en la fase orgánica. Otra ventaja de este sistema es que, en caso de que el producto de la reacción sea hidrofóbico, el equilibrio de reacción en la fase acuosa se verá desplazado hacia la formación de producto, obteniéndose unos mayores rendimientos de reacción. En estos sistemas es necesaria una adecuada transferencia de materia entre fases que se ve favorecida por una elevada superficie de interfase. Sin embargo, la presencia de interfases provoca, en la mayoría de las enzimas a excepción de las lipasas, que la enzima se inactive. Una posible solución es el empleo de reactores de membrana que permiten separar las dos fases mediante una barrera

permeable. En este caso, la transferencia de materia a través de la membrana vuelve a ser un parámetro crucial en la obtención de elevadas productividades en estos sistemas (Cabral y col., 1994; Faber, 2004).

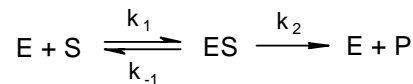
Por último, los líquidos iónicos son sales con un punto de fusión inferior a 100°C que poseen interesantes propiedades como medios de reacción debido a que presentan una volatilidad extremadamente baja, son capaces de disolver compuestos orgánicos, inorgánicos y poliméricos tanto polares como no polares y presentan una gran versatilidad de comportamiento en agua y disolventes orgánicos, desde prácticamente inmiscibles a totalmente miscibles. Por estos motivos, estos nuevos medios ofrecen un elevado potencial para ser empleados en reacciones biocatalíticas (Rogers y col., 2001; Lee y Lee, 2005; Ou y Huang, 2006; Roosen y col., 2008).

## **1.8. Cinética enzimática**

A la hora de diseñar un biorreactor enzimático es indispensable conocer la ecuación cinética que rige la reacción catalítica de interés. Por un lado, el estudio cinético permite conocer el comportamiento de la enzima y descubrir posibles inhibiciones por sustrato o producto que puedan influir en la conversión de la reacción. Por otro lado, la ecuación cinética puede incorporarse en programas informáticos de simulación y optimización para obtener las condiciones óptimas de operación en el biorreactor enzimático.

La primera ecuación cinética para una reacción enzimática de un solo sustrato y producto (figura 1.16) fue propuesta por Henri en 1903. Posteriormente, Michaelis y Menten confirmaron experimentalmente las teorías de Henri y plantearon en 1913 la conocida ecuación de Michaelis-Menten (ecuación 1.2). Esta ecuación se basa en que la enzima (E) y el sustrato (S) reaccionan rápidamente para formar un complejo

enzima-sustrato (ES) que se rompe para dar lugar al producto (P) y enzima libre de nuevo. Se considera que la concentración de sustrato no se ve alterada por la formación del complejo ES debido a que la concentración de enzima es muy inferior a la concentración de sustrato y que la velocidad de reacción global está limitada por la rotura del complejo ES. Otra de las suposiciones que se asumen es que la enzima, el sustrato y el complejo ES se encuentran en equilibrio durante el progreso de la reacción. Esta última suposición se denomina aproximación de rápido equilibrio o de quasi-equilibrio (Segel, 1993).



**Figura 1.16.** Esquema general de una reacción enzimática con un sustrato.

$$r = -\frac{dS}{dt} = \frac{r_{\text{máx}} \cdot S}{K_M + S} = \frac{k_2 \cdot E_0 \cdot S}{K_M + S} \quad (1.2)$$

$$K_M = \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{E \cdot S}{ES} \quad (1.3)$$

$$k_2 = k_{\text{cat}} = \frac{r_{\text{máx}}}{E_0} \quad (1.4)$$

Donde  $r$  es la velocidad de reacción ( $\text{mM} \cdot \text{h}^{-1}$ );  $S$ , la concentración de sustrato ( $\text{mM}$ );  $r_{\text{máx}}$ , la velocidad máxima de reacción ( $\text{mM} \cdot \text{h}^{-1}$ );  $E_0$ , la concentración inicial de enzima ( $\text{mM}$ );  $k_2$  la constante cinética de disociación a producto y  $K_M$ , la constante de Michaelis ( $\text{mM}$ ) definida como la constante de equilibrio entre la concentración de la enzima libre ( $E$ ), sustrato ( $S$ ) y complejo enzima-sustrato ( $ES$ ). La constante cinética  $k_2$  también se denomina *turnover number* o  $k_{\text{cat}}$  y representa velocidad máxima de generación de producto por mol de enzima o mol de centros activos.

En 1925 Briggs y Haldane propusieron que no era necesario que el complejo enzima-sustrato estuviese en equilibrio con el enzima libre y el sustrato pero que, en un tiempo corto de reacción, se alcanza un estado quasi-estacionario en el que la velocidad de formación del complejo ES iguala a la velocidad a la que se rompe, siendo la concentración del complejo prácticamente constante en el tiempo. Esta

suposición se denomina aproximación de estado estacionario. La expresión resultante es exactamente la misma que la deducida por Michaelis-Menten (ecuación 1.2) aunque en este caso la constante  $K_M$  relaciona las concentraciones de enzima libre, sustrato y complejo enzima-sustrato en el estado estacionario, que pueden no coincidir con las concentraciones en equilibrio consideradas previamente (ecuación 1.3). Es, por tanto, una constante dinámica o de pseudoequilibrio y su definición relaciona las constantes cinéticas de las tres etapas (ecuación 1.5).

$$K_M = \frac{k_1 + k_2}{k_{-1}} \quad (1.5)$$

En el caso de reacciones enzimáticas que involucran más de un sustrato o producto se puede realizar el mismo tratamiento que en el caso de un solo sustrato, pudiendo aplicar tanto la aproximación de rápido equilibrio como de estado estacionario. En el caso concreto de reacciones con dos sustratos se debe tener en cuenta la formación de complejos binarios enzima sustrato (EA, EB) y un complejo ternario entre la enzima y los dos sustratos (EAB). También es importante tener en cuenta el orden de formación de estos complejos. A veces el complejo ternario sólo se forma a partir de uno de los dos complejos binarios y no del otro, en este caso el mecanismo se llama ordenado. Alternativamente, si el complejo EAB se puede formar a partir de cualquiera de los complejos binarios, el mecanismo se llama random. En otros mecanismos, el complejo binario EA da un producto X y se forma un complejo binario EA' que después reacciona con el sustrato B para dar un segundo producto Y. Este es el mecanismo ping-pong.

La velocidad de reacción puede verse afectada también por la presencia de algunas sustancias que se denominan activadores, si hacen que la velocidad de reacción aumente; inhibidores, si la disminuyen y moderadores, que puede actuar tanto como activadores como inhibidores. Estos mecanismos permiten la regulación

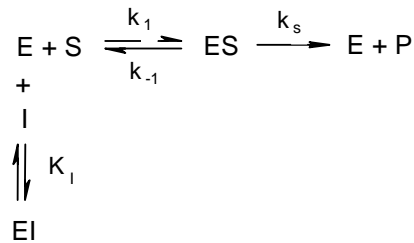
de la velocidad de reacción de las rutas metabólicas en el interior de las células. Respecto a los mecanismos de inhibición, las enzimas se ven afectadas con mucha frecuencia por la presencia del sustrato, producto u otros compuestos presentes en el medio, siendo los tipos de inhibición más frecuentes la inhibición competitiva, no competitiva y anticompetitiva. El efecto de la inhibición se refleja en la ecuación cinética mediante la incorporación en el denominador de un término adicional correspondiente al tipo de inhibición que ocurra (Segel, 1993).

### 1.8.1. Inhibición enzimática

La velocidad de reacción puede verse reducida por la presencia de diversos compuestos que se denominan inhibidores. Estos compuestos se unen a la enzima libre o al complejo enzima-sustrato de forma reversible o irreversible interfiriendo en la unión de la enzima al sustrato, la formación de producto o su disociación. En los casos más sencillos, el complejo enzima-inhibidor es inactivo y no progresa a producto. En otros tipos de inhibiciones, este complejo puede dar también producto de reacción, siendo la inhibición de tipo parcial. La inhibición también puede ser mixta, cooperativa o sinérgica cuando los inhibidores son no exclusivos, es decir, hay más de un lugar de unión del inhibidor con la enzima (Segel, 1993).

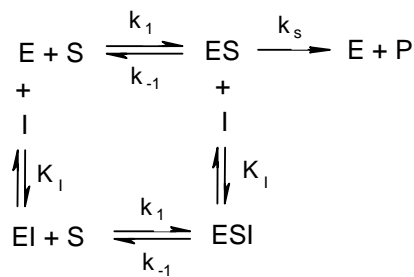
Los tres casos más sencillos de inhibición son la inhibición competitiva, no competitiva y anticompetitiva.

- Inhibición competitiva: La unión del inhibidor a la enzima impide la unión del sustrato por lo que se dice que inhibidor y sustrato son mutuamente excluyentes (figura 1.17 y ecuación 1.6 en tabla 1.2).



**Figura 1.17.** Esquema general de inhibición competitiva en una reacción enzimática con un sustrato.

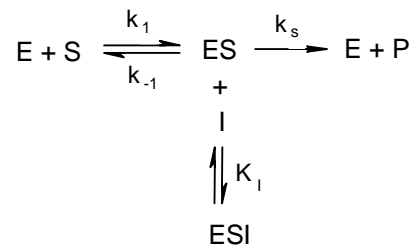
- Inhibición no competitiva: En este caso, el inhibidor no afecta a la unión del sustrato con la enzima. Ocurre normalmente cuando sustrato e inhibidor tienen diferentes puntos de unión en la estructura de la enzima por lo que el inhibidor se puede unir indistintamente a la enzima libre (E) o al complejo enzima-sustrato (ES) y la unión de un ligando no tiene efecto en la unión o disociación del otro. Sin embargo, la formación del complejo ESI es inactivo y no progresa a producto (figura 1.18 y ecuación 1.7 en tabla 1.2).



**Figura 1.18.** Esquema general de inhibición no competitiva en una reacción enzimática con un sustrato.



- Inhibición anticompetitiva: El inhibidor en este caso se une únicamente al complejo enzima-sustrato dando lugar a un complejo ternario ESI que no progresa a producto (figura 1.19 y ecuación 1.8 en tabla 1.2).



**Figura 1.19.** Esquema general de inhibición anticompetitiva en una reacción enzimática con un sustrato.

La ecuación cinética resultante en estos tres tipos de inhibición incorpora un término adicional en el denominador que incluye la constante de disociación del complejo enzima-inhibidor (EI) o constante de inhibición,  $K_I$ . También se emplea con frecuencia la inversa de esta constante que se denomina constante de asociación del complejo EI,  $k_i$ .

**Tabla 1.2.** Ecuaciones cinéticas de los distintos tipos de inhibición en una reacción enzimática con un sustrato.

Inhibición	Ecuación cinética
Competitiva	$r = \frac{r_{\text{máx}} \cdot S}{K_M \cdot \left(1 + \frac{I}{K_I}\right) + S} \quad (1.6)$
No competitiva	$r = \frac{r_{\text{máx}} \cdot S}{(K_M + S) \cdot \left(1 + \frac{I}{K_I}\right)} \quad (1.7)$
Anticompetitiva	$r = \frac{r_{\text{máx}} \cdot S}{K_M + S \cdot \left(1 + \frac{I}{K_I}\right)} \quad (1.8)$



# Capítulo 2. OBJETIVOS

## 2.1. Objetivo general

Avanzar en el desarrollo de un bioproceso catalítico rentable y sostenible empleando ramnulosa-1-fosfato aldolasa recombinante (RhuA) como biocatalizador para la producción estereoselectiva de un compuesto precursor de inhibidores de glicosidasas de acción terapéutica mediante adición aldólica de dihidroxiacetona fosfato y (S)-Cbz-alaninal.

## 2.2. Objetivos específicos

- Obtener un modelo cinético de la adición aldólica entre dihidroxiacetona fosfato y (S)-Cbz-alaninal catalizada por ramnulosa-1-fosfato aldolasa soluble en medio acuoso con dimetilformamida como cosolvente.
- Desarrollar un proceso de purificación e inmovilización en un solo paso para aldolasas recombinantes en soportes de afinidad metálica, empleando ramnulosa-1-fosfato aldolasa y fuculosa-1-fosfato aldolasa. Emplear los derivados inmovilizados así producidos en la biocatálisis de la adición aldólica de interés en medio acuoso con dimetilformamida como cosolvente y optimizar la carga enzimática evitando la presencia de limitaciones difusionales.

- Inmovilizar la enzima ramnulosa-1-fosfato aldolasa en nanopartículas de oro y emplear el biocatalizador inmovilizado obtenido en la biocatálisis de la adición aldólica de interés en medio acuoso con dimetilformamida como cosolvente.
- Estudiar el empleo de un novedoso medio de reacción, el líquido iónico [BMIM][BF<sub>4</sub>], como cosolvente en la biocatálisis con ramnulosa-1-fosfato aldolasa recombinante de la adición aldólica de interés.
- Evaluar la aplicación de un reactor de membrana para biotransformaciones empleando un medio bifásico acuoso/orgánico en la adición aldólica de interés catalizada por ramnulosa-1-fosfato aldolasa recombinante.

# Capítulo 3. MATERIALES Y MÉTODOS

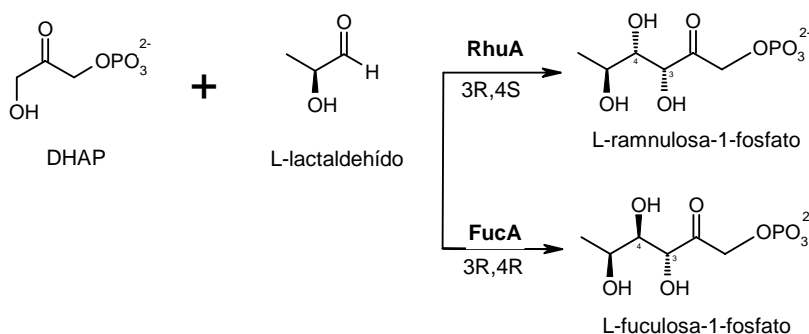
## 3.1. Materiales

Las enzimas ramnulosa-1-fosfato aldolasa recombinante (RhuA) y fuculosa-1-fosfato aldolasa recombinante (FucA) han sido producidas en nuestro grupo de investigación mediante cultivos de alta densidad de *E. coli*. RhuA ha sido purificada mediante cromatografía de afinidad a metales inmovilizados (IMAC) empleando una columna Co-IDA. FucA ha sido purificada mediante cromatografía IMAC empleando una columna Ni-IDA y posterior incubación en disolución de ZnSO<sub>4</sub>, salvo que se indique expresamente lo contrario. Los sustratos naturales de ambas enzimas empleados en la determinación de su actividad enzimática (L-ramnulosa-1-fosfato y L-fuculosa-1-fosfato) han sido sintetizados a partir de L-lactaldehído y dihidroxiacetona fosfato. El L-lactaldehído ha sido sintetizado mediante reacción entre D-treonina y ninhidrina. El aldehído de la reacción de adición aldólica, (S)-Cbz-alaninal, ha sido producido mediante síntesis orgánica salvo que se indique expresamente lo contrario. Los soportes de afinidad NTA han sido suministrados por Qiagen y los soportes de afinidad IDA han sido suministrados por GE Healthcare o cedidos amablemente por Hispanagar, según se indique. El agua empleada fue mili-Q con una resistividad de 18,2 MΩ. El resto de los compuestos químicos, salvo otra indicación, han sido proporcionados por Sigma-Aldrich.

## 3.2. Síntesis de sustratos enzimáticos

### 3.2.1. Síntesis de L-ramnulosa-1-fosfato y L-fuculosa-1-fosfato

Tanto L-ramnulosa-1-fosfato como L-fuculosa-1-fosfato se sintetizan como sales de ciclohexilamina mediante la adición aldólica de dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y L-lactaldehído catalizada enzimáticamente por ramnulosa-1-fosfato aldolasa (RhuA) y fuculosa-1-fosfato aldolasa (FucA) respectivamente (figura 3.1), y posterior neutralización con ciclohexilamina. Este procedimiento se basa en el desarrollado por (Fessner y col., 1993) y ha sido adaptado por (Durany, 2000).



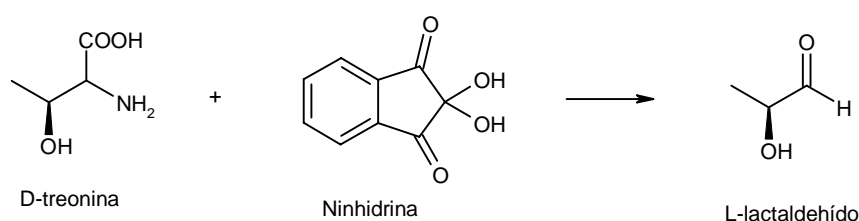
**Figura 3.1.** Síntesis enzimática de L-ramnulosa-1-fosfato y de L-fuculosa-1-fosfato a partir de dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y L-lactaldehído catalizada por ramnulosa-1-fosfato aldolasa (RhuA) y fuculosa-1-fosfato aldolasa (FucA).

En un balón se disuelven 10 mmoles de DHAP (Fluka, 37440) y de L-lactaldehído previamente sintetizado en 250 mL de agua mili-Q y se ajusta a pH 7,5 con KOH. Posteriormente, se añaden 10 UA de la aldolasa correspondiente y se deja reaccionar a 35°C y agitación magnética suave. Se toman muestras a intervalos regulares de tiempo que se introducen durante un minuto en un baño a 100°C para desnaturalizar la enzima y detener la reacción enzimática y se analiza el contenido de DHAP, L-lactaldehído y del azúcar sintetizado (L-ramnulosa-1-fosfato o L-fuculosa-

1-fosfato en cada caso). La reacción se detiene introduciendo la mezcla de reacción en un baño de agua a 100°C una vez que se han consumido los reactivos.

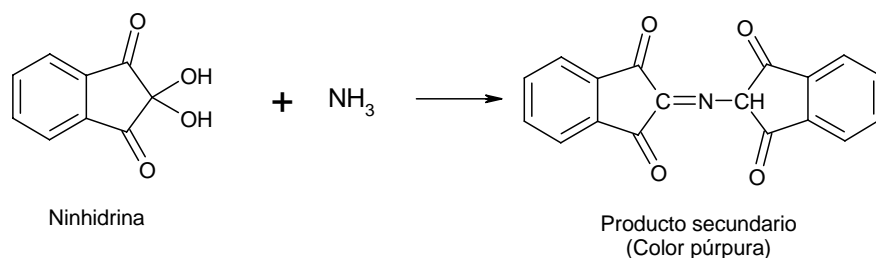
La purificación de L-ramnulosa-1-fosfato y L-fuculosa-1-fosfato se realiza en ambos casos por cromatografía de intercambio iónico. En primer lugar, la mezcla de reacción se filtra a través de carbón activo para retener las posibles impurezas orgánicas que pudiera contener y se carga en una columna cromatográfica que contiene 140 mL de resina de intercambio aniónico Dowex 1x8 en forma  $\text{HCO}_3^-$ , lavando con 2 volúmenes de agua mili-Q tras la carga. Se recogen fracciones de entre 50 y 100 mL del líquido eluido y se analiza el contenido de L-lactaldehído y del azúcar correspondiente mediante HPLC. Posteriormente, el azúcar retenido en la columna se eluye con una disolución de  $\text{NaHCO}_3$  0,2 M. Se recogen fracciones de elución de entre 50 y 100 mL y se determina su contenido en L-ramnulosa-1-fosfato o bien L-fuculosa-1-fosfato según sea el caso. La columna se lava con una disolución 0,7 M  $\text{NaHCO}_3$  para asegurarse de haber recuperado todo el azúcar retenido en la columna y las fracciones que contienen el producto de interés se liofilizan. El sólido liofilizado se disuelve en 100 mL de agua mili-Q y se realiza un tratamiento con resina catiónica Dowex 50x8 en forma  $\text{H}^+$  bajo agitación magnética fuerte para eliminar los restos de bicarbonato. Una vez que ya no se observa desprendimiento de  $\text{CO}_2$ , la solución se filtra a vacío en un embudo filtrante (10-16  $\mu\text{m}$ ) para separar la resina, se neutraliza con ciclohexilamina y se liofiliza de nuevo. Las sales de ciclohexilamina de L-ramnulosa-1-fosfato y de L-fuculosa-1-fosfato se conservan a -20°C bajo atmósfera inerte.

El L-lactaldehído se sintetizó por descarboxilación oxidativa de D-treonina mediante ninhidrina siguiendo la modificación del método de Zagalak y col. (1966) propuesto por Durany (2000) (figura 3.2).



**Figura 3.2.** Síntesis de L-lactaldehído a partir de D-treonina y ninhidrina.

La reacción se realiza disolviendo 25 mmol de D-treonina y 51,1 mmol de ninhidrina en 400 mL de tampón 0,05 M citrato sódico, pH 5,4, dejándolo reaccionar en un baño de glicerol a 100°C bajo agitación magnética fuerte y acoplado a un condensador de gases para retener el  $\text{NH}_3$  que se desprende. Tras 2 horas de reacción, la mezcla se deja enfriar y se filtra a vacío en un embudo filtrante (10-16  $\mu\text{m}$ ). Dado que la ninhidrina también reacciona con el  $\text{NH}_3$  que se forma dando un producto secundario de color púrpura (figura 3.3), la mezcla de reacción se debe purificar posteriormente.



**Figura 3.3.** Reacción secundaria de la síntesis de L-lactaldehído.

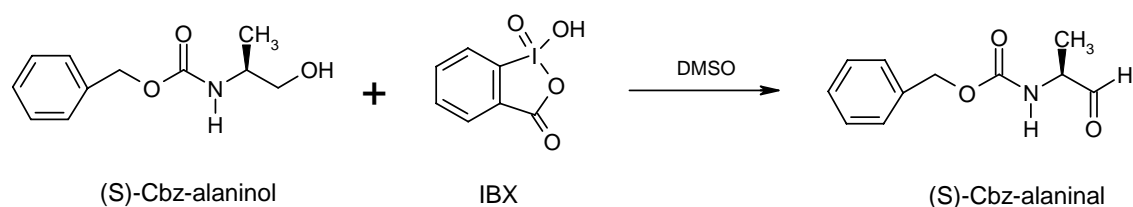
La purificación de L-lactaldehído se realiza mediante tratamiento con resinas de intercambio catiónico y aniónico. En primer lugar se añade la cantidad de resina aniónica Dowex 1x8  $\text{HCO}_3^-$  necesaria para obtener pH 6,5 aproximadamente y se mantiene bajo agitación vigorosa durante aproximadamente 3 horas. Tras este tiempo, se separa la resina por filtración y se realiza el tratamiento con la resina catiónica Dowex 50x8  $\text{H}^+$ , que consiste en añadir al filtrado la cantidad de resina catiónica necesaria para obtener pH 4,0 aproximadamente. Se mantiene bajo



agitación fuerte durante 1 hora y se filtra. A continuación la disolución de L-lactaldehído se concentra al vacío hasta un volumen entre 50 y 100 mL. Se repite el tratamiento con las resinas de intercambio iónico tantas veces como sea necesario hasta que la disolución sea incolora. Finalmente, se concentra al vacío la disolución de L-lactaldehído hasta un volumen de 25 mL aproximadamente y se conserva a 4°C, pH 4,0 y bajo atmósfera inerte. El L-lactaldehído obtenido se cuantifica de manera indirecta mediante reducción con borohidruro potásico (KBH<sub>4</sub>) y posterior cuantificación del 1,2-propanodiol formado mediante análisis en HPLC.

### 3.2.2. Síntesis de (S)-Cbz-alaninal

El (S)-Cbz-alaninal se sintetiza por oxidación de su correspondiente alcohol protegido, el (S)-Cbz-alaninol, con el oxidante IBX (ácido *o*-iodoxibenzoico) (Espelt y col., 2003). La reacción se lleva a cabo en dimetilsulfóxido (DMSO) anhidro (figura 3.4).



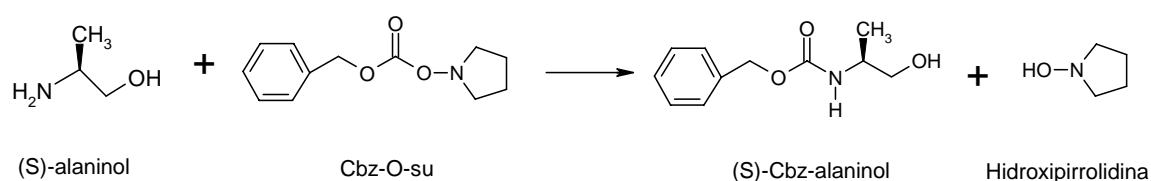
**Figura 3.4.** Síntesis de (S)-Cbz-alaninal a partir de la oxidación de (S)-Cbz-alaninol con ácido *o*-iodoxibenzoico (IBX) en dimetilsulfóxido anhidro (DMSO).

Para la síntesis teórica de 5 g de (S)-Cbz-alaninal se disuelven 5 g de (S)-Cbz-alaninol previamente sintetizado en 65 mL de DMSO anhidro. Se añaden 16,73 g de oxidante IBX y se deja reaccionar a temperatura ambiente y bajo agitación magnética durante 2 horas. La concentración inicial de reactivos, por tanto, es de 0,37 M para el (S)-Cbz-alaninol y 0,92 M para el IBX. La reacción se detiene añadiendo 850 mL de

agua mili-Q. El contenido del (S)-Cbz-alaninal formado se determina mediante análisis en HPLC.

El primer paso de purificación consiste en separar el IBX de la mezcla de reacción mediante filtración a vacío en embudo Büchner (20-25  $\mu\text{m}$ ). Se realizan dos lavados de 50 mL de acetato de etilo y se añaden las aguas de lavado al filtrado inicial. A continuación se realizan 5 extracciones empleando 80 mL de acetato de etilo cada una, conservando la fase orgánica extraída en cada etapa. El siguiente paso de extracción consiste en la eliminación de compuestos solubles en fase acuosa presentes en la fase orgánica. Para ello se realizan 5 extracciones con 80 mL de  $\text{NaHCO}_3$  al 5% w/v cada una y a continuación otras 5 extracciones con 80 mL de  $\text{NaCl}$  saturado cada una. Finalmente se elimina todo el contenido de agua añadiendo  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro hasta que el sólido queda en suspensión sin aglomerarse. El sólido se separa por filtración (2,5  $\mu\text{m}$ ) y el filtrado se rotavapora a 30°C y vacío para eliminar el disolvente. Para caracterizar el (S)-Cbz-alaninal obtenido se realiza un espectro de  $^1\text{H}$ -RMN y un espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN y también se cuantifica mediante análisis en HPLC. El (S)-Cbz-alaninal sintetizado se conserva a -20°C y en atmósfera inerte.

Para llevar a cabo la síntesis de (S)-Cbz-alaninal por oxidación del alcohol correspondiente, el (S)-Cbz-alaninol, hace falta que éste se encuentre N-prottegido para evitar que también se oxide el grupo amino presente en esta molécula. Se eligió el grupo Cbz como grupo protector ya que posee un anillo aromático que emite una señal en el espectro UV, lo que permite su detección y cuantificación mediante análisis de HPLC. La protección del (S)-alaninol con el grupo Cbz se lleva a cabo por medio de una reacción con N-(benciloxicarboniloxi) succinimida (Cbz-O-su) (figura 3.5).

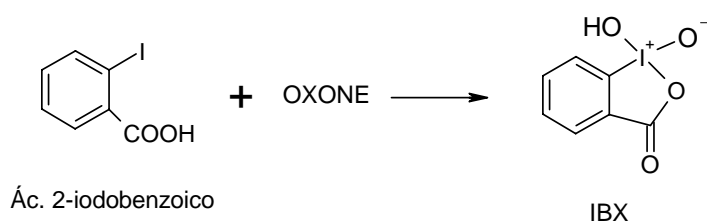


**Figura 3.5.** Reacción de protección del grupo amino de (S)-alaninol con el grupo Cbz.

En un balón se disuelven 5 g de (S)-alaninol en 75 mL de una disolución 4:1 de dioxano en agua mili-Q. Por otro lado se disuelven 15,8 g de Cbz-O-su en 75 mL de la misma disolución dioxano-agua 4:1. Mediante un embudo de adición se añade gota a gota la disolución de Cbz-O-su al (S)-alaninol, bajo agitación magnética suave y se deja reaccionar hasta el día siguiente.

El primer paso de purificación es la eliminación del dioxano mediante rotavaporación a 30°C y vacío. El residuo obtenido se disuelve en 75 mL de acetato de etilo y se trasvasa a un embudo de decantación. Se realizan 3 lavados de 50 mL de ácido cítrico al 5% w/v, 3 lavados de 50 mL de NaHCO<sub>3</sub> al 5% w/v y 3 lavados de 50 mL de NaCl saturado. Se elimina el agua presente mediante adición de NaSO<sub>4</sub> anhidro hasta que el sólido deje de aglomerarse dentro de la disolución. El sólido se separa por filtración (2,5 μm) y, finalmente, el filtrado se rotavapora a 30°C y vacío para eliminar el acetato de etilo. El (S)-Cbz-alaninol obtenido se guarda a 4°C hasta su utilización. Para caracterizar el compuesto sintetizado se realiza un espectro de <sup>1</sup>H-RMN y un espectro de <sup>13</sup>C-RMN.

El agente oxidante, ácido *o*-iodoxibenzoico o IBX, empleado en la síntesis del (S)-Cbz-alaninal, se obtiene mediante reacción de ácido 2-iodobenzoico con un compuesto comercial, el Oxone® (peroximonosulfato de potasio) (figura 3.6).



**Figura 3.6.** Síntesis del oxidante IBX (ácido o-iodoxibenzoico)

En primer lugar se disuelven 280,2 g de Oxone® en 1,5 mL de agua mili-Q y se mantiene a 70°C bajo agitación magnética. Se añaden 40,2 g de ácido-2-iodobenzoico y se tapa con papel de aluminio. Se deja reaccionar durante 3 horas a 70-74°C. Transcurrido ese tiempo se detiene la agitación y la calefacción y se deja enfriar la mezcla de reacción a temperatura ambiente. Posteriormente, se filtra a vacío a través de un embudo filtrante (10-16 µm) realizando dos lavados con acetona. El sólido filtrado se seca por liofilización durante un mínimo de 2 horas y se guarda a 4°C. Para determinar la pureza del compuesto sintetizado se realiza un espectro de <sup>1</sup>H-RMN.

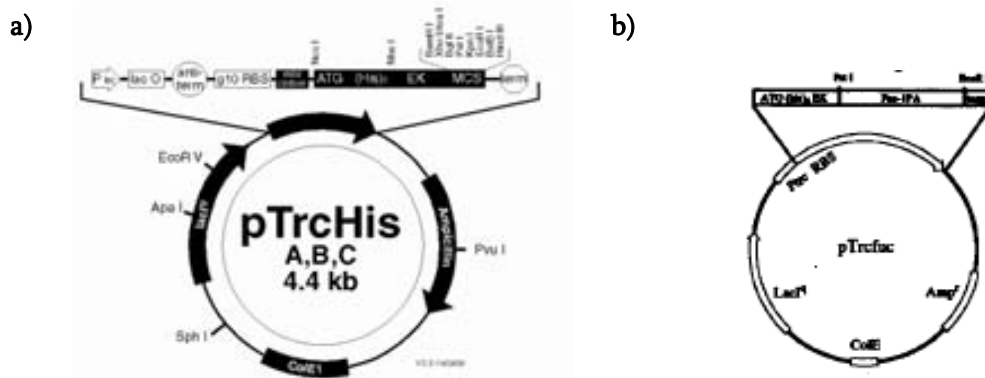
### 3.3. Obtención de aldolasas recombinantes

#### 3.3.1. Producción en cultivos de alta densidad

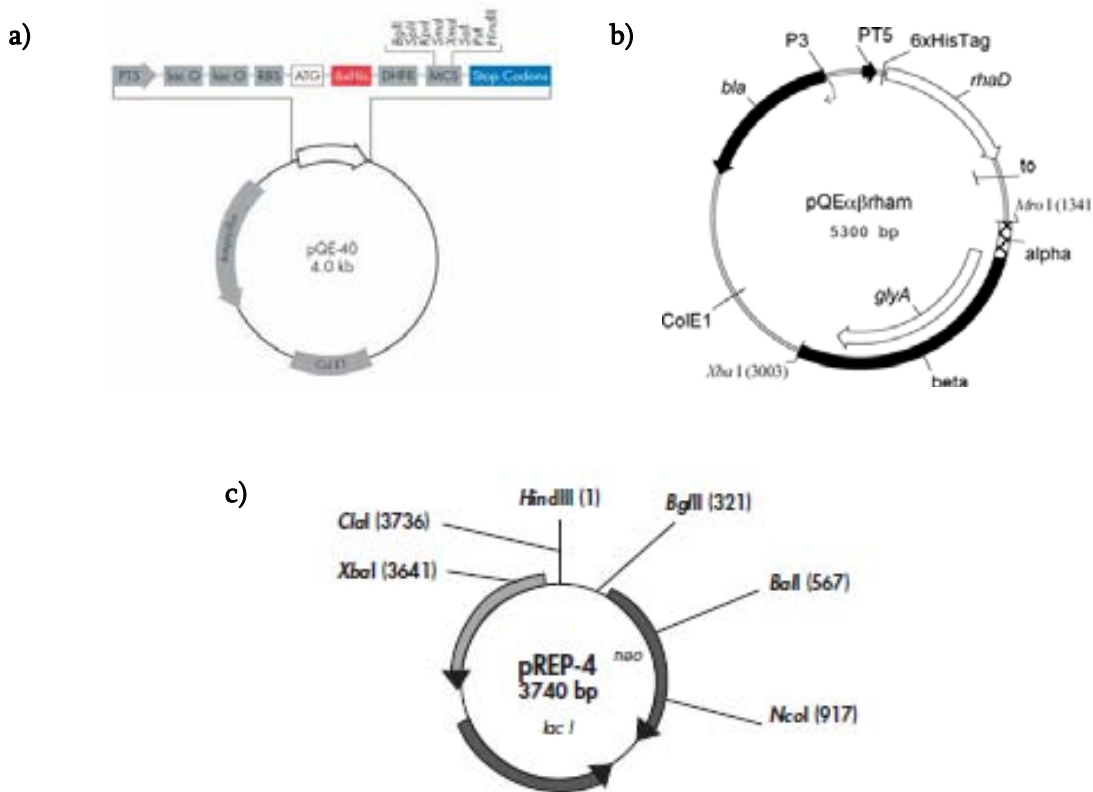
Tanto la ramnulosa 1-fosfato aldolasa (RhuA) como la fuculosa-1-fosfato aldolasa (FucA) recombinantes se expresan en *E. coli* como proteínas de fusión a una cola de 6 histidinas en el extremo N-terminal. La cepa empleada en la sobreexpresión de FucA ha sido la *E. coli* XL1 Blue MRF'/pTrc*fuc* que ha sido cedida por el Dr. García-Junceda. El vector de clonación empleado ha sido pTrcHis C de

Invitrogen (figura 3.7-a) al que se le ha incorporado el gen *fuc* que codifica para FucA (figura 3.7-b) (García-Junceda y col., 1995). La proteína se expresa bajo control del promotor fuerte *trc* inducible por IPTG (Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido). En la sobreexpresión de RhuA se ha empleado la cepa *E. coli* M15 $\Delta$ glyA/pQE $\alpha$  $\beta$ rham auxotrófica para glicina desarrollada con anterioridad en el grupo (Vidal y col., 2008). Se ha empleado el vector de clonación comercial pQE40 de Qiagen (figura 3.8-a) que contiene el promotor fuerte T5 inducible por IPTG al que se le ha incorporado el gen *rham* que codifica para RhuA y el gen *glyA* que codifica para la SHMT bajo control del promotor suave constitutivo P3 (figura 3.8-b). La expresión constitutiva de la enzima SHMT (serina hidroximetil transferasa), que es una enzima involucrada en la síntesis celular de glicina, permite el crecimiento de las células recombinantes en un medio definido en ausencia de glicina, evitando el empleo de antibióticos como presión selectiva. Esta cepa contiene un segundo plásmido, el pREP4 de Qiagen (figura 3.8-c) que contiene el gen *lacI* que codifica para la proteína represora del operón *lac* para evitar la expresión de RhuA en ausencia de inductor.

La producción de fuculosa-1-fosfato aldolasa y ramnulosa-1-fosfato aldolasa se ha realizado en un fermentador BiostatB (Braun Biotech Inst.) mediante operación en discontinuo alimentado y implementando una estrategia de adición exponencial pre-programada para mantener constante la velocidad específica de crecimiento. Una vez alcanzada una elevada densidad celular, se indujo la expresión de la proteína mediante IPTG (Durany y col., 2005; Pinsach y col., 2006).



**Figura 3.7.** Sistema de expresión de fuculosa-1-fosfato aldolasa en la cepa *E. coli* XL1 Blue MRF/pTrcfuc: (a) plásmido comercial pTrcHis (Invitrogen) y (b) plásmido pTrcfuc (extraído de García-Junceda y col., 1995).



**Figura 3.8.** Sistema de expresión de ramnulosa-1-fosfato aldolasa en la cepa *E. coli* M15ΔglyA/pQEαβrham: (a) plásmido comercial pQE-40 (Qiagen); (b) plásmido pQEαβrham (extraído de Vidal y col., 2008) y (c) plásmido comercial pREP-4 (Qiagen).

### 3.3.2. Purificación mediante cromatografía IMAC

El motivo por el que estas aldolasas se expresan como proteína de fusión a una cola de 6 histidinas es para facilitar su purificación posterior por cromatografía IMAC (*immobilized metal affinity chromatography*). Esta técnica de purificación de enzimas se basa en la capacidad del anillo de imidazol de los residuos de histidina de asociarse a la esfera de coordinación de ciertos átomos metálicos que se encuentran inmovilizados en la matriz de la columna cromatográfica. La recuperación de la enzima recombinante se realiza mediante elución a alta concentración de imidazol.

El caldo de cultivo se centrifuga (Beckman J2-21, 17700×g, 35 minutos, 4°C), se descarta el sobrenadante obtenido y la masa celular se resuspende en tampón de lisis (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol, pH 8,0). A continuación, se lleva a cabo la disrupción celular por ultrasonificación en 25 ciclos de 15 segundos cada uno, con 15 segundos de espera entre ciclos para evitar un calentamiento excesivo de la muestra y una posible desnaturalización de la enzima. Los restos celulares se separan del lisado mediante centrifugación (Beckman J2-21, 17700×g, 35 minutos, 4°C) y el sobrenadante se carga en una columna cromatográfica (Amersham Biosciences XK 50/20) que contiene 200 mL de resina de afinidad metálica IDA (GE Healthcare, 17-0575-02) cargada con níquel, en el caso de purificación de FucA y con cobalto en el caso de RhuA. La carga se realiza mediante un sistema FPLC (*fast protein liquid chromatography*) que consiste en bombas peristálticas (Pharmacia LKB.Pump P-500), detector UV a 280 nm (Pharmacia Monitor UV-M) y colector de fracciones (Amersham Biosciences Frac-200). La columna posee una camisa refrigerante que permite realizar la cromatografía a 4°C. Tras la carga del lisado celular se realizan varios lavados con tampón de lisis para eliminar los restos de otras proteínas y se procede a la elución de la aldolasa recombinante mediante tampón de elución (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM

NaCl, 300 mM imidazol, pH 8,0). Se juntan las fracciones de elución que contengan la proteína. En el caso de FucA, estas fracciones se incuban durante 30 minutos en una disolución 10 mM ZnSO<sub>4</sub> para recuperar parte de la actividad enzimática que se pierde en el paso por la columna. En el caso de RhuA, no se realiza este paso de incubación ya que se ha visto que no produce un aumento significativo de la actividad. A continuación, se añaden 0,4 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> por mL de solución enzimática para provocar la precipitación de la enzima, se centrifuga (Beckman J2-21, 17700×g, 35 minutos, 4°C), se descarta el sobrenadante y se resuspende el precipitado enzimático en una disolución 400 g/L de sulfato amónico. La suspensión de enzima precipitada se conserva a 4°C.

Dado que el soporte de afinidad empleado en la purificación es suministrado comercialmente exento de metal, se debe cargar con el metal de interés. La columna cargada con el soporte se lava con 3 volúmenes de agua mili-Q y se hacen pasar 3 volúmenes de una disolución 0,2M NiSO<sub>4</sub> pH 6-7, en el caso de carga con níquel, o bien una disolución 0,2M CoCl<sub>2</sub> pH 4,7 para la carga con cobalto empleando un flujo de 1 mL/min. A continuación, la columna se lava con 5 volúmenes de agua mili-Q y se equilibra con una disolución 20% v/v de etanol para su conservación. El flujo empleado es 1 mL/min.

### **3.4. Inmovilización de aldolasas recombinantes**

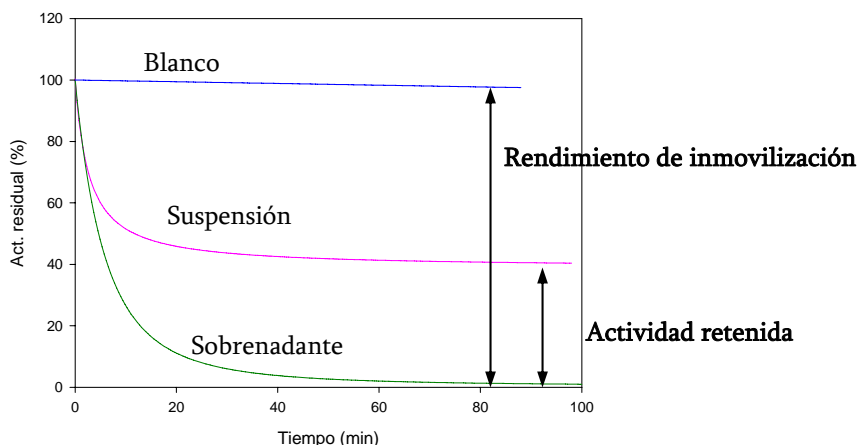
La enzima ramnulosa-1-fosfato aldolasa recombinante se ha inmovilizado en soportes de afinidad a metales y nanopartículas de oro. Sobre soportes de afinidad a metales también se ha inmovilizado la enzima fuculosa-1-fosfato aldolasa recombinante.



En la figura 3.9 se muestra el perfil típico del transcurso de una inmovilización, en la que se representa la evolución de la actividad del sobrenadante, de la suspensión y del blanco. La suspensión se refiere a una alícuota homogénea del sistema y comprende la actividad inmovilizada en el soporte y la actividad del sobrenadante mientras que el blanco corresponde a una disolución de enzima en ausencia de soporte e incubada en las mismas condiciones de inmovilización. La actividad enzimática residual está expresada como porcentaje de la actividad ofrecida inicialmente. La diferencia entre la actividad del blanco y la actividad del sobrenadante representa la actividad que ha desaparecido de la disolución enzimática y, por tanto, la enzima que se encuentra inmovilizada en el soporte. Esta diferencia se denomina rendimiento de inmovilización (ecuación 3.1). La diferencia entre la actividad de la suspensión (sobrenadante y soporte) y la actividad del sobrenadante corresponde, por tanto, a la actividad retenida en el soporte (ecuación 3.2). Si no existieran pérdidas de actividad durante la inmovilización, toda la actividad ofrecida (100%) se repartiría entre el soporte y el sobrenadante y los perfiles de actividad del blanco y la suspensión serían equivalentes. En caso contrario, la diferencia entre la actividad del blanco y la de la suspensión representa las pérdidas de actividad derivadas del proceso de inmovilización.

$$\text{Rdto. inmov. (\%)} = \frac{\text{Blanco} - \text{Sn}}{\text{Act. inic}} \cdot 100 = \% \text{ Blanco} - \% \text{ Sn} \quad (3.1)$$

$$\text{Act. retenida (\%)} = \frac{\text{Susp} - \text{Sn}}{\text{Act. inic}} \cdot 100 = \% \text{ Susp} - \% \text{ Sn} \quad (3.2)$$



**Figura 3.9.** Transcurso de la inmovilización enzimática y cálculo del rendimiento de inmovilización y la actividad retenida.

### 3.4.1. Inmovilización en soportes de afinidad a metales

Las inmovilizaciones de fuculosa-1-fosfato aldolasa purificada sobre diferentes soportes de afinidad (apartado 5.2) y de ramnulosa-1-fosfato aldolasa purificada sobre soporte Co-IDA (apartados 5.3 y 7.3.2) se llevaron a cabo del siguiente modo. Se preparó una disolución enzimática de la aldolasa correspondiente centrifugando la enzima precipitada (Heraeus Pico-21, 18800×g, 3 minutos, 4°C) y disolviendo el precipitado en tampón de lisis (50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM NaCl, 20 mM imidazol, pH 8,0). Se añade una alícuota de esta disolución a volumen conocido de soporte en una proporción 1:10 (volumen de soporte frente volumen total) y se mantiene el sistema bajo agitación horizontal a la temperatura correspondiente (4°C o 24°C). El resto de la disolución enzimática se mantiene en las mismas condiciones de temperatura y agitación que la mezcla de inmovilización para actuar como blanco. Se analizan la actividad del blanco, de la suspensión y del sobrenadante (dejando sedimentar el soporte durante aproximadamente 3 minutos) a lo largo del tiempo de inmovilización hasta que se alcanza el equilibrio.

En el caso de emplear enzima proveniente de un lisado celular (apartados 5.2.4.1 y 5.3) se pesó una cantidad de soporte y se añadió el volumen de lisado de actividad conocida, obtenido según el procedimiento indicado en el apartado 3.3.2, que aporta las unidades de actividad que correspondan y se añadió tampón de lisis hasta una proporción 1:10 entre el volumen de soporte y el volumen total. La inmovilización transcurrió siguiendo el procedimiento indicado anteriormente.

Los soportes de afinidad a metales empleados para la inmovilización de las aldolasas recombinantes han sido soportes de agarosa funcionalizada con ácido iminodiacético, IDA (GE Healthcare, 17-0575-02; Hispanagar, 6 BCL-QCo, BCL-QCu, BCL-qCu, BCL-QNi, BCL-qNi, BCL-QZn, BCL-qZn) y ácido nitrilotriacético, NTA (Qiagen, 30410) como agentes quelantes del metal inmovilizado en la columna. FucA se ha inmovilizado en soportes IDA cargados con  $\text{Ni}^{+2}$ ,  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$  y  $\text{Cu}^{+2}$  y en soportes NTA con  $\text{Ni}^{+2}$  y  $\text{Co}^{+2}$ . RhuA ha sido inmovilizada en soportes IDA cargados con  $\text{Co}^{+2}$ . Dado que los soportes IDA de GE Healthcare y NTA de Qiagen se suministran exentos de metal, la carga de metal de estos soportes, previamente lavados en 3 volúmenes de agua mili-Q, se realiza mediante incubación durante 12 horas en 3 volúmenes de una disolución 0,2 M  $\text{NiSO}_4$  pH 6-7, en el caso de carga con níquel, o 0,2 M  $\text{CoCl}_2$  pH 4,7 para la carga con cobalto. Tras la incubación, el soporte se lava con 5 volúmenes de agua mili-Q y se guarda a 4°C suspendido en una disolución 20% etanol.

La rotura mecánica del soporte para la inmovilización de FucA en el apartado 5.2.5 se llevó a cabo mediante trituración en mortero hasta que se obtuvo un polvo fino.

La determinación de la carga enzimática máxima del soporte Co-IDA con FucA en discontinuo (apartado 5.2.6) se llevó a cabo añadiendo 19,5 mL de un lisado celular de 42,5 UA/mL a 0,5 mL de soporte, siguiendo el procedimiento de

inmovilización anteriormente indicado. A continuación, el medio de inmovilización se filtró a vacío (10-16  $\mu\text{m}$ ), se realizó un lavado con 3 volúmenes de agua mili-Q, se pesaron 0,4 mL de soporte y se añadieron 7,2 mL de lisado de 38,7 UA/mL, procediendo la inmovilización del mismo modo que anteriormente.

La determinación de la carga enzimática máxima del soporte Co-IDA con FucA y con RhuA en columna (apartados 5.2.6 y 5.3.1) se realizó en un sistema FPLC (*fast protein liquid chromatography*) que consiste en bombas peristálticas (Pharmacia LKB.Pump P-500), detector UV a 280 nm (Pharmacia Monitor UV-M), colector de fracciones (Amersham Biosciences Frac-200) y columna cromatográfica (Amersham Biosciences XK 50/20). La columna cromatográfica que contiene 0,6 mL de Co-IDA (GE Healthcare, 17-0575-02) se estabiliza previamente con tampón de lisis (50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM NaCl, 20 mM imidazol, pH 8,0) y se carga con una disolución concentrada de la aldolasa purificada. Las fracciones se recogen y se determina la cantidad de proteína y la actividad enzimática hasta que la enzima detectada representa un 90% de la concentración inicial, momento en que se considera que se ha alcanzado la saturación total del soporte. Para eliminar la enzima unida únicamente por interacciones débiles, se realizó un lavado posterior con tampón de lisis y se analizó la actividad y proteína de estos lavados. Estableciendo un balance de materia considerando la enzima cargada y la que se ha desorbido en los lavados se puede obtener indirectamente la enzima retenida en el soporte, que corresponde a la carga enzimática máxima que admiten estos soportes.

### 3.4.2. Inmovilización en nanopartículas de oro

La síntesis de nanopartículas de oro de 55 nm se realiza en dos etapas: en primer lugar se sintetizan nanopartículas de pequeño tamaño (10 nm) y

posteriormente estas partículas se hacen crecer hasta alcanzar el tamaño deseado (Comenge, 2009). La síntesis inicial se realiza mediante inyección de 1 mL de una disolución acuosa 25 mM HAuCl<sub>4</sub> en 150 mL de una disolución 2,2 mM citrato sódico en ebullición y dejando reaccionar la mezcla hasta que la disolución adquiere un color rojo oscuro (aproximadamente 3 minutos). Para realizar el crecimiento de las nanopartículas se diluyen 30 mL de la suspensión anterior en 150 mL de 2,2 mM citrato sódico, se calienta la mezcla hasta 90°C y se inyecta 1 mL de 25 mM HAuCl<sub>4</sub>, dejando reaccionar hasta que no se observa crecimiento de las partículas mediante medida del espectro UV-Visible (Shimadzu UV-2401PC UV-Vis-NIR). El protocolo de crecimiento se repite tres veces más, sucesivamente, hasta obtener el tamaño de partícula deseado.

Las inmobilizaciones del apartado 6.2 para la determinación de la saturación de la superficie de las nanopartículas se llevó a cabo añadiendo 50 µL de una disolución de RhuA de concentración conocida a 1 mL de una suspensión de nanopartículas de oro (AuNP) en 2,2 mM citrato sódico, pH 6,7 de concentración  $5,72 \cdot 10^{10}$  AuNP/mL. La disolución de RhuA añadida se preparó mediante diluciones con tampón citrato de una disolución de RhuA 0,5 mg/mL en 2,2 mM citrato sódico, pH 6,7. Tras 2 horas de incubación a 4°C y agitación horizontal se tomaron muestras para análisis del espectro UV-Visible (Shimadzu UV-2401PC UV-Vis-NIR), dispersión dinámica de luz DLS (Malvern instruments Nano-ZS90) y microscopía de transmisión de electrones TEM (JEOL 1010) realizando una tinción con acetato de uranilo.

La inmobilización de RhuA sobre nanopartículas de oro empleada en la preparación de derivados inmobilizados de aplicación en biocatálisis (apartado 6.2) se llevó a cabo añadiendo 1,5 mL de una disolución de RhuA en agua mili-Q de actividad enzimática 2,3 UA/mL a 39 mL de una suspensión de nanopartículas de oro

(AuNP) en 2,2 mM citrato sódico, pH 6,7 de concentración  $5,72 \cdot 10^{10}$  AuNP/mL. La mezcla de inmovilización se mantiene a 4°C y agitación horizontal durante 2,5 horas así como un blanco de enzima disuelta en 2,2 mM citrato sódico, pH 6,7 en la misma concentración que durante la inmovilización. Se analiza la actividad enzimática del blanco, la suspensión y el sobrenadante a lo largo del tiempo, así como la cantidad de proteína en el sobrenadante al final del proceso. Las medidas del sobrenadante se realizan tras centrifugación (Heraeus Pico-21, 18800×g, 3 minutos, 4°C) de una muestra de 50 µl de suspensión. Tras 2,5 horas de inmovilización se centrifugan (Beckman J2-21, 11700×g, 10 minutos, 4°C) en alícuotas de 10 mL, quedando una suspensión concentrada de derivado inmovilizado listo para su utilización inmediata como biocatalizador.

### **3.5. Estabilidad enzimática de aldolasas recombinantes**

#### **3.5.1. Estabilidad en medio acuoso con dimetilformamida como cosolvente**

Para realizar el estudio de la estabilidad de los derivados inmovilizados de FucA sobre soportes Ni-IDA y Co-IDA (apartado 5.2.4.2) se incubaron 0,25 mL del derivado inmovilizado de actividad enzimática 7,0 y 8,5 UA/mL de soporte respectivamente en 2 mL del medio de reacción (50 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 20% v/v DMF, pH 7,0) a 4°C y 24°C y bajo agitación horizontal durante un tiempo de entre 10 y 20 días. Se analizó la actividad enzimática de la suspensión a lo largo del tiempo así como la actividad enzimática del sobrenadante para determinar la posible desorción de la enzima. La estabilidad de la enzima soluble (1 UA/mL) se preparó centrifugando 0,35 mL de suspensión de FucA precipitada (Heraeus Pico-21,

18800×g, 3 minutos, 4°C) y disolviendo el precipitado en 5 mL del medio de reacción correspondiente.

Para realizar el estudio de la estabilidad de los derivados inmovilizados de RhuA sobre el soporte Co-IDA (apartado 5.3.2) se incubaron 0,25 mL de un derivado inmovilizado de 6,7 UA/mL de soporte en 2,5 mL del medio de reacción (50 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 20% v/v DMF, pH 7,0) a 4°C y 25°C y bajo agitación horizontal durante un tiempo de entre 10 y 20 días. Se analizó la actividad enzimática de la suspensión a lo largo del tiempo así como la actividad enzimática del sobrenadante para determinar la posible desorción de la enzima. La estabilidad de la enzima soluble (1 UA/mL) se preparó centrifugando 0,7 mL de suspensión de RhuA precipitada (Heraeus Pico-21, 18800×g, 3 minutos, 4°C) y disolviendo el precipitado en 5 mL del medio de reacción correspondiente.

Para realizar el estudio de la estabilidad de los derivados inmovilizados de RhuA sobre nanopartículas de oro (apartado 6.3) se incubó el derivado inmovilizado proveniente de la centrifugación (Beckman J2-21, 11700×g, 10 minutos, 4°C) de 10 mL de medio de inmovilización (apartado 3.4.2) en un volumen total de 0,4 mL de medio de reacción (50 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 20% v/v DMF, pH 7,0). Se toman muestras de la suspensión para determinar su actividad enzimática. Las medidas de actividad y proteína del sobrenadante se realizaron tras centrifugación (Heraeus Pico-21, 18800×g, 3 minutos, 4°C) de una muestra de 50 µl de suspensión.

### 3.5.2. Estabilidad en medio acuoso con [BMIM][BF<sub>4</sub>] como cosolvente

La estabilidad de RhuA purificada en mezclas de [BMIM][BF<sub>4</sub>] (Merck, 4.91049) al 0%, 15%, 50%, 75% y 85% v/v en tampón fosfato (80 mM

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4) estudiadas en el apartado 7.2.2 se llevó a cabo centrifugando 0,5 mL de suspensión de RhuA precipitada (Heraeus Pico-21, 18800×g, 3 minutos, 4°C) y disolviendo el precipitado en 2,5 mL del medio correspondiente para obtener una disolución 1 UA/mL. La mezcla se incubó a 4°C bajo agitación horizontal y se tomaron muestras para determinar su actividad enzimática. Para preparar el medio de reacción se pesó la cantidad de [BMIM][BF<sub>4</sub>] correspondiente (densidad 1,2 g/mL) y se añadió a la solución acuosa hasta alcanzar la concentración final deseada.

### **3.6. Reacciones catalizadas por aldolasas recombinantes**

#### **3.6.1. Degradación enzimática de dihidroxiacetona fosfato**

Para realizar la determinación de los parámetros cinéticos de la degradación enzimática de dihidroxiacetona fosfato (DHAP) catalizada por ramnulosa-1-fosfato aldolasa (apartado 4.2.1) se disolvió la sal de dilitio de DHAP (Fluka, 37440) en disolución acuosa y se añadieron 0,5 mL de dimetilformamida (DMF) para obtener un volumen final de 2,5 mL en un medio 50 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 20% v/v DMF, pH 7,0. Se añadieron las unidades de actividad de ramnulosa-1-fosfato aldolasa correspondientes y se incubó a 4°C y agitación horizontal. Se tomaron muestras periódicamente para la determinación de la concentración de DHAP en el medio. Las concentraciones iniciales de DHAP y las unidades de actividad empleadas fueron: 3 UA/mL de RhuA en experimentos a una concentración inicial de 12,5, 40,5 y 62,7 mM de DHAP y 4,3 UA/mL de RhuA en experimentos a 38,2, 63,7, 65,1, 129 y 133 mM de concentración de DHAP inicial.



Para realizar el estudio de la degradación enzimática de dihidroxiacetona fosfato (DHAP) catalizada por RhuA en mezclas 15% v/v [BMIM][BF<sub>4</sub>] (Merck, 4.91049) en 80 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, pH 7,4 (apartado 7.2.4) se disolvió la sal de dilitio de DHAP (Fluka, 37440) en 2,5 mL de medio de reacción y se disolvió la enzima para obtener una concentración inicial de DHAP de 41 mM y una actividad enzimática de 3 UA/mL. La mezcla se incubó a 4°C bajo agitación horizontal, tomando muestras periódicamente para analizar su contenido en DHAP.

### 3.6.2. Adición aldólica de dihidroxiacetona fosfato y (S)-Cbz-alaninal

#### *3.6.2.1. Adición aldólica en medio acuoso con dimetilformamida como cosolvente*

##### 3.6.2.1.1. Aldolasas solubles

Para realizar la determinación de los parámetros cinéticos de la adición aldólica entre dihidroxiacetona fosfato y (S)-Cbz-alaninal catalizada por ramnulosa-1-fosfato aldolasa (apartado 4.3.1) se disolvió la sal de dilitio de DHAP (Fluka, 37440) en disolución acuosa y se añadió a (S)-Cbz-alaninal (Sunshine Chemlab, SC-O01-0046) disuelto en 0,5 mL de dimetilformamida (DMF) para obtener un volumen final de 2,5 mL en un medio 50 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 20% v/v DMF, pH 7,0. Se añadieron las unidades de actividad de ramnulosa-1-fosfato aldolasa correspondientes y se incubó a 4°C y agitación horizontal. Se tomaron muestras periódicamente para la determinación de la concentración de DHAP, (S)-Cbz-alaninal y producto de adición en el medio. Las concentraciones iniciales de DHAP y (S)-Cbz-alaninal y las unidades de actividad empleadas se indican en la tabla 3.1.

**Tabla 3.1.** Concentración inicial de dihidroxiacetona fosfato ( $A_0$ ) y (S)-Cbz-alaninal ( $B_0$ ) y actividad enzimática ofrecida ( $E_0$ ) en los experimentos empleados en la determinación de los parámetros cinéticos de la adición aldólica catalizada por ramnulosa-1-fosfato aldolasa a 4°C en medio medio 50 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 20% v/v DMF, pH 7,0.

	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)	(g)
$A_0$ (mM)	42,3	13,2	12,8	13,3	21,9	30,8	35,0
$B_0$ (mM)	47,0	27,2	35,4	45,9	14,4	33,0	39,7
$E_0$ (UA/mL)	3	2	2	2	2	2	2

El protocolo anteriormente indicado también se utilizó en la adición aldólica catalizada por RhuA soluble y FucA soluble en medio acuoso con DMF como cosolvente empleadas como comparación en la biocatálisis con enzima inmovilizada en afinidad (apartados 5.2.4.3 y 5.3.3), con RhuA inmovilizada en nanopartículas (apartado 6.4) y con RhuA soluble en [BMIM][BF<sub>4</sub>] al 15% v/v (apartado 7.2.4).

#### 3.6.2.1.2. Aldolasas inmovilizadas en soportes de afinidad metálica

Para realizar el estudio de la biocatálisis de la adición aldólica entre DHAP y (S)-Cbz-alaninal empleando FucA recombinante inmovilizada en soportes Ni-IDA y Co-IDA (apartado 5.2.4.3), 14 mg de sal de dilitio de DHAP (Fluka, 37440) se disolvieron en un tampón Tris-HCl con KCl y se añadieron 28 mg de (S)-Cbz-alaninal sintetizado disuelto en 0,5 mL de dimetilformamida (DMF). Se pesaron (densidad 1,04 g/mL) 0,31 mL de derivado inmovilizado en Ni-IDA (14,2 UA/mL soporte) y 0,45 mL de Co-IDA (16,5 UA/mL soporte) y se añadieron al medio obteniendo un volumen final de 2,5 mL y una concentración final de 50 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 20% v/v DMF, pH 7,0. El medio de reacción se incubó a 4°C o 24°C bajo agitación horizontal. Se tomaron muestras periódicamente para la determinación de la concentración de DHAP, (S)-Cbz-alaninal y producto de adición en el sobrenadante, tras dejar decantar el soporte.

La adición aldólica catalizada por RhuA inmovilizada en soporte Co-IDA estudiada en el apartado 5.3.3 y el estudio de las limitaciones difusionales que presentan estos derivados inmovilizados (apartado 5.3.1) se llevaron a cabo siguiendo el procedimiento indicado anteriormente. Las concentraciones iniciales de los reactivos empleadas fueron 31 mM DHAP y 47 mM (S)-Cbz-alaninal y se pesaron 0,31 mL de soporte de actividad 12,3, 23,4 y 34,1 UA/mL de soporte.

#### 3.6.2.1.3. Ramnulosa-1-fosfato aldolasa inmovilizada en nanopartículas de oro

Para realizar el estudio de la biocatálisis de la adición aldólica entre dihidroxiacetona fosfato y (S)-Cbz-alaninal empleando ramnulosa-1-fosfato aldolasa inmovilizada en nanopartículas de oro (apartado 6.4), se disolvieron 5,5 mg de sal de dilitio de DHAP (Fluka, 37440) en un tampón Tris-HCl con KCl y se añadió a 6,7 mg de (S)-Cbz-alaninal (Sunshine Chemlab, SC-O01-0046) disuelto en 0,2 mL de dimetilformamida (DMF). Se añadió el derivado inmovilizado proveniente de la centrifugación (Beckman J2-21, 11700×g, 10 minutos, 4°C) de 25 mL de medio de inmovilización (apartado 3.4.2) para obtener un volumen total de 1 mL de medio de reacción (50 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 20% v/v DMF, pH 7,0). La concentración inicial de reactivos fue de 31,1 mM de DHAP y 30,1 mM de (S)-Cbz-alaninal. Para determinar la actividad inicial de la reacción se centrifugaron 10 mL del medio de inmovilización (Beckman J2-21, 11700×g, 10 minutos, 4°C), se resuspendió el derivado inmovilizado en un volumen total de 0,4 mL de medio de reacción (50 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 20% v/v DMF, pH 7,0) y se analizó la actividad inicial de la suspensión. Las muestras de reacción (50 µL) se diluyen en metanol 1:4, se centrifugan (Heraeus Pico-21, 18800×g, 2 minutos, 4°C) y se determina la concentración de DHAP, (S)-Cbz-alaninal y producto de adición

Para realizar el estudio de la biocatálisis con RhuA inmovilizada en nanopartículas de oro en un segundo ciclo de reacción (apartado 6.4), se centrifugó el medio de reacción tras 19 horas de incubación (Heraeus Pico-21, 11700×g, 3 minutos, 4°C) y la suspensión concentrada del biocatalizador se añadió a un medio de reacción (50 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 20% v/v DMF, pH 7,0) que contiene DHAP (29,6 mM) y (S)-Cbz-alaninal (32,0 mM) hasta un volumen total de 0,65 mL. Para determinar la actividad inicial se centrifugó (Heraeus Pico-21, 11700×g, 3 minutos, 4°C) la suspensión empleada anteriormente en la determinación de la actividad inicial del primer ciclo de reacción y que se había mantenido en las mismas condiciones de reacción, se resuspendió el derivado inmovilizado en medio de reacción hasta un volumen total de 0,2 mL y se midió la actividad de la suspensión.

### *3.6.2.2. Adición aldólica en medio acuoso con [BMIM][BF<sub>4</sub>] como cosolvente*

Para determinar la solubilidad del (S)-Cbz-alaninal en medio [BMIM][BF<sub>4</sub>] (Merck, 4.91049) al 15% v/v en 80 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, pH 7,4 (apartado 7.2.3) se preparó una solución 275mM de (S)-Cbz-alaninal (Sunshine Chemlab, SC-O01-0046) en [BMIM][BF<sub>4</sub>] al 15% en tampón Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 80 mM, pH 7,4 y se realizaron diversas diluciones con el mismo medio hasta observar la completa disolución del compuesto.

Para realizar el estudio de la adición aldólica entre dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y (S)-Cbz-alaninal catalizada por RhuA en mezclas 15% v/v [BMIM][BF<sub>4</sub>] (Merck, 4.91049) en 80 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, pH 7,4 (apartado 7.2.4) se disolvió la sal de dilitio de DHAP (Fluka, 37440) y (S)-Cbz-alaninal (Sunshine Chemlab, SC-O01-0046) en 2,5 mL de medio de reacción y se añadió RhuA precipitada para obtener una concentración inicial de DHAP de 41 mM, (S)-cbz-alaninal 16,5 mM y una actividad enzimática de 3 UA/mL. La mezcla se incubó a

4°C bajo agitación horizontal, tomando muestras periódicamente para analizar su contenido en DHAP.

### *3.6.2.3. Adición aldólica en reactor de membrana*

El reactor de membrana para biotransformaciones (MBB) consta de una membrana de silicona tubular de 3 mm de diámetro interno y 0,25 mm de espesor enrollada alrededor de una estructura metálica con un volumen de biorreactor de 4,4 mL (figura 7.8). La membrana está sumergida en la fase orgánica que se encuentra bajo agitación magnética. Por el interior de la membrana se hace circular la fase acuosa en recirculación mediante una bomba peristáltica, manteniéndose también bajo agitación magnética. Todo el montaje se encuentra en una cámara termostatzada a 4°C.

Para calcular el volumen de la membrana hinchada (apartado 7.3.1) se incubó un trozo de membrana de dimensiones conocidas en el disolvente a 4°C durante 24 horas. Tras la incubación se midieron las dimensiones de la membrana hinchada y se calculó su volumen. La diferencia de volumen respecto del volumen de la membrana inicial, corresponde al porcentaje de disolvente presente en membrana hinchada

Para determinar el coeficiente de reparto de DHAP y (S)-Cbz-alaninal en medio bifásico acetato de etilo:H<sub>2</sub>O (apartado 7.3.1) se pesaron 2,1 mg de DHAP y 1,8 mg de (S)-Cbz-alaninal se añadieron por separado a un sistema bifásico acetato de etilo:H<sub>2</sub>O con 1 mL de cada fase a 4°C. Los dos sistemas se incubaron a 4°C con agitación horizontal durante 24 horas y se analizaron ambas fases para la determinación de la concentración de DHAP y (S)-Cbz-alaninal según el caso.

Para llevar a cabo la adición aldólica entre DHAP y (S)-Cbz-alaninal catalizada por RhuA inmovilizada en Co-IDA en el biorreactor MBB (apartado 7.3.2)

se disolvieron 0,91 g de DHAP en 50 mL de H<sub>2</sub>O mili-Q y 1,04 g de (S)-Cbz-alaninal en 50 mL de acetato de etilo y se introdujeron en el biorreactor con un caudal de la fase acuosa de 17,6 mL/min. El sistema se dejó estabilizar durante 2 días tras lo que se añadieron 1,2 mL del derivado inmovilizado (137 UA/mL de soporte) en la fase orgánica del sistema, se ajustó la velocidad de agitación y se tomaron muestras periódicas de ambas fases para la determinación de DHAP, (S)-Cbz-alaninal y producto de adición.

### 3.6.3. Software empleado en la determinación de parámetros cinéticos

En la determinación de los parámetros cinéticos de la adición aldólica entre dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y (S)-Cbz-alaninal y la degradación enzimática de DHAP catalizadas por ramnulosa-1-fosfato aldolasa a 4°C en medio 50 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 20% v/v DMF, pH 7,0 (capítulo 4) se empleó el software gPROMS (acrónimo de *General Process Modelling System*) de la casa comercial Process Systems Enterprise. Este software es un sistema de modelización de proceso general para la simulación, optimización y estimación de parámetros cinéticos en procesos complejos. La determinación de los parámetros cinéticos del modelo se realiza mediante la minimización de la función objetivo (ecuación 3.3) que tiene en cuenta la suma de los errores al cuadrado entre el dato experimental y el predicho por el modelo en todas las medidas y la varianza de cada variable. El programa lleva implementado tres tipos de modelos de varianza: constante, constante relativa y heteroscedástica. El criterio de convergencia se alcanza cuando se cumple la condición indicada en la ecuación 3.4.

$$\phi = \frac{N}{2} \ln(2\pi) + \frac{1}{2} \min_{\theta} \left\{ \sum_{i=1}^{NE} \sum_{j=1}^{NV_i} \sum_{k=1}^{NM_{ij}} \left[ \ln \sigma_{ijk}^2 + \frac{(\tilde{z}_{ijk} - z_{ijk})^2}{\sigma_{ijk}^2} \right] \right\} \quad (3.3)$$

Donde  $\phi$  es la función objetivo; N, el número total de medidas en todos los experimentos;  $\theta$ , el conjunto de parámetros a estimar; NE, el número de experimentos realizados;  $NV_i$ , el número de variables medidas en el experimento i;  $NM_{ij}$ , el número de medidas de la variable j en el experimento i;  $\sigma_{ijk}^2$ , la varianza de la medida k de la variable j en el experimento i;  $\tilde{z}_{ijk}$ , la medida k predicha por el modelo de la variable j en el experimento i y  $z_{ijk}$ , la medida k de la variable j en el experimento i.

$$\frac{1}{|\phi^*| + 1,0} \left( \left| \sum_j \frac{\partial \phi^*}{\partial \theta_j} \delta \theta_j \right| + \sum_j |\mu_j| \max(0, \theta_j^L - \theta_j^*, \theta_j^* - \theta_j^U) \right) \sum_j \max(0, \theta_j^L - \theta_j^*, \theta_j^* - \theta_j^U) \leq \text{OptTol} \quad (3.4)$$

Donde OptTol es la tolerancia óptima y ha sido fijada en  $10^3$ ;  $\theta_j$ , el parámetro j a estimar;  $\theta_j^*$ , el valor final del parámetro j;  $\theta_j^L$ , el límite inferior impuesto para el parámetro j;  $\theta_j^U$ , el límite superior impuesto para el parámetro j;  $\phi^*$ , el valor final de la función objetivo;  $\delta \theta_j$ , el último paso correspondiente al parámetro j en la última iteración del cálculo de estimación del parámetro y  $\mu_j$ , el multiplicador de Lagrange correspondiente a las restricciones de contorno impuestas al parámetro j.

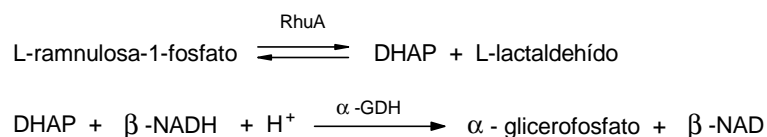
### 3.7. Métodos analíticos

#### 3.7.1. Determinación de la actividad enzimática de aldolasas

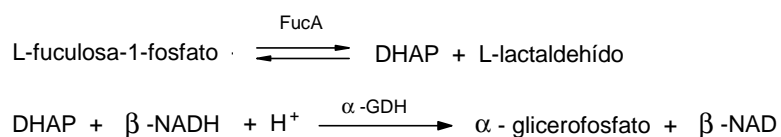
La actividad enzimática de ramnulosa-1-fosfato aldolasa (RhuA) y fuculosa-1-fosfato aldolasa (FucA) se determina mediante técnicas espectrofotométricas analizando la velocidad inicial de la reacción natural de la enzima de un modo indirecto mediante una reacción acoplada a la misma. El método analítico de RhuA se basa en el método de Chiu y Feingold (2002) adaptado por Vidal (2006) mientras que el método de FucA fue adaptado por Durany (2000). El rango analítico de estos métodos es 0,1-1 UA/mL con un error del 6%.

La reacción natural de RhuA consiste en la rotura enzimática reversible de L-ramnulosa-1-fosfato en L-lactaldehído y dihidroxiacetona fosfato (DHAP) (figura

3.10). Por otro lado, la reacción natural de FucA consiste en la rotura enzimática reversible de L-fuculosa-1-fosfato en L-lactaldehído y dihidroxiacetona fosfato (DHAP) (figura 3.11). Para seguir la evolución de estas reacciones, se acopla una segunda reacción enzimática catalizada por  $\alpha$ -glicerol-3-fosfato deshidrogenasa ( $\alpha$ -GDH) en la que la DHAP formada en el paso anterior reacciona con  $\beta$ -NADH produciendo una disminución de la absorbancia a 340 nm por lo que se puede seguir la evolución de esta segunda reacción espectrofotométricamente. Esta reacción acoplada se realiza a elevada actividad de  $\alpha$ -GDH para que se pueda considerar prácticamente instantánea y, por tanto, la velocidad observada corresponda a la velocidad de formación de DHAP a través de la reacción aldolásica cuya actividad se desea determinar.



**Figura 3.10.** Ensayo enzimático para la cuantificación de ramnulosa-1-fosfato aldolasa (RhuA).



**Figura 3.11.** Ensayo enzimático para la cuantificación de fuculosa-1-fosfato aldolasa (FucA).

La determinación de la actividad enzimática de ambas enzimas se realiza a 25°C en una cubeta de cuarzo de 1 mL de volumen en la que se añaden las cantidades de reactivos de ensayo necesarias siguiendo los métodos adaptados por Vidal (2006) en el caso de RhuA y por Durany (2000) en el caso de FucA. Una vez estabilizada la medida de absorbancia a 25°C se añade la muestra enzimática a analizar, se agita por inversión y se monitoriza la disminución de absorbancia a 340 nm durante 5 minutos. En el caso de las muestras de suspensión del proceso de inmovilización en soportes de afinidad, la determinación de la actividad enzimática se realiza en un volumen final



de 2 mL con agitación magnética en la cubeta, manteniendo la misma concentración de reactivos.

Una unidad de actividad enzimática (UA) se define como la cantidad de enzima que cataliza la rotura de 1  $\mu\text{mol}$  del sustrato natural por minuto a 25°C y pH 7,5. Por tanto, la actividad enzimática de la muestra se puede calcular a partir de la disminución de absorbancia observada por minuto mientras la caída es lineal (ecuación 3.5).

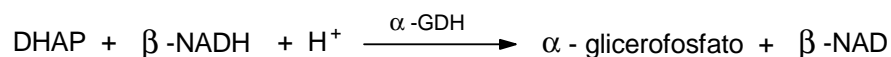
$$\text{Actividad enzimática} \left( \frac{\text{UA}}{\text{mL}} \right) = \frac{\Delta \text{Abs}_{340 \text{ nm}} / \text{min} \cdot V_t \cdot D_f}{\epsilon \cdot L_c \cdot V_m} \quad (3.5)$$

Donde  $\Delta \text{Abs}_{340 \text{ nm}} / \text{min}$  es la variación de la absorbancia a 340 nm por minuto ( $\text{min}^{-1}$ );  $V_t$ , el volumen total en cubeta (1 mL);  $D_f$ , el factor de dilución de la muestra a analizar;  $\epsilon$ , el coeficiente de extinción molar ( $6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ );  $L_c$ , el camino óptico (1 cm) y  $V_m$ , el volumen de muestra (mL).

Para comprobar el efecto de la presencia de nanopartículas de oro, [BMIM][BF<sub>4</sub>] y acetato de etilo sobre el ensayo de actividad, se analizó una disolución enzimática de RhuA de actividad conocida en presencia y en ausencia del compuesto afechor, manteniendo constante la concentración del resto de reactivos del ensayo.

### 3.7.2. Determinación de la concentración de dihidroxiacetona fosfato

La concentración de DHAP se determina mediante reacción con  $\beta$ -NADH catalizada por  $\alpha$ -glicerol-3-fosfato deshidrogenasa ( $\alpha$ -GDH) (figura 3.12). El consumo de  $\beta$ -NADH se obtiene a través de la disminución de absorbancia a 340 nm y se puede relacionar con la cantidad inicial de DHAP en la muestra a analizar.



**Figura 3.12.** Ensayo enzimático para la cuantificación de dihidroxiacetona fosfato (DHAP).

La determinación de la concentración de dihidroxiacetona fosfato se realiza a 25°C en una cubeta de cuarzo de 1 mL de volumen en la que se añaden las cantidades de reactivos de ensayo indicadas en la tabla 3.2.

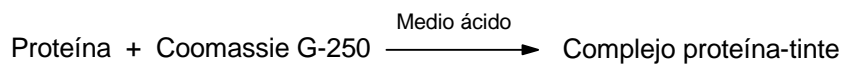
**Tabla 3.2.** Reactivos añadidos inicialmente en la determinación de la concentración de dihidroxiacetona fosfato (DHAP).

<i>Reactivo</i>	<i>V (μL)</i>
100 mM Tris-HCl, pH 7,5	970
20 mM β-NADH	10
Muestra	10

La cubeta se agita por inversión y se mide la absorbancia de la mezcla a 340 nm ( $Abs_1$ ). Se añaden 10 μl de α-glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (50 UA/mL) para iniciar la reacción, se sigue la disminución en la absorbancia de la mezcla y se anota el valor que alcanza al final de la reacción ( $Abs_2$ ). La diferencia entre la absorbancia inicial y final es directamente proporcional a la cantidad de β-NADH consumida en la reacción y se puede relacionar con la cantidad de DHAP existente en la muestra a través de una recta de calibrado (figura A.1). Las muestras de la adición aldólica catalizada por aldolasas solubles se diluyen previamente en metanol en una proporción superior a 1:3 para frenar el progreso de la reacción de adición aldólica.

### 3.7.3. Determinación de la concentración de proteína

La determinación de proteína total se realiza mediante un método colorimétrico basado en una modificación del método Bradford propuesto por la casa comercial Pierce. Este método emplea el reactivo Coomassie® que se une a la proteína en medio ácido provocando un desplazamiento de la absorbancia de 465 nm a 595 nm, lo que provoca un cambio de color de la mezcla de rojo a azul.



**Figura 3.13.** Esquema de la reacción entre Coomassie® y la proteína en la cuantificación de la concentración de proteína mediante el método Bradford.

La determinación de la concentración de proteína se lleva a cabo, en el caso de emplear el rango 100-1500  $\mu\text{g/mL}$ , añadiendo 20  $\mu\text{l}$  de muestra, patrón o blanco a 1 mL de Coomassie®, previamente estabilizado a temperatura ambiente para evitar las interferencias en la medida por cambios en la temperatura, y se mide su absorbancia a 595 nm tras 10 minutos de incubación. En el caso del rango 1-25  $\mu\text{g/mL}$ , se añaden 0,5 mL de muestra, patrón o blanco a 0,5 mL de reactivo y se procede de la misma manera. A la absorbancia de las muestras se resta la absorbancia del blanco y se cuantifica mediante una recta de calibrado realizada a partir de distintos patrones de concentración de proteína conocida, siendo necesario realizar una recta de calibrado para cada serie de medidas. En los experimentos empleados en el capítulo 5, la recta de calibrado se realiza a partir de diluciones de un estándar de albúmina de sérum bobino (BSA) 2000  $\mu\text{g/mL}$  en solución 0,9% salina y 0,05% azida sódica suministrada en el mismo kit comercial empleando como diluyente el mismo tampón de las muestras que se vayan a analizar (figura A.3). En el caso de los experimentos empleados en el capítulo 6, los patrones se realizaron a partir de una disolución de RhuA 1000  $\mu\text{g/mL}$  y realizando las diluciones necesarias con el mismo tampón de las muestras a analizar como diluyente (figura A.4). Para preparar la disolución madre de RhuA, se dializó (Sigma, D 2272) una disolución de RhuA purificada frente agua mili-Q a temperatura ambiente y posteriormente se liofilizó.

### 3.7.4. Determinación del contenido de metal en aldolasas

Para realizar la determinación semicuantitativa del contenido de metal de fuculosa-1-fosfato aldolasa se centrifugaron 1,5 mL de enzima precipitada (Heraeus Pico-21, 18800×g, 3 minutos, 4°C) y se disolvió en 5 mL en tampón 100 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, pH 7,5. Las muestras se acidificaron con HNO<sub>3</sub> concentrado hasta pH 1-2 y se analizaron mediante ICP-OES (*coupled plasma optical emission spectroscopy*) (Perkin-Elmer, Optima 4300 DV).

### 3.7.5. Análisis mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Mediante esta técnica se ha analizado el contenido de (S)-Cbz-alaninal y producto de adición en muestras de reacción de adición aldólica así como el contenido en el azúcar producido en la síntesis de los sustratos naturales de las enzimas empleadas y el contenido de L-lactaldehído en muestras de reacción y el contenido en 1,2-propanodiol en la cuantificación indirecta de L-lactaldehído mediante reducción con borohidruro potásico.

#### *3.7.5.1. Determinación de la concentración de (S)-Cbz-alaninal y del producto de adición*

La determinación de (S)-Cbz-alaninal y del producto de adición se llevó a cabo en un equipo Ultimate 3000 de Dionex con software Chromeleon v. 6.80 y columna X-Bridge C18 5 µm 4,6×250 mm de Waters. Las condiciones cromatográficas fueron: fase móvil A: 0,1% v/v TFA en H<sub>2</sub>O y B: 0,095% v/v TFA en H<sub>2</sub>O:acetonitrilo 1:4 v/v; gradiente de 10% a 60% B en 25 minutos; flujo 1 mL/min; temperatura 30°C,

detección 215 nm; volumen de inyección 30  $\mu$ L. Las muestras de reacción se diluyeron en metanol y se centrifugaron (Heraeus Pico-21, 18800 $\times$ g, 1 min, 4°C) antes del análisis. Previamente se ha comprobado la solubilidad de los medios de reacción empleados en las fases móviles en una concentración 10% y 100% B.

La cuantificación se realiza mediante rectas de calibrado a partir de patrones de (S)-Cbz-alaninal concentración conocida (figura A.2). Dado que el grupo que otorga una mayor absorbancia al compuesto a la longitud de onda del ensayo es el grupo protector Cbz, y este grupo también se encuentra presente en el producto de adición, se ha empleado esta recta de calibrado en la cuantificación del producto.

#### *3.7.5.2. Determinación de la concentración de ramnulosa-1-fosfato y fuculosa-1-fosfato*

La determinación de ramnulosa-1-fosfato y fuculosa-1-fosfato se llevó a cabo en un equipo Waters LC Module I plus con detector de IR Waters 2410 acoplado a PC con software Millennium<sup>32</sup> v. 3.05.01 con una columna C18 Lichrosphere 100-18 5  $\mu$ m 4 $\times$ 250 mm de Merck. Las condiciones cromatográficas fueron: fase móvil 0,66% v/v TFA en agua mili-Q ajustado con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a pH 2,0; flujo 0,6 mL/min; temperatura 30°C; detector de índice de refracción; volumen de inyección 20  $\mu$ L. Las muestras de reacción se diluyeron 1:3 en fase móvil, se centrifugaron y se filtraron a través de filtros de membrana de 0,45  $\mu$ m de tamaño de poro.

#### *3.7.5.3. Determinación de la concentración de L-lactaldehído*

La determinación cualitativa de L-lactaldehído se llevó a cabo en un equipo Waters LC Module I plus con detector de IR Waters 2410 acoplado a PC con software Millennium<sup>32</sup> v. 3.05.01 con una columna Aminex HPX-87H de BioRad. Las condiciones cromatográficas fueron: fase móvil 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en agua mili-Q; flujo

0,6 mL/min; detector de índice de refracción; volumen de inyección 20  $\mu$ L. Las muestras de reacción se diluyeron 1:3 en fase móvil, se centrifugaron y se filtraron a través de filtros de membrana de 0,45  $\mu$ m de tamaño de poro.

#### *3.7.5.4. Determinación de la concentración de 1,2-propanodiol*

La cuantificación del L-lactaldehído obtenido se realiza de forma indirecta mediante reducción a 1,2-propanodiol empleando borohidruro potásico ( $\text{KBH}_4$ ) como agente reductor y la posterior cuantificación del 1,2-propanodiol formado mediante análisis en HPLC.

La reducción del L-lactadehído se llevó a cabo añadiendo a una muestra de 2 mL del medio de reacción la cantidad de  $\text{KBH}_4$  necesaria estequiométricamente para reducir completamente el L-lactaldehído suponiendo un rendimiento de la síntesis del 100%. La disolución se incubó a temperatura ambiente bajo agitación magnética durante 3 horas. El 1,2-propanodiol formado se cuantifica mediante HPLC y corresponde al L-lactaldehído inicialmente presente en la muestra.

La determinación de 1,2-propanodiol se llevó a cabo en un equipo Waters LC Module I plus con detector de IR Waters 2410 acoplado a PC con software Millennium<sup>32</sup> v. 3.05.01 con una columna Aminex HPX-87H de BioRad. Las condiciones cromatográficas fueron: fase móvil 5 mM  $\text{H}_2\text{SO}_4$  en agua mili-Q; flujo 0,6 mL/min; detector de índice de refracción; volumen de inyección 20  $\mu$ L. Las muestras de reacción se diluyeron 1:3 en fase móvil, se centrifugaron y se filtraron a través de filtros de membrana de 0,45  $\mu$ m de tamaño de poro.

# Capítulo 4. MODELIZACIÓN DE LA ADICIÓN ALDÓLICA ENTRE DIHIDROXIACETONA FOSFATO Y (S)-CBZ-ALANINAL CATALIZADA POR RAMNULOSA-1-FOSFATO ALDOLASA

## 4.1. Introducción

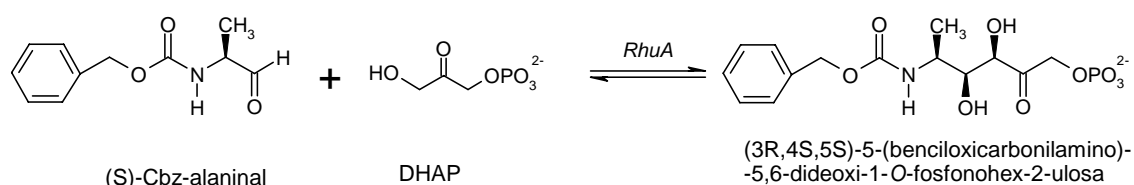
Una herramienta básica para el diseño de un biorreactor, su simulación y la optimización de las condiciones de operación consiste en disponer de un modelo matemático que describa el comportamiento del sistema a lo largo de todo el proceso. Los pasos a seguir para realizar la modelización de un sistema son, en primer lugar, el planteamiento de un modelo matemático teórico del comportamiento de las diferentes variables del proceso. A continuación, se analiza si el modelo propuesto se ajusta a los datos experimentales mediante programas de cálculo, estimándose el valor de los parámetros de las ecuaciones del modelo. A partir de las diferencias observadas entre los datos experimentales y los predichos, se puede refinar o redefinir el modelo hasta obtener una buena representación del sistema. Una vez obtenido el modelo, éste se debe validar realizando una simulación en unas condiciones diferentes a las empleadas en el ajuste y comprobar que predice el comportamiento del sistema (Gòdia y López-Santín, 1998).

A la hora de plantear las ecuaciones matemáticas del modelo se deben tener en cuenta tres aspectos generales. Por un lado, las ecuaciones de conservación del

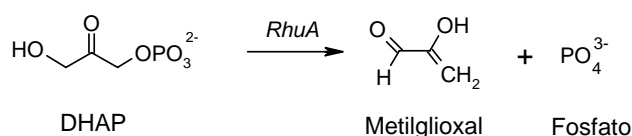
sistema o balances, que representan las leyes básicas de conservación de materia, energía y cantidad de movimiento y, en el caso de existir una reacción química, la estequiometría de la reacción. Por otro lado, las ecuaciones cinéticas que proporcionan información sobre la velocidad a la que se producirán los intercambios de materia, energía y cantidad de movimiento, así como las reacciones que tienen lugar. Por último, se deben tener en cuenta también las restricciones del sistema, como pueden ser las leyes de equilibrio, tanto físico como químico, o bien restricciones derivadas de la legislación, especificaciones del producto, normas de seguridad o condicionamientos económicos (Gòdia y López-Santín, 1998).

En este capítulo se realiza la modelización de la reacción de adición aldólica entre dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y (S)-Cbz-alaninal catalizada por ramnulosa-1-fosfato aldolasa (RhuA) a 4°C para dar un producto de adición de interés terapéutico (figura 4.1). Como ya se ha visto en el apartado 1.5.3, esta reacción prosigue un mecanismo ordenado por el cual la dihidroxiacetona fosfato se une a la enzima produciéndose un intermedio enediolato que posteriormente se une al (S)-Cbz-alaninal para progresar hacia el producto de reacción. Por otro lado, el intermedio enediolato del complejo DHAP-enzima también puede degradarse tanto química como enzimáticamente para dar lugar a metilglioxal y fosfato (figura 4.2). La velocidad de degradación química de DHAP puede considerarse despreciable frente a la degradación enzimática a 4°C (Suau, 2007). Por esto, para llevar a cabo la modelización de este sistema se decidió estudiar en primer lugar la degradación enzimática de DHAP a 4°C en ausencia de (S)-Cbz-alaninal y obtener los parámetros cinéticos que la definen y posteriormente realizar la modelización del proceso global.





**Figura 4.1.** Adición aldólica entre dihidroxiacetona fosfato y (S)-Cbz-alaninal catalizada por ramnulosa-1-fosfato aldolasa



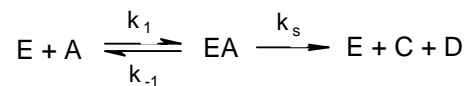
**Figura 4.2.** Degradación enzimática de dihidroxiacetona fosfato catalizada por ramnulosa-1-fosfato aldolasa

La reacción de adición aldólica entre dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y (S)-Cbz-alaninal catalizada por otra aldolasa de clase II, la fuculosa-1-fosfato aldolasa (FucA), para dar el mismo producto de adición pero el diastereoisómero (3R, 4R) complementario (apartado 1.6) ha sido estudiada y modelizada previamente por Suau y col. (2008). La fuculosa-1-fosfato aldolasa presenta una estructura, centro activo y mecanismo de catálisis muy similar al de la ramnulosa-1-fosfato aldolasa (apartado 1.5.3) por lo que se partió de la hipótesis de que ambas enzimas podrían presentar el mismo modelo cinético frente a la reacción de adición aldólica entre dihidroxiacetona fosfato y (S)-Cbz-alaninal.

## 4.2. Estudio cinético de degradación enzimática de DHAP

La enzima ramnulosa-1-fosfato aldolasa cataliza la degradación de dihidroxiacetona fosfato (DHAP) para dar lugar a metilglioxal y fosfato inorgánico (figura 4.3). Dado que la unión de DHAP al centro activo de fuculosa-1-fosfato

aldolasa (FucA) y de ramnulosa-1-fosfato aldolasa (RhuA) se produce de un modo similar, se planteó en un primer momento la aplicación del modelo cinético de la degradación enzimática de DHAP catalizada por FucA desarrollado por Suau y col. (2008).



**Figura 4.3.** Esquema de la degradación enzimática de dihidroxiacetona fosfato (A) catalizada por ramnulosa-1-fosfato aldolasa (E) para dar lugar a metilglioxal (C) y fosfato (D)

En el desarrollo del modelo para la catálisis con FucA se consideró la reacción de degradación enzimática de DHAP irreversible hacia la formación de metilglioxal y fosfato inorgánico y la aproximación de estado estacionario para todas las especies enzimáticas. Para que se cumpla esta aproximación, la concentración de enzima debe ser suficientemente inferior a la concentración de sustrato total como para que la concentración inicial de sustrato no se vea afectada por la formación del complejo ES. Se suele considerar suficiente que la concentración inicial de sustrato  $S_0$  sea como mínimo 100 veces superior a la concentración inicial de la enzima  $E_0$  (Taylor, 2004). Para poder relacionar estas dos concentraciones, la enzima se debe expresar en concentración molar por centro activo. Ya que la enzima contiene cuatro centros activos y cuatro monómeros, la concentración molar de centros activos equivale a la concentración molar de la enzima considerándola monomérica. Por lo tanto, en cada experimento la concentración molar de enzima se debe calcular a través de la ecuación (4.1) teniendo en cuenta que la actividad específica de RhuA fue 7,2 UA/mg y la masa molecular de cada monómero es 30149 g/mol (Moralejo y col., 1993) y comprobar que se cumpla en cada caso que  $\frac{S_0}{E_0} > 100$  (ecuación 4.1).

$$E_0 \text{ (mM)} = \text{Actividad enzimática} \left( \frac{\text{UA}}{\text{ml}} \right) \cdot \frac{1}{7,2 \frac{\text{UA}}{\text{mg}}} \cdot \frac{1}{30149 \frac{\text{mg}}{\text{mmol}}} \cdot \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} \quad (4.1)$$

El modelo cinético propuesto por Suau y col. (2008) para la degradación enzimática de DHAP catalizada por FucA corresponde a una cinética de Michaelis-Menten con inhibición competitiva por metilglioxal (ecuación 4.2).

$$r_{\text{sec}} = -\frac{dA}{dt} = \frac{dC}{dt} = \frac{dD}{dt} = \frac{k_s \cdot E_0 \cdot A}{K_M (1 + k_{iC} \cdot C) + A} \quad (4.2)$$

Donde  $r_s$  es la velocidad de reacción ( $\text{mM} \cdot \text{h}^{-1}$ );  $A$ , la concentración de DHAP ( $\text{mM}$ );  $E_0$ , la concentración inicial de enzima ( $\text{mM}$ );  $K_M$ , la constante de tipo Michaelis-Menten ( $\text{mM}$ );  $k_{iC}$ , la constante de inhibición por metilglioxal;  $C$ , la concentración de metilglioxal ( $\text{mM}$ ) y  $k_s$ , la constante cinética de disociación a productos ( $\text{mM} \cdot \text{h}^{-1}$ ) que coincide con el número de recambio de la enzima o *turnover number* (número de moles de DHAP degradado por hora y por mol de centros activos en condiciones de saturación de sustrato).

#### 4.2.1. Determinación de los parámetros cinéticos de reacción secundaria

En el modelo cinético propuesto se han de determinar los valores de la constante cinética de la reacción secundaria  $k_s$ , la constante de tipo Michaelis-Menten  $K_M$  y la constante de inhibición competitiva por metilglioxal  $k_{iC}$ . La determinación de estos parámetros se ha realizado a partir de los datos experimentales de ocho reacciones realizadas con concentraciones iniciales entre 12 y 130mM de DHAP y actividad enzimática entre 3 y 4,35 UA/ml y empleando el software informático gPROMS (ver apartado 3.6.3). La actividad enzimática de RhuA en las condiciones de reacción se mantiene prácticamente constante durante el tiempo que dura el experimento.

A la hora de determinar los parámetros de los modelos cinéticos, normalmente se busca realizar el ajuste a los datos experimentales en unas

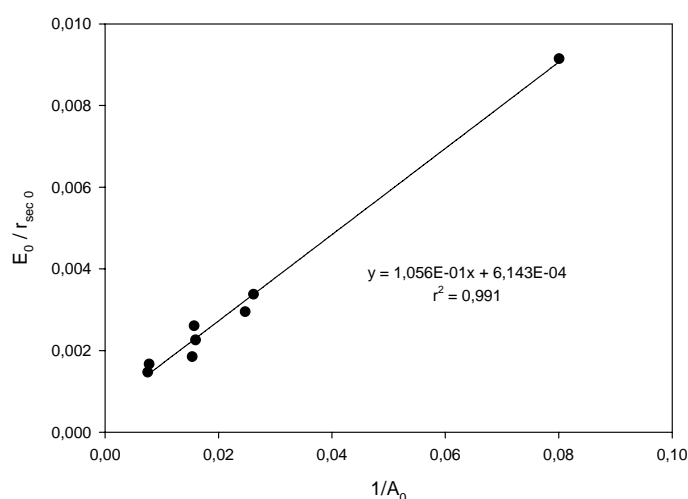
condiciones que permitan reducir la ecuación del modelo a una forma más sencilla y con un número menor de parámetros. En el caso de cinéticas con inhibición por producto es habitual emplear los datos obtenidos durante los primeros instantes de la reacción cuando la concentración de producto es muy baja y el término de inhibición se puede considerar despreciable frente el valor de los demás términos de la ecuación. Así, en el caso de la degradación enzimática de DHAP, la expresión de la velocidad inicial de reacción obedece a una cinética de Michaelis-Menten (ecuación 4.3) y, por tanto, del ajuste de los datos experimentales de velocidad inicial de reacción  $r_{\text{sec } 0}$  frente a la concentración inicial de sustrato  $A_0$  se pueden obtener directamente los parámetros  $K_M$  y  $k_s$ . Este ajuste se puede realizar mediante una linealización de tipo Lineweaver-Burk en la que se representa la inversa de la velocidad inicial de reacción frente a la inversa de la concentración inicial de sustrato en experimentos con una concentración inicial de enzima  $E_0$  fija (ecuación 4.4). En experimentos con diferentes concentraciones iniciales de enzima esta linealización se puede modificar tal como se muestra en la ecuación 4.5. A partir de la pendiente y la ordenada en el origen de la representación de los datos experimentales de  $E_0/r_{\text{sec } 0}$  frente a la inversa de la concentración inicial de DHAP se puede obtener el valor de los parámetros  $K_M$  y  $k_s$  (ecuación 4.5).

$$r_{\text{sec } 0} = \frac{k_s \cdot E_0 \cdot A_0}{K_M + A_0} \quad (4.3)$$

$$\frac{1}{r_{\text{sec } 0}} = \frac{K_M}{k_s \cdot E_0} \cdot \frac{1}{A_0} + \frac{1}{k_s \cdot E_0} \quad (4.4)$$

$$\frac{E_0}{r_{\text{sec } 0}} = \frac{K_M}{k_s} \cdot \frac{1}{A_0} + \frac{1}{k_s} \quad (4.5)$$

De las curvas experimentales obtenidas para cada experimento se calculó la velocidad de reacción inicial  $r_{\text{sec } 0}$  y se representó  $E_0 / r_{\text{sec } 0}$  frente a la inversa de la concentración inicial de DHAP (figura 4.4). Del valor de la pendiente y la ordenada en el origen se obtuvo el valor de los parámetros  $K_M$  y  $k_s$  que se presentan en la tabla 4.1 junto con los obtenidos anteriormente para FucA. Se puede observar que el valor de  $k_s$  para RhuA es similar aunque ligeramente superior al correspondiente a FucA. Por el contrario, se observa una mayor diferencia en la constante de tipo Michaelis-Menten  $K_M$ , siendo aproximadamente 3 veces superior en RhuA que en FucA para la misma reacción. Esto quiere decir que la enzima FucA es más afín por el sustrato DHAP que RhuA y se alcanza la saturación a concentraciones de sustrato inferiores. Sin embargo, ambas enzimas presentan frente a sus sustratos naturales unas constantes de Michaelis-Menten muy similares, siendo 2,2 mM en el caso de FucA (Joerger y col., 2000) y 2,0 mM en RhuA (Grueninger y Schulz, 2008). Dado que la constante de Michaelis-Menten representa la concentración de sustrato a la que la velocidad inicial es la mitad de la velocidad inicial máxima, se observa que la velocidad inicial de reacción en FucA será mayor que en RhuA en un amplio rango de concentraciones iniciales de sustrato.



**Figura 4.4.** Estimación del valor de  $K_M$  y  $k_s$  de la degradación enzimática de dihidroxiacetona fosfato catalizada por ramnulosa-1-fosfato aldolasa a 4°C en medio 50 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 20% v/v DMF, pH 7,0.

**Tabla 4.1.** Estimación inicial de los parámetros  $K_M$  y  $k_s$  obtenidos de la linealización de tipo Lineweaver-Burk de los datos experimentales en la degradación de DHAP catalizada por ramnulosa-1-fosfato aldolasa (RhuA) a 4°C en medio 50 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 20% v/v DMF, pH 7,0 y comparación con los obtenidos en la catálisis con fuculosa-1-fosfato aldolasa (FucA) en las mismas condiciones.

<i>Parámetro</i>	<i>RhuA</i>	<i>FucA</i>
$K_M$ (mM)	171,9	54,7
$k_s$ (h <sup>-1</sup> )	1628	1288

Recientemente, diversos autores han cuestionado la validez de la linealización de los datos experimentales a la hora de determinar el valor de los parámetros cinéticos debido al error que se comete sobre todo a concentraciones de sustrato elevadas (Bommarius y Riebel, 2004). Por ello, los valores de  $K_M$  y  $k_s$  obtenidos mediante este método se han considerado como una estimación del valor real de estos parámetros para su posterior determinación mediante ajuste numérico al modelo propuesto.

Así, la determinación de los parámetros cinéticos  $K_M$ ,  $k_s$  y  $k_{ic}$  de la degradación enzimática de DHAP catalizada por RhuA se realizó mediante ajuste de la curva experimental al modelo propuesto mediante el software gPROMS. En la estimación de los parámetros de un modelo se ha de introducir, en primer lugar, el modelo de reacción propuesto y el balance de materia para cada compuesto en un reactor discontinuo (ecuación 4.2). Para cada parámetro cinético a estimar se ha de introducir un valor inicial y acotar el rango de valores que puede presentar dicho parámetro. En este caso se empleó como valor inicial de estimación de los parámetros  $K_M$  y  $k_s$  el valor obtenido a través de la linealización de la velocidad inicial de reacción y, en el caso de  $k_{ic}$ , el valor obtenido en la catálisis con fuculosa-1-fosfato aldolasa. Se introdujo un rango de valores suficientemente amplio para asegurarse de cubrir el valor real de los parámetros. El modelo de varianza empleado corresponde a un modelo constante cuyo parámetro corresponde a la desviación estándar del

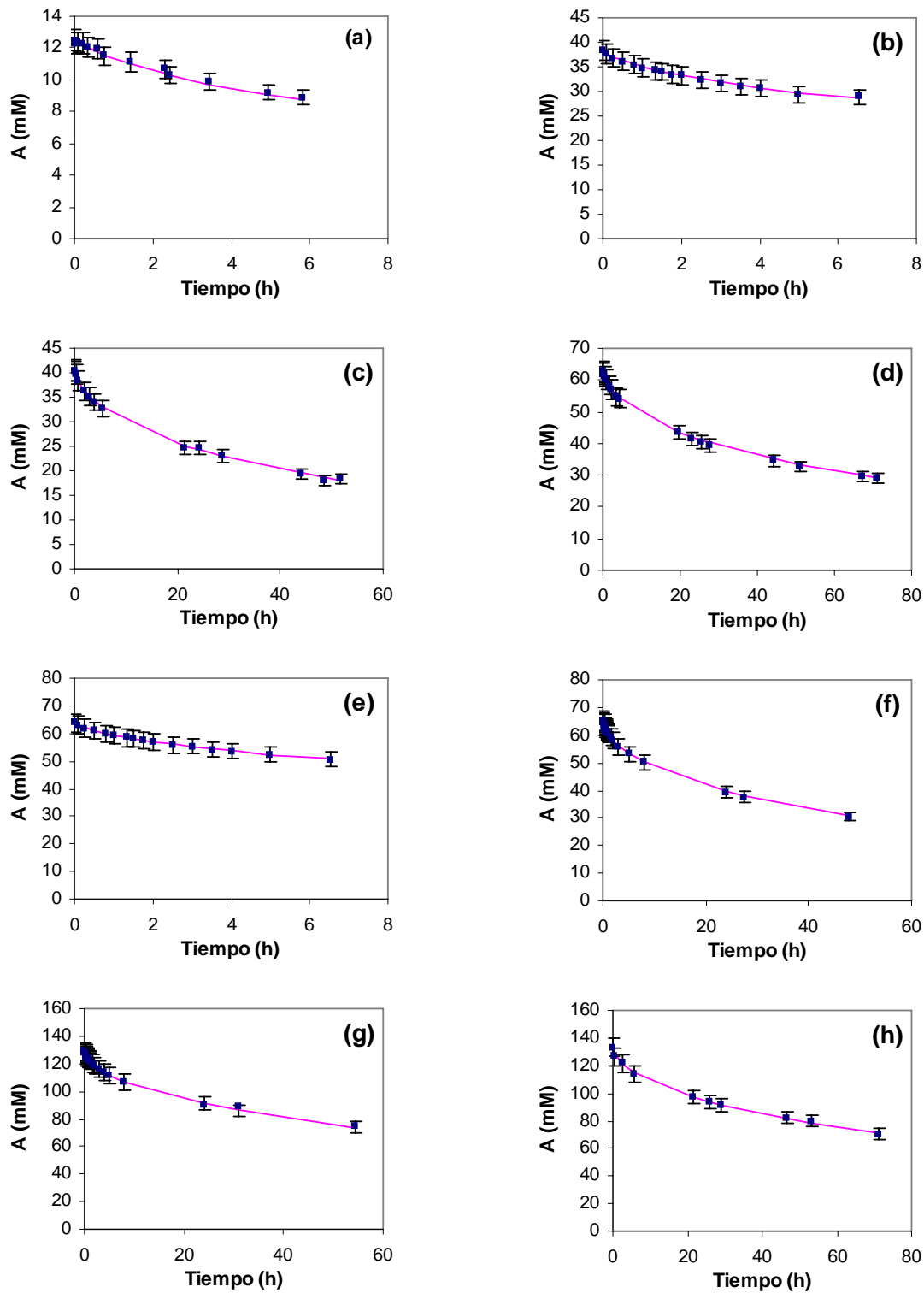
método de determinación de DHAP. De esta manera se obtuvo un conjunto de parámetros que ajusta los datos experimentales con error relativo medio entre los valores experimentales y los predichos de un 1% (tabla 4.2). El valor de los parámetros  $K_M$  y  $k_s$  es muy similar al valor obtenido mediante la linealización de los datos experimentales de velocidad inicial de reacción. El valor obtenido para la constante de inhibición por metilglioxal  $k_{iC}$  es aproximadamente el doble en el caso de RhuA que en FucA, por lo que la presencia de este compuesto en el medio afecta en mayor medida a la velocidad de reacción en el caso de RhuA. Por lo tanto, se confirma la similitud de la catálisis de la degradación enzimática de DHAP por ramnulosa-1-fosfato aldolasa y fuculosa-1-fosfato aldolasa dado que se ajustan a un modelo similar, si bien existen algunas diferencias en el valor de los parámetros cinéticos que presentan ambas enzimas.

**Tabla 4.2.** Determinación de los parámetros  $K_M$ ,  $k_s$  y  $k_{iC}$  obtenidos del ajuste a los datos experimentales de la degradación de DHAP catalizada por ramnulosa-1-fosfato aldolasa (RhuA) a 4°C en medio 50 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 20% v/v DMF, pH 7,0 y comparación con los valores obtenidos con fuculosa-1-fosfato aldolasa (FucA) en las mismas condiciones.

<i>Parámetro</i>	<i>RhuA</i>	<i>FucA</i>
$K_M$ (mM)	173,6 ± 0,6	54,7
$k_s$ (h <sup>-1</sup> )	1633 ± 5	1288
$k_{iC}$ (mM <sup>-1</sup> )	0,570 ± 0,0021	0,30

El modelo final obtenido para la degradación enzimática de DHAP catalizada por ramnulosa-1-fosfato aldolasa a 4°C en medio 50 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 20% v/v DMF, pH 7,0 se muestra en la ecuación 4.6.

$$r_s = \frac{1633 \cdot E_0 \cdot A}{173,6 \cdot (1 + 0,57 \cdot C) + A} \quad (4.6)$$

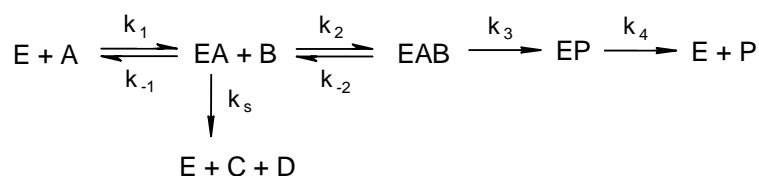


**Figura 4.5.** Modelización de la degradación enzimática de dihidroxiacetona fosfato catalizada por ramnulosa-1-fosfato aldolasa a 4°C y medio 50 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 20% v/v DMF, pH 7,0 a una concentración inicial: (a) 12,5; (b) 38,2; (c) 40,5; (d) 62,7; (e) 63,7; (f) 65,1; (g) 128,6 y (g) 133,2 mM. (•): datos experimentales; (—): modelo.



### 4.3. Estudio cinético de la adición aldólica entre DHAP y (S)-Cbz-alaninal

La adición aldólica entre dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y (S)-Cbz-alaninal catalizada por ramnulosa-1-fosfato aldolasa para dar un producto de adición de alto valor añadido, junto con la reacción secundaria de degradación enzimática de la DHAP a metilglioxal y fosfato se puede escribir esquemáticamente como se muestra en la figura 4.6. Como se ha indicado anteriormente en el apartado 1.5.3, la reacción de síntesis del producto de interés sigue un mecanismo ordenado en el que la enzima libre se une en primer lugar a DHAP dando lugar al complejo EA que se une a continuación con (S)-Cbz-alaninal para dar lugar finalmente al producto. Esta reacción se ha considerado irreversible ya que se observó que el producto de adición es estable tras la reacción. Por otro lado, el complejo enzimático EA da lugar directamente a los productos secundarios.



**Figura 4.6.** Esquema de las reacciones involucradas en la adición aldólica entre dihidroxiacetona fosfato (A) y (S)-Cbz-alaninal (B) catalizada por ramnulosa-1-fosfato aldolasa (E) para dar lugar al producto de adición (P). Presenta una reacción secundaria en la que el complejo formado por la dihidroxiacetona fosfato y enzima (EA) da lugar a metilglioxal (C) y fosfato (D)

El modelo cinético de esta reacción catalizada por otra enzima, la fuculosa-1-fosfato aldolasa se ajusta a un mecanismo ordenado de dos sustratos con inhibición no competitiva por (S)-Cbz-alaninal tanto en la reacción adición aldólica como en la secundaria e inhibición competitiva por metilglioxal en ambas reacciones (ecuaciones 4.7 y 4.8 y tabla 4.3). El valor de la constante de inhibición por metilglioxal difiere en

cada reacción ya que este compuesto puede inhibir tanto el complejo EA como el resto de complejos enzimáticos del sistema (Suau y col., 2008).

$$r_{\text{sint}} = \frac{k_r \cdot E_0 \cdot A \cdot B}{(K_M \cdot K_B \cdot (1 + k_{iC} \cdot C) + K_B \cdot A + K_A \cdot B + A \cdot B) \cdot (1 + k_{iB} \cdot B)} \quad (4.7)$$

$$r_{\text{sec}} = \frac{k_s \cdot E_0 \cdot A \cdot B}{(K_M \cdot (1 + k_{iC} \cdot C) + A) \cdot (1 + k_{iB} \cdot B)} \quad (4.8)$$

Donde  $r_{\text{sint}}$  es la velocidad de reacción de síntesis del producto ( $\text{mM} \cdot \text{h}^{-1}$ );  $r_{\text{sec}}$ , la velocidad de la reacción secundaria ( $\text{mM} \cdot \text{h}^{-1}$ ); A, B y C, las concentraciones de DHAP, (S)-Cbz-alaninal y metilglioxal ( $\text{mM}$ );  $k_r$  y  $k_s$ , las constantes cinéticas de la reacción de síntesis y secundaria ( $\text{mM} \cdot \text{h}^{-1}$ );  $E_0$ , la concentración inicial de enzima ( $\text{mM}$ );  $K_M$ , la constante de tipo Michaelis-Menten para ambas reacciones ( $\text{mM}$ );  $K_A$  y  $K_B$ , las constantes de tipo Michaelis-Menten para ambos sustratos ( $\text{mM}$ );  $k_{iC}$  y  $k_{iC}$ , las constantes de inhibición por metilglioxal en la reacción de síntesis y secundaria ( $\text{mM}^{-1}$ ) y  $k_{iB}$ , la constante de inhibición por (S)-Cbz-alaninal en ambas reacciones ( $\text{mM}^{-1}$ ).

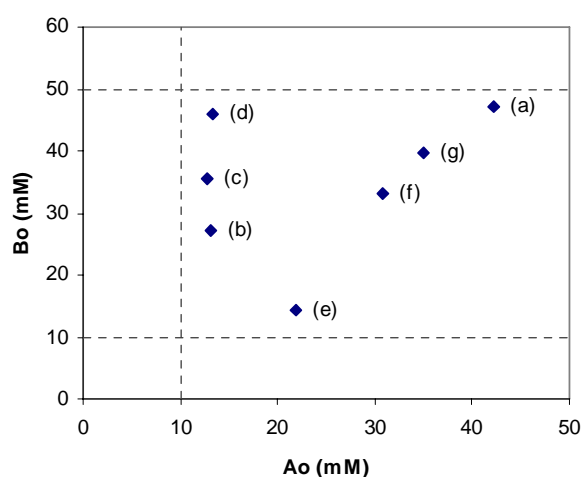
**Tabla 4.3.** Definición de los parámetros del modelo cinético de la adición aldólica entre dihidroxiacetona fosfato (A) y (S)-Cbz-alaninal (B) catalizada por fuculosa-1-fosfato aldolasa (extraído de Suau y col. 2008).

<i>Parámetro</i>	<i>Definición</i>
$k_r$	$\frac{k_3 \cdot k_4}{k_3 + k_4}$
$K_M$	$\frac{k_{-1} + k_s}{k_1}$
$K_B$	$\frac{k_4 \cdot (k_{-2} + k_3)}{k_2 \cdot (k_3 + k_4)}$
$K_A$	$\frac{k_3 \cdot k_4}{k_1 \cdot (k_3 + k_4)}$

Como se ha indicado anteriormente, debido a la elevada similitud de ambas enzimas se propuso la misma ecuación del modelo obtenido con fuculosa-1-fosfato aldolasa en la modelización de la adición aldólica entre DHAP y (S)-Cbz-alaninal catalizada por ramnulosa-1-fosfato aldolasa a 4°C en medio 50 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 20% v/v DMF, pH 7,0.

### 4.3.1. Determinación de los parámetros cinéticos de la adición aldólica

En la determinación de los parámetros cinéticos del modelo se emplearon los datos experimentales de siete reacciones a diferentes concentraciones iniciales de los sustratos y con una concentración inicial de enzima de 2 y 3 UA/ml (figura 4.7). Se han utilizado las curvas experimentales del consumo de dihidroxiacetona fosfato y (S)-Cbz-alaninal en vez de la curva experimental de aparición de producto porque presentaban una mayor exactitud en el análisis. Los experimentos realizados se llevaron a cabo a concentraciones iniciales de dihidroxiacetona fosfato,  $A_0$ , y de (S)-Cbz-alaninal,  $B_0$ , superiores a 10 mM. El límite superior de  $B_0$  fue 50 mM y corresponde con su límite de solubilidad en el medio seleccionado. Los experimentos realizados presentan una relación entre las concentraciones iniciales de reactivos  $B_0/A_0$  de 0,7, 1,1, 2,1, 2,8 y 3,5. Se descartó realizar experimentos a una relación inferior ya que, en ese caso, se vería mucho más favorecida la reacción secundaria de degradación de A que la reacción de síntesis del compuesto de interés.



**Figura 4.7.** Concentración inicial de dihidroxiacetona fosfato ( $A_0$ ) y (S)-Cbz-alaninal ( $B_0$ ) en los experimentos empleados en la determinación de los parámetros cinéticos de la adición aldólica catalizada por ramnulosa-1-fosfato aldolasa a 4°C en medio medio 50 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 20% v/v DMF, pH 7,0. (a)  $A_0$  42,3 mM,  $B_0$  47,0 mM; (b)  $A_0$  13,2 mM,  $B_0$  27,2 mM; (c)  $A_0$  12,8 mM,  $B_0$  35,4 mM; (d)  $A_0$  13,3 mM,  $B_0$  45,9 mM; (e)  $A_0$  21,9 mM,  $B_0$  14,4 mM; (f)  $A_0$  30,8 mM,  $B_0$  33,0 mM y (g)  $A_0$  35,0 mM,  $B_0$  39,7 mM.

Los parámetros cinéticos a determinar en el modelo propuesto son la constante cinética de la reacción de síntesis  $k_r$ , las constantes de tipo Michaelis-Menten para cada sustrato  $K_A$  y  $K_B$  y las constantes de inhibición por metilglioxal en la reacción de síntesis,  $k_{iC}$ , e inhibición por (S)-Cbz-alaninal en ambas reacciones,  $k_{iB}$ . Los valores de los parámetros cinéticos de la reacción secundaria  $K_M$ ,  $k_s$  y  $k_{iC}$  habían sido determinados con anterioridad en la modelización de la reacción secundaria (tabla 4.2) por lo que el modelo cinético propuesto queda de la forma expresada en las ecuaciones 4.9 y 4.10. Los balances de materia aplicados a reactivos y productos en un reactor discontinuo se indican en las ecuaciones 4.11, 4.12 y 4.13.

$$r_{\text{sint}} = \frac{k_r \cdot E_0 \cdot A \cdot B}{(173,6 \cdot K_B \cdot (1 + k_{iC} \cdot C) + K_B \cdot A + K_A \cdot B + A \cdot B) \cdot (1 + k_{iB} \cdot B)} \quad (4.9)$$

$$r_{\text{sec}} = \frac{1633 \cdot E_0 \cdot A \cdot B}{(173,6 \cdot (1 + 0,57 \cdot C) + A) \cdot (1 + k_{iB} \cdot B)} \quad (4.10)$$

$$-\frac{dA}{dt} = r_{\text{sint}} + r_{\text{sec}} \quad (4.11)$$

$$-\frac{dB}{dt} = \frac{dP}{dt} = r_{\text{sint}} \quad (4.12)$$

$$\frac{dC}{dt} = \frac{dD}{dt} = r_{\text{sec}} \quad (4.13)$$

A la hora de determinar los parámetros cinéticos de reacciones con inhibición, es posible simplificar el modelo considerando los datos experimentales en los instantes iniciales de la reacción, donde el efecto de inhibición por productos se puede considerar despreciable. En el caso de cinéticas de dos sustratos es frecuente realizar experimentos manteniendo la concentración de uno de los sustratos constantes y variando el otro sustrato. Esto permite realizar un tratamiento análogo a la linealización de la velocidad inicial desarrollada para cinéticas de un sustrato y obtener por separado las constantes de tipo Michaelis-Menten de cada sustrato

(Cleland, 1979). Otra opción para simplificar la determinación de parámetros en cinéticas de dos sustratos es realizar la reacción a una concentración de uno de los reactivos muy elevada con lo que se puede considerar prácticamente constante a lo largo de la reacción. De esta manera, se puede obtener el valor del parámetro relacionado con el otro sustrato. Sin embargo, en el caso de la adición aldólica entre DHAP y (S)-Cbz-alaninal, los límites de solubilidad de estos compuestos ofrecen un rango demasiado estrecho como para poder realizar estos tratamientos.

Se decidió, por tanto, realizar directamente el ajuste de la curva experimental al modelo propuesto mediante el software gPROMS. Para realizar la determinación de los parámetros cinéticos  $K_A$ ,  $K_B$ ,  $k_r$ ,  $k_{iB}$  y  $k_{iC}$  del modelo propuesto, se introdujeron las ecuaciones correspondientes al modelo, los balances de materia de todos los compuestos involucrados en la reacción y las curvas experimentales de concentración de DHAP y (S)-Cbz-alaninal. El valor inicial de cada parámetro que se introdujo en el programa fueron los correspondientes a los obtenidos en la catálisis con FucA y se seleccionó un rango de valores suficientemente amplio para asegurarse de poder cubrir el valor real de los parámetros. El modelo de varianza empleado corresponde a un modelo constante cuyo parámetro corresponde a la desviación estándar del método de determinación del compuesto correspondiente. Sin embargo, tras trabajar sobre este modelo ensayando diversos conjuntos de valores iniciales de los parámetros y rangos de estimación no se consiguió obtener un buen ajuste de los datos experimentales al modelo propuesto. Se planteó entonces la posibilidad de que el modelo que ajusta el comportamiento de RhuA fuese diferente al obtenido con FucA. Así, se ensayaron modelos con inhibiciones de distinto tipo a los propuestos inicialmente pero tampoco se obtuvieron buenos resultados.

Finalmente, se planteó la existencia de inhibición por producto y se obtuvo un buen ajuste del comportamiento experimental empleando un modelo con inhibición

competitiva (ecuación 4.14). De las estimaciones preliminares de los parámetros se obtuvo, por un lado, que la constante de inhibición por (S)-Cbz-alaninal en ambas reacciones era prácticamente nula. Por tanto, el programa no es capaz de detectar el efecto de la inhibición por (S)-Cbz-alaninal en las condiciones estudiadas. Por otro lado, el valor de la constante de inhibición por metilglioxal de la reacción de síntesis,  $k_{iC}$  presentaba un valor muy próximo al valor obtenido en la reacción secundaria. Por lo tanto, y al contrario de lo que ocurría con FucA, es posible que la inhibición por metilglioxal se produzca sólo sobre el complejo EA y, por tanto, en ambas reacciones la constante de inhibición presente el mismo valor.

$$r_{\text{sint}} = \frac{k_r \cdot E_0 \cdot A \cdot B}{(173,6 \cdot K_B \cdot (1 + k_{iC} \cdot C) \cdot (1 + k_{iP} \cdot P) + K_B \cdot A + K_A \cdot B + A \cdot B) \cdot (1 + k_{iB} \cdot B)} \quad (4.14)$$

Teniendo en cuenta estas consideraciones, el modelo final ensayado corresponde con un modelo con inhibición competitiva por producto en la reacción de síntesis e inhibición competitiva por metilglioxal en reacción de síntesis y secundaria, con el mismo valor del parámetro de inhibición (ecuaciones 4.15 y 4.16). Se obtuvo un conjunto de parámetros que ajusta los datos experimentales con un error relativo medio entre los valores experimentales y los predichos de un 5% en el perfil de concentración de DHAP y de un 3% respecto a la concentración de (S)-Cbz-alaninal (tabla 4,4). Comparando el valor de los parámetros cinéticos del modelo con los obtenidos con FucA se observa que ambas enzimas presentan prácticamente el mismo valor de la constante  $k_r$ . Sin embargo, sí que se aprecian diferencias en las constantes cinéticas de tipo Michaelis-Menten ya que el valor de  $K_A$  es casi 4 veces superior al obtenido con FucA y  $K_B$  prácticamente la mitad. Por otro lado, RhuA se ve fuertemente inhibida por el producto de la reacción.

$$r_{\text{sint}} = \frac{k_r \cdot E_0 \cdot A \cdot B}{173,6 \cdot K_B \cdot (1 + 0,57 \cdot C) \cdot (1 + k_{iP} \cdot P) + K_B \cdot A + K_A \cdot B + A \cdot B} \quad (4.15)$$

$$r_{\text{sec}} = \frac{1633 \cdot E_0 \cdot A \cdot B}{173,6 \cdot (1 + 0,57 \cdot C) + A} \quad (4.16)$$

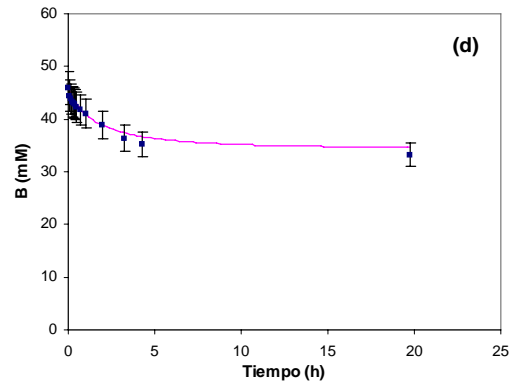
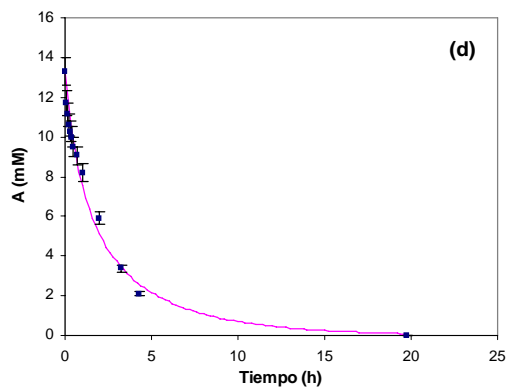
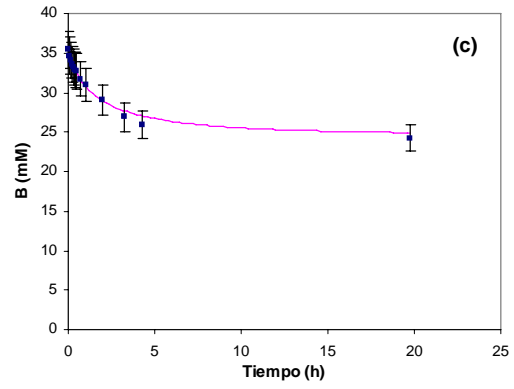
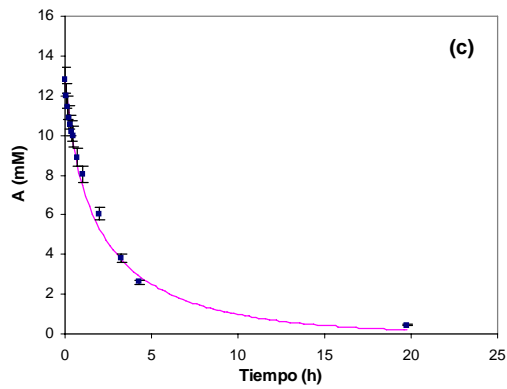
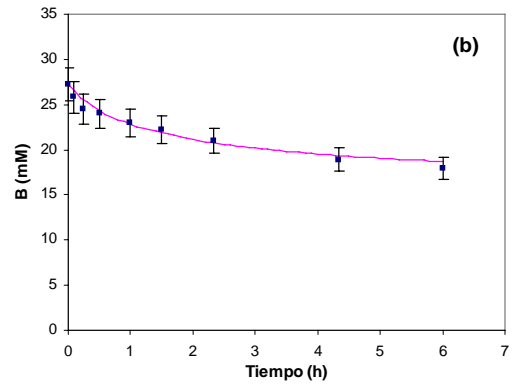
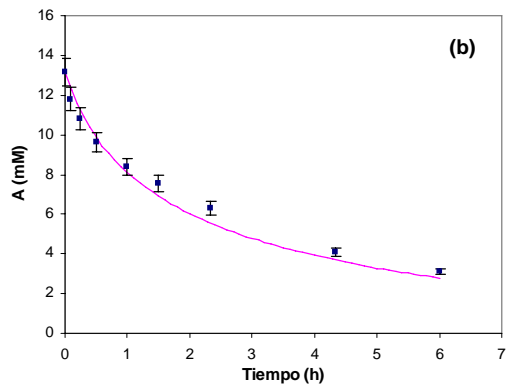
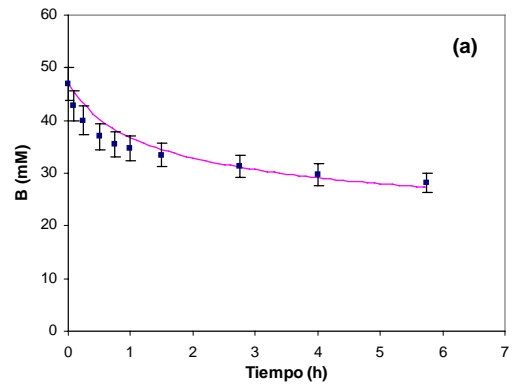
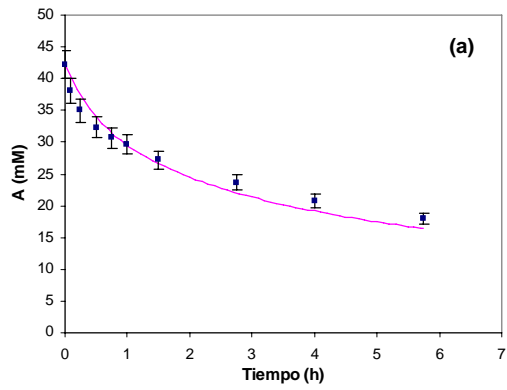
**Tabla 4.4.** Determinación de los parámetros del modelo de adición aldólica entre DHAP y (S)-Cbz-alaninal catalizada por ramnulosa-1-fosfato aldolasa a 4°C en medio 50 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 20% v/v DMF, pH 7,0 y comparación con los valores obtenidos con fuculosa-1-fosfato aldolasa en las mismas condiciones.

<i>Parámetro</i>	<i>RhuA</i>	<i>FucA</i>
$k_r$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$1630 \pm 70$	1632
$K_A$ (mM)	$9,4 \pm 0,6$	2,56
$K_B$ (mM)	$0,148 \pm 0,019$	0,262
$k_{iP}$ ( $\text{mM}^{-1}$ )	$4,95 \pm 0,24$	-

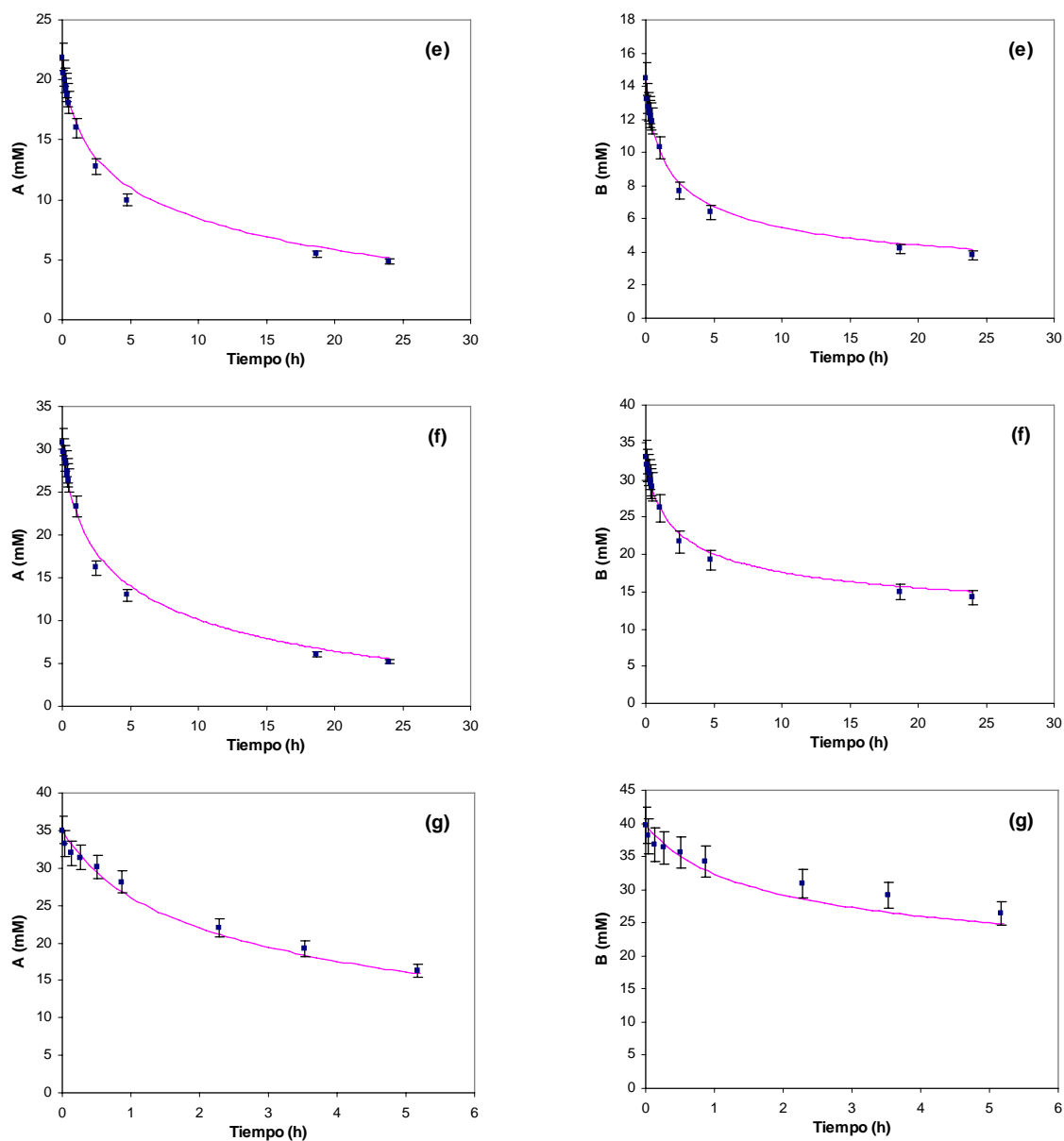
El modelo final obtenido para la adición aldólica entre DHAP y (S)-Cbz-alaninal catalizada por ramnulosa-1-fosfato aldolasa a 4°C en medio 50 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 20% v/v DMF, pH 7,0 se muestra en las ecuaciones 4.17 y 4.18.

$$r_{\text{sint}} = \frac{1630 \cdot E_0 \cdot A \cdot B}{25,69 \cdot (1 + 0,57 \cdot C) \cdot (1 + 4,95 \cdot P) + 0,148 \cdot A + 9,4 \cdot B + A \cdot B} \quad (4.17)$$

$$r_{\text{sec}} = \frac{1633 \cdot E_0 \cdot A \cdot B}{173,6 \cdot (1 + 0,57 \cdot C) + A} \quad (4.18)$$



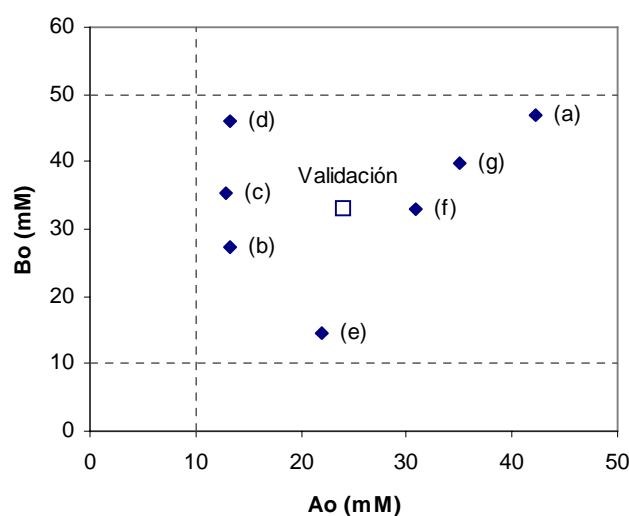




**Figura 4.8.** Modelización de la adición aldólica entre DHAP (A) y (S)-Cbz-alaninal (B) catalizada por ramnulosa-1-fosfato aldolasa a 4°C en medio 50 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 20% v/v DMF, pH 7,0: (a)  $A_0$  42,3 mM,  $B_0$  47,0 mM; (b)  $A_0$  13,2 mM,  $B_0$  27,2 mM; (c)  $A_0$  12,8 mM,  $B_0$  35,4 mM; (d)  $A_0$  13,3 mM,  $B_0$  45,9 mM; (e)  $A_0$  21,9 mM,  $B_0$  14,4 mM; (f)  $A_0$  30,8 mM,  $B_0$  33,0 mM y (g)  $A_0$  35,0 mM,  $B_0$  39,7 mM. (•): datos experimentales; (—): modelo.

#### 4.4. Validación del modelo cinético

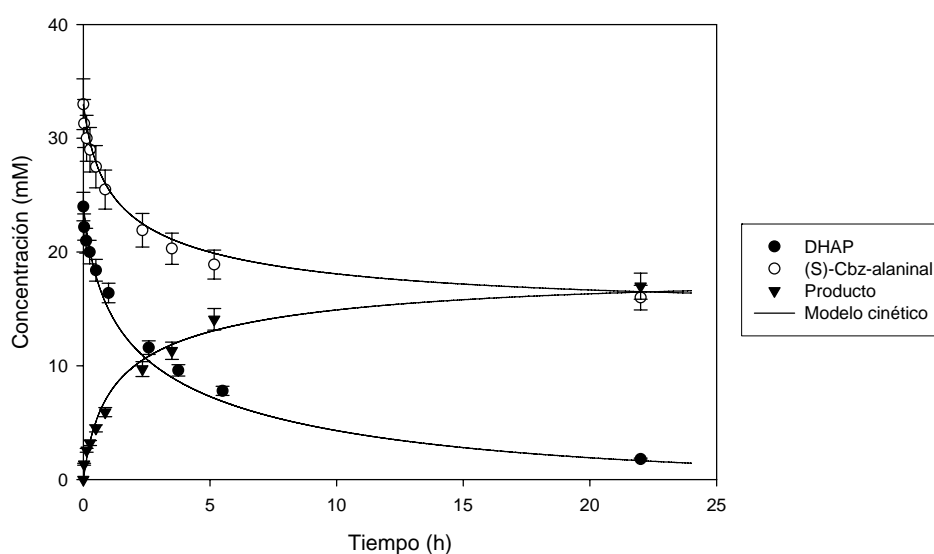
Para validar un modelo cinético, éste debe predecir con exactitud el comportamiento de la reacción en unas condiciones diferentes a las que se emplearon en la modelización. En este caso se seleccionaron unas concentraciones iniciales de reactivos intermedias en el rango empleado en la modelización y con una actividad enzimática de 3 UA/ml (figura 4.9).



**Figura 4.9.** Concentración inicial de DHAP ( $A_0$ ) y (S)-Cbz-alaninal ( $B_0$ ) de los experimentos empleados en la modelización y validación del modelo cinético de la adición aldólica entre DHAP y (S)-Cbz-alaninal catalizada por ramnulosa-1-fosfato aldolasa a 4°C en medio 50 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 20% v/v DMF, pH 7,0. (a)  $A_0$  42,3 mM,  $B_0$  47,0 mM; (b)  $A_0$  13,2 mM,  $B_0$  27,2 mM; (c)  $A_0$  12,8 mM,  $B_0$  35,4 mM; (d)  $A_0$  13,3 mM,  $B_0$  45,9 mM; (e)  $A_0$  21,9 mM,  $B_0$  14,4 mM; (f)  $A_0$  30,8 mM,  $B_0$  33,0 mM; (g)  $A_0$  35,0 mM,  $B_0$  39,7 mM y (validación)  $A_0$  24,0 mM,  $B_0$  33,1 mM.

Como se puede observar en la figura 4.10, el modelo predice correctamente la evolución de la concentración de DHAP y (S)-Cbz-alaninal a lo largo del experimento. De igual manera, el perfil de generación de producto predicho por el modelo ajusta adecuadamente los datos experimentales. El error relativo medio entre la predicción del modelo y los datos experimentales es de un 7% para el perfil de consumo de DHAP, un 3% en el caso de (S)-Cbz-alaninal y un 9% para la generación

de producto. Por lo tanto, el modelo propuesto puede considerarse válido dentro del rango de condiciones que se han empleado en su determinación. En estas condiciones, se ha obtenido un 70% de rendimiento de reacción, definido como la relación entre el producto obtenido y el reactivo limitante inicial, y una selectividad del 73%, definida como la relación entre el producto obtenido y el reactivo limitante consumido.



**Figura 4.10.** Validación del modelo de adición aldólica entre dihidroxiacetona fosfato y (S)-Cbz-alaninal catalizada por ramnulosa-1-fosfato aldolasa a 4°C en medio 50 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 20% v/v DMF, pH 7,0.

Dado que en la adición aldólica de interés también tiene lugar una reacción secundaria que consume DHAP, un exceso de (S)-Cbz-alaninal provocaría el desplazamiento de la reacción hacia la síntesis del producto. Por lo tanto, es posible aumentar el rendimiento y selectividad de la reacción de síntesis empleando una mayor relación de concentración inicial de (S)-Cbz-alaninal frente DHAP que la empleada anteriormente ( $B_0/A_0=1,4$ ). En la tabla 4.5 se puede observar que efectivamente el rendimiento y selectividad de la reacción aumentan en función de la relación de concentraciones iniciales hasta un valor próximo al 85% a una relación de 3,5. También se puede observar que a relaciones superiores a 2,8 un exceso de B no

aumenta significativamente la eficiencia de la reacción. Por otro lado, una elevada relación  $B_0/A_0$  implicaría trabajar con concentraciones iniciales de A bastante bajas debido al límite de solubilidad de B en este medio y, por tanto, se obtendría una baja productividad. Por lo tanto, se propone que la relación óptima de  $B_0/A_0$  para obtener un adecuado rendimiento y selectividad es una relación de 3. El rendimiento y selectividad de reacción obtenidos a esta relación se pueden considerar lo suficientemente elevados como para no justificar el empleo una estrategia de adiciones puntuales de DHAP como la que se utilizó con FucA para mantener el elevado exceso de B en el biorreactor necesario en ese caso (Suau, 2007).

**Tabla 4.5.** Efecto de la relación de concentraciones iniciales de reactivos ( $B_0/A_0$ ) sobre el rendimiento y selectividad de la adición aldólica entre dihidroxiacetona fosfato (A) y (S)-Cbz-alaninal (B) catalizada por ramnulosa-1-fosfato aldolasa a 4°C en medio 50 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 20% v/v DMF, pH 7,0.

$B_0/A_0$	Rendimiento (%)	Selectividad(%)
1,1	62	69
1,4	70	73
2,1	77	80
2,8	82	83
3,5	84	85

## 4.5. Conclusiones

En este apartado se ha realizado la modelización de la adición aldólica entre dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y (S)-Cbz-alaninal catalizada por ramnulosa-1-fosfato aldolasa a 4°C en medio 50 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 20% v/v DMF, pH 7,0 (ecuaciones 4.17 y 4.18). El modelo cinético obtenido se corresponde a un mecanismo ordenado de dos sustratos con una reacción secundaria de degradación enzimática de DHAP que presenta una cinética de Michaelis-Menten de un sustrato. En cuanto a la

presencia de mecanismos de inhibición, la reacción de síntesis del producto de adición se ajusta a un modelo con inhibición competitiva por metilglioxal y por producto mientras que la reacción secundaria se ajusta a inhibición competitiva por metilglioxal. Este modelo ha sido validado frente a un experimento con concentraciones iniciales de los reactivos diferentes a las empleadas en la determinación de los parámetros cinéticos obteniéndose un buen ajuste del modelo a los datos experimentales.

El modelo cinético obtenido para la catálisis con ramnulosa-1-fosfato aldolasa (RhuA) se ha comparado con el obtenido por Suau y col. (2008) para la catálisis con fuculosa-1-fosfato aldolasa (FucA) en las mismas condiciones de reacción. A pesar de la elevada similitud de ambas enzimas se ha observado un diferente comportamiento frente a la inhibición de sustratos y productos. Mientras que FucA se ajusta a un modelo de inhibición no competitiva por (S)-Cbz-alaninal tanto en la reacción de síntesis como en la secundaria, en el caso de RhuA no se aprecia inhibición por este compuesto en las condiciones estudiadas. Por otro lado, ambas enzimas se ajustan a un modelo con inhibición competitiva por metilglioxal en la reacción de síntesis y en la secundaria, pero el modelo con FucA presenta un valor diferente de la constante de inhibición en cada reacción mientras que en RhuA se ha obtenido el mismo valor de la constante en ambas reacciones. Por otro lado, la catálisis con RhuA presenta una fuerte inhibición por producto que no se observa en el caso de FucA. En lo que refiere a la reacción secundaria, en la catálisis con RhuA se obtiene una menor velocidad de reacción que en el caso de FucA operando en las mismas condiciones.

Por último, se ha propuesto que la relación óptima de concentraciones iniciales de reactivos para obtener un elevado rendimiento y selectividad de la reacción es 3. En esas condiciones se han conseguido un rendimiento y selectividad superiores al 80% en la adición aldólica entre DHAP y (S)-Cbz-alaninal catalizada

por RhuA, por lo que no es necesario el empleo de una estrategia de adiciones puntuales de DHAP como sí ocurre en la biocatálisis con FucA.

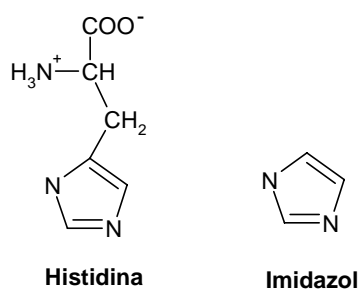
# Capítulo 5. BIOCATÁLISIS CON ALDOLASAS RECOMBINANTES INMOVILIZADAS EN SOPORTES DE AFINIDAD A METALES

## 5.1. Introducción

Los soportes de afinidad a metales consisten en una matriz de agarosa porosa en cuya superficie se encuentran una serie de grupos quelantes unidos a un metal divalente. Estos soportes han sido desarrollados para facilitar la purificación de enzimas recombinantes asociadas a una cola de histidinas mediante cromatografía IMAC (*immobilized metal affinity chromatography*) ya que el anillo aromático del residuo de histidina presenta elevada afinidad por el metal de la columna. Mediante esta técnica se puede obtener la separación de la enzima del resto de proteínas celulares de una manera totalmente selectiva, pudiéndose reducir el número de etapas de purificación y obtener, en algunos casos, la purificación en una sola etapa (García-Junceda y col., 1995).

La técnica IMAC está basada en la interacción por coordinación entre los iones metálicos divalentes que se encuentran inmovilizados en la superficie del soporte de la columna cromatográfica con los residuos quelantes de ciertos aminoácidos, principalmente con el anillo imidazol de la histidina. Para una correcta coordinación hace falta la presencia de varios residuos de este tipo adyacentes en la superficie de la enzima y accesibles al soporte. Esto se consigue normalmente mediante ingeniería genética, introduciendo en el vector de expresión de la enzima

los nucleótidos necesarios para expresar en uno de los extremos de la cadena de aminoácidos un cierto número de residuos de histidina (normalmente seis). De esta manera, estas enzimas recombinantes de fusión a una cola de poli-histidinas quedarán retenidas en la columna cromatográfica ya que presentan una afinidad por el metal inmovilizado mucho mayor que la del resto de proteínas intracelulares, por lo que se puede realizar una separación altamente selectiva en una sola etapa cromatográfica. Debido a que la unión de las histidinas de la enzima recombinante con el metal inmovilizado es reversible, la recuperación de ésta se hace fácilmente mediante elución con una disolución de imidazol de concentración suficiente para competir con las histidinas por las posiciones de coordinación del metal (figura 5.1).



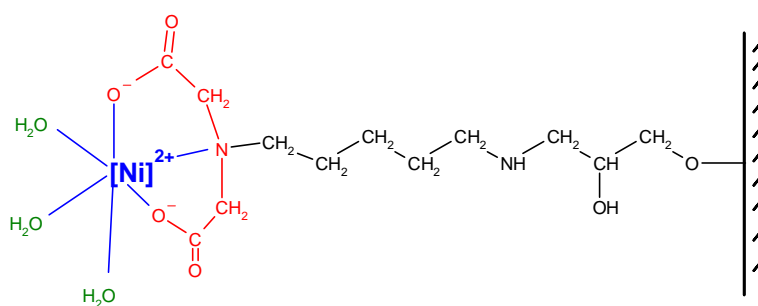
**Figura 5.1.** Similitud entre la estructura química del aminoácido histidina y del compuesto imidazol.

Los soportes de afinidad a metales más utilizados están basados en agarosa como matriz principal. Estos soportes presentan una serie de residuos funcionales que quelan el metal en ciertas posiciones de su esfera de coordinación, mientras que dejan libres el resto de posiciones para la unión con la cola de histidinas de la proteína recombinante. Los residuos funcionales se unen al soporte mediante una cadena carbonada llamada brazo espaciador, que puede variar de longitud según el caso. Los metales empleados suelen ser  $Zn^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$  o  $Ni^{+2}$ .

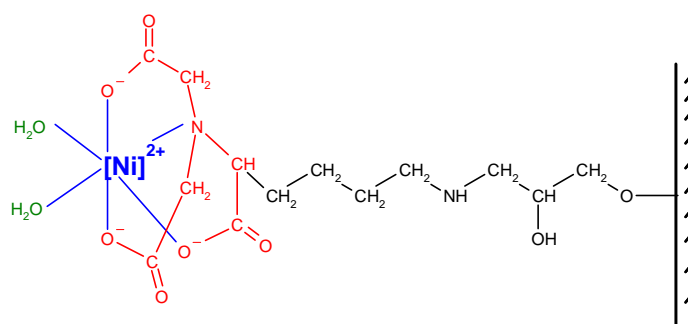
La molécula quelante más empleada es el ácido iminodiacético (IDA), que ocupa tres posiciones de la esfera de coordinación del metal, dejando las otras tres posiciones para la unión con las histidinas (figura 5.2). Esta unión del metal al soporte



únicamente por tres puntos hace que pueda producirse pérdida del metal ante algunas proteínas altamente quelantes o durante los lavados. Otro posible agente quelante es el ácido nitrilotriacético (NTA), que posee una estructura bastante similar a la anterior pero con un tercer grupo acético por lo que quela el metal por una posición más, dejando dos posiciones libres para la coordinación con las histidinas de la proteína (figura 5.3). Esta unión más fuerte entre el metal y la matriz hace disminuir las pérdidas de metal que ocurrían en el caso de los soportes IDA (Qiagen, 2003).



**Figura 5.2.** Esquema de la estructura química del soporte de afinidad Ni-IDA.



**Figura 5.3.** Esquema de la estructura química del soporte de afinidad Ni-NTA.

La capacidad de los soportes de afinidad IMAC de retener enzimas recombinantes ofrece una interesante alternativa en la inmovilización de estas enzimas. Si la unión entre la enzima y el soporte fuese lo suficientemente fuerte como para poder emplearse como biocatalizador en reacciones de síntesis, al hacer pasar el lisado celular que contiene la enzima recombinante por la columna de

purificación se estaría obteniendo directamente el derivado inmovilizado sin necesidad de tener que eluir la enzima e inmovilizarla posteriormente. Este proceso de purificación e inmovilización enzimática en un único paso permite, por tanto, la reducción del número de etapas y de las pérdidas de actividad enzimática total que ocurren en los procesos de purificación, con el consiguiente ahorro de costes. Otra ventaja de esta estrategia es que, una vez que la enzima unida al soporte se inactiva tras diversos ciclos catalíticos, ésta se puede desorber del soporte mediante elución con imidazol y se puede cargar de nuevo con enzima activa. Esta posibilidad de reutilización del soporte contribuye también a la reducción de los costes del proceso biocatalítico (Ho y col., 2004).

Con el fin de evaluar la viabilidad del proceso de purificación e inmovilización simultáneas con aldolasas recombinantes, en primer lugar se estudiaron diversas características de la inmovilización sobre estos soportes, como la temperatura de inmovilización, la densidad del metal quelado en la superficie del soporte, el tipo de metal y la naturaleza del grupo quelante, con la enzima fuculosa-1-fosfato aldolasa purificada. A partir de este estudio se seleccionó el soporte y las condiciones de inmovilización en las que se obtuvieron un mayor valor de rendimiento de inmovilización y actividad retenida y se llevó a cabo la inmovilización de la aldolasa a partir de lisado celular. Se estudió la estabilidad de estos derivados en el medio de reacción con dimetilformamida como cosolvente empleado en la adición aldólica entre DHAP y (S)-Cbz-alaninal y también se llevó a cabo la biocatálisis de esta reacción. Posteriormente, se empleó el mismo proceso de purificación e inmovilización en un solo paso con otra aldolasa recombinante, la ramnulosa-1-fosfato aldolasa y se analizó su aplicación en la biocatálisis de la misma reacción de adición aldólica.

## 5.2. Inmovilización de fuculosa-1-fosfato aldolasa recombinante

### 5.2.1. Optimización de las condiciones de inmovilización

La enzima fuculosa-1-fosfato aldolasa se ha inmovilizado en soportes de afinidad a metales (IMAC) en diferentes condiciones para seleccionar aquellas en las que se obtiene un mejor rendimiento de inmovilización y una actividad retenida más alta (tabla 5.1). Como agente quelante del metal en la superficie del soporte se estudiaron el ácido iminodiacético (IDA) y el ácido nitrilotriacético (NTA). En total se estudiaron once soportes diferentes: dos soportes de IDA de alta densidad cargados con Ni<sup>2+</sup> y Co<sup>2+</sup> suministrados por GE Healthcare, dos soportes de NTA de alta densidad cargados con Ni<sup>2+</sup> y Co<sup>2+</sup> de Qjagen, cuatro soportes de IDA de alta densidad cargados con Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> y Co<sup>2+</sup> de Hispanagar y tres soportes de IDA de baja densidad cargados con Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> y Zn<sup>2+</sup> de la misma casa comercial. Por otro lado, los soportes Ni-IDA y Ni-NTA se utilizaron como soportes de inmovilización para estudiar el efecto de la temperatura sobre la inmovilización.

**Tabla 5.1.** Parámetros del estudio de soportes de afinidad a metales en la inmovilización de fuculosa-1-fosfato aldolasa purificada.

<i>Parámetro</i>	<i>Valores estudiados</i>
Temperatura	4°C, 24°C
Alta densidad	20-35 μmol Me <sup>2+</sup> /mL soporte
Baja densidad	5-20 μmol Me <sup>2+</sup> /mL soporte
Tipo de metal quelado	Ni <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup>
Grupo quelante	IDA, NTA
Actividad ofrecida	14-22 UA/mL soporte
Medio de inmovilización	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 300 mM NaCl, 20 mM imidazol
pH	8,0
Agitación	Horizontal

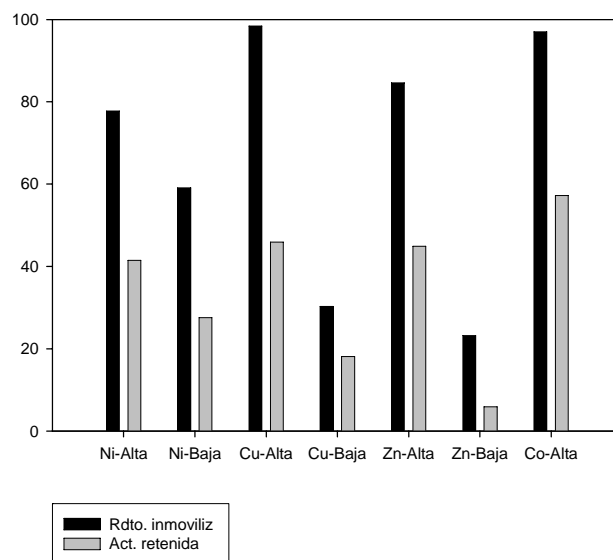
En primer lugar se estudió el efecto de la temperatura y la naturaleza del agente quelante del metal del soporte. Para ello se realizaron cuatro inmobilizaciones a 4°C y 24°C con el soporte Ni-IDA de GE Healthcare y con el soporte Ni-NTA. El rendimiento de inmobilización y la actividad retenida en cada caso se muestran en la tabla 5.2. En el caso de los soportes Ni-IDA, tanto a 4°C como a 24°C se obtiene un rendimiento de inmobilización muy próximo al 100% lo que implica que prácticamente toda la enzima se ha inmobilizado en el soporte. Sin embargo se observa una pérdida de actividad cercana al 60% en ambos casos durante la inmobilización. En el caso de los soportes Ni-NTA, el rendimiento de inmobilización es de nuevo muy cercano al 100% en los dos casos si bien la actividad retenida a ambas temperaturas es ligeramente superior a la observada en los anteriores soportes. No obstante, esta diferencia no es lo suficientemente elevada como para justificar el uso de los soportes NTA dado que estas resinas tienen un precio más elevado. Por otro lado, las diferencias entre realizar la inmobilización a 4°C y 24°C tanto para la resina IDA como para la NTA no son muy elevadas ni en términos de rendimiento de inmobilización ni en actividad retenida. Por lo tanto, y teniendo en cuenta que se busca el desarrollo de un proceso de purificación e inmobilización en un solo paso, se seleccionó la temperatura de 4°C ya que a esta temperatura se reducen las pérdidas de actividad de la enzima soluble durante el transcurso de la cromatografía de afinidad.

**Tabla 5.2.** Rendimiento de inmobilización y actividad retenida en la inmobilización de FucA purificada en soportes de afinidad a metales Ni-IDA y Ni-NTA a 4°C y 24°C.

<i>Tipo de soporte</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Rendimiento (%)</i>	<i>Actividad retenida (%)</i>
Ni-IDA	4	99	39
Ni-IDA	24	100	45
Ni-NTA	4	100	50
Ni-NTA	24	99	52

En segundo lugar se estudió el efecto de la densidad de grupos quelantes y el tipo del metal en soportes IDA realizando la inmovilización a 4°C. Se emplearon soportes de alta y de baja densidad de grupos quelantes cargados con  $\text{Ni}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$  y  $\text{Co}^{+2}$  suministrados por la casa comercial Hispanagar. Los rendimientos de inmovilización y la actividad retenida en cada inmovilización se muestran en la figura 5.4. Atendiendo a la densidad de grupos quelantes se puede observar que, independiente del metal utilizado, tanto el rendimiento de inmovilización como la actividad retenida de los soportes de baja densidad son menores que en los de alta densidad. Comparando los soportes de alta densidad, los rendimientos de inmovilización más elevados se obtienen en los soportes cargados con  $\text{Cu}^{+2}$  y  $\text{Co}^{+2}$ . En cuanto a la actividad retenida, el valor más elevado se obtiene en el caso del soporte cargado con  $\text{Co}^{+2}$ , para el que se alcanza un valor próximo al 60%. Las diferencias de rendimiento observadas en función del metal quelado en el soporte pueden estar relacionadas con la fuerza de la unión de dicho metal a la cola de histidinas de la enzima. Por otro lado, estudios realizados por diversos autores indican que la sustitución del metal del centro activo de diferentes metaloenzimas dependientes de  $\text{Zn}^{+2}$  por otros metales divalentes puede provocar una variación de su actividad enzimática y, en algunos casos, se observó un aumento de la actividad en el caso de reemplazar el metal de la enzima con cobalto (Dreyer y Schulz, 1996b). Esto hace pensar que las diferencias en actividad retenida observadas en los soportes podrían deberse en parte a un posible intercambio del metal del soporte con el  $\text{Zn}^{+2}$  del centro activo de la enzima.

Tras estudiar diversas características de los soportes de afinidad a metales se ha seleccionado para realizar la purificación e inmovilización en un solo paso el soporte IDA de alta densidad cargado con  $\text{Co}^{+2}$ , con el que se ha obtenido un rendimiento de inmovilización próximo al 100% y una actividad retenida cercana al 60%.



**Figura 5.4.** Rendimiento de inmovilización y actividad retenida en la inmovilización a 4°C de FucA purificada en soportes de afinidad a metales IDA de alta (20-35  $\mu\text{mol Me}^{+2}/\text{mL}$  de soporte) y baja densidad (5-20  $\mu\text{mol Me}^{+2}/\text{mL}$  de soporte) cargados con  $\text{Ni}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$  y  $\text{Co}^{+2}$ .

## 5.2.2. Estudio de la purificación de FucA recombinante

A la vista del aumento de actividad retenida en el soporte Co-IDA frente al mismo soporte cargado con níquel a 4°C, se planteó modificar el proceso de purificación de fuculosa-1-fosfato aldolasa recombinante sustituyendo el níquel de la columna IDA que se empleaba hasta el momento por cobalto (apartado 3.3.2). Dado que el soporte IDA empleado en la purificación era de una casa comercial distinta a los soportes del estudio de metales, se decidió comprobar en primer lugar que el soporte de la columna de purificación cargado con cobalto también presentaba un aumento de la actividad retenida en una inmovilización con FucA purificada (tabla 5.3). Se puede observar que con este soporte también se obtiene una actividad retenida próxima al 60% tal y como se había obtenido anteriormente.

**Tabla 5.3.** Rendimiento de inmovilización y actividad retenida de la inmovilización de FucA purificada en soporte de GE Healthcare (IDA) cargado con cobalto y níquel a 4°C.

<i>Tipo de soporte</i>	<i>Rendimiento (%)</i>	<i>Actividad retenida (%)</i>
Ni-IDA	99	39
Co-IDA	96	60

A continuación se realizó una purificación de fuculosa-1-fosfato aldolasa recombinante a partir de lisado celular empleando una columna IDA cargada con cobalto y se comparó con los resultados que se habían obtenido anteriormente con la misma columna cargada con níquel. Como se puede observar en la tabla 5.4, en ambas purificaciones prácticamente toda la actividad enzimática se retiene en la columna, representando aproximadamente un 25% de la proteína total. Sin embargo, tras la elución con imidazol, en el caso del soporte Co-IDA se recupera toda la actividad cargada en la columna mientras que en la columna Ni-IDA la actividad recuperada tras la elución era solamente del 44%, a pesar de que el rendimiento en proteína era similar en ambos casos.

En el caso de la purificación en columna de Ni-IDA, a continuación se incubó la enzima en una disolución de  $Zn^{+2}$  que permite la recuperación de parte de la actividad perdida en el paso de cromatografía. Por eso, el rendimiento en actividad del paso conjunto de incubación y precipitación en esta purificación es superior al 100%. El aumento de actividad tras incubación en  $Zn^{+2}$  es un indicio de la posible pérdida de este metal tras su paso por la columna cromatográfica o un posible intercambio con el  $Ni^{+2}$  del soporte, recuperando parte de la actividad enzimática tras la incubación con  $Zn^{+2}$ . Sin embargo, en el caso de la purificación en columna de Co-IDA, una incubación en  $Zn^{+2}$  posterior a la elución no producía ningún aumento de la actividad por lo que se precipitó directamente con sulfato amónico tras el paso por la columna cromatográfica. En este caso, la posible pérdida del  $Zn^{+2}$  de la enzima nativa o el posible intercambio por el  $Co^{+2}$  de la columna no produce una

modificación apreciable de la actividad enzimática. Tras la precipitación con sulfato amónico se obtuvo un rendimiento en proteína similar al obtenido en la anterior purificación y coincide con el rendimiento en actividad. En conclusión se puede observar que el cambio de metal de níquel a cobalto en la columna empleada en purificación de fuculosa-1-fosfato aldolasa permite aumentar el rendimiento global del proceso con respecto a la actividad recuperada del 61% obtenido con Ni-IDA a un 83% con Co-IDA.

**Tabla 5.4.** Resumen del rendimiento de los diferentes pasos de la purificación de un lisado celular de FucA mediante IMAC en columna cargada con Ni<sup>+2</sup> (24700 UA y 7410 mg de proteína) y Co<sup>+2</sup> (8760 UA y 4870 mg de proteína).

<i>Metal columna</i>	<i>Cromatografía de afinidad</i>				<i>Incubación Zn<sup>+2</sup> + Precipitación</i>		<i>Rdto global</i>	
	<i>No retenida</i>		<i>Eluida</i>		<i>Act (%)</i>	<i>Prot (%)</i>	<i>Act (%)</i>	<i>Prot (%)</i>
	<i>Act (%)</i>	<i>Prot (%)</i>	<i>Act (%)</i>	<i>Prot (%)</i>				
Ni <sup>+2</sup>	1	75	44	25	138	88	61	22
Co <sup>+2</sup>	2	72	102	22	81	80	83	20

### 5.2.3. Contenido en metal de FucA purificada

A partir de los resultados obtenidos en el estudio de los soportes de afinidad cargados con distintos metales y en la purificación de la enzima por IMAC en columnas cargadas con Ni<sup>+2</sup> y Co<sup>+2</sup>, se han observado indicios de un posible intercambio del metal del centro activo de la enzima con el metal del soporte. Con objeto de comprobar esta hipótesis, se llevó a cabo un análisis semicuantitativo del contenido en metales de la enzima proveniente de dos purificaciones realizadas con soporte de afinidad IDA quelado con Ni<sup>+2</sup> y Co<sup>+2</sup> respectivamente. En estas dos purificaciones se suprimió la etapa de incubación en disolución de zinc que se realizaba en las purificaciones convencionales tras la elución para no variar el contenido de metal de la enzima tras su paso por la columna cromatográfica.



Mediante el análisis semicuantitativo del contenido de  $Zn^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$  y  $Co^{+2}$  de la enzima purificada de este modo y el análisis del contenido de proteína de las muestras, se puede calcular la cantidad de metal por gramo de proteína y compararlo con el contenido teórico de zinc en la enzima nativa que es  $42,1 \mu\text{mol } Zn^{+2}/\text{g}$  de proteína. Este valor se ha calculado a partir de la estructura de la enzima según la cual cada molécula de proteína ( $95,1 \text{ kDa}$ ) contiene 4 átomos de zinc. Como puede observarse en la tabla 5.5, en ambos casos se pudo detectar el metal procedente de la columna en la enzima purificada y un menor contenido de zinc respecto al teórico, confirmando de este modo el intercambio entre el  $Zn^{+2}$  presente en la enzima nativa con el metal del soporte al pasar por la columna cromatográfica durante el proceso de purificación por IMAC. Por otra parte, se produce también una pérdida del contenido total de metal en la enzima, siendo éste un 52% del contenido teórico para el soporte Ni-IDA y de un 63% para Co-IDA. Por lo tanto, y teniendo en cuenta que la actividad de la enzima eluída en columna de Co-IDA había sido el 100% de la inicialmente cargada (tabla 5.4), se confirma el aumento de la actividad enzimática de FucA al sustituir el  $Zn^{+2}$  del centro activo por  $Co^{+2}$ . Esta sustitución no produce ningún cambio significativo en la configuración del centro activo salvo una ligera modificación del residuo que participa en la unión de la DHAP (Dreyer y Schulz, 1996b) por lo que no se espera que la catálisis y estereoquímica del producto formado se vean modificadas significativamente.

**Tabla 5.5.** Contenido en metal de fuculosa-1-fosfato aldolasa tras purificaciones en columna de afinidad cargada con níquel o cobalto y porcentaje respecto del contenido teórico de zinc de la enzima nativa ( $42,1 \mu\text{mol } Zn^{+2}/\text{g}$  de proteína).

Columna	$Ni^{+2}$		$Co^{+2}$		$Zn^{+2}$		Metal total	
	( $\mu\text{mol/g prot.}$ )	(%)	( $\mu\text{mol/g prot.}$ )	(%)	( $\mu\text{mol/g prot.}$ )	(%)	( $\mu\text{mol/g prot.}$ )	(%)
Ni-IDA	17,3	41	No detectado	-	4,7	11	22,0	52
Co-IDA	No detectado	-	21,0	50	5,6	13	26,6	63

#### 5.2.4. Biocatálisis con fuculosa-1-fosfato aldolasa inmovilizada

Con el objetivo de analizar la viabilidad del proceso de purificación e inmovilización de FucA en un solo paso es necesario, por un lado, estudiar la inmovilización por afinidad a metal quelado a partir de la mezcla de proteínas del lisado celular y, por otro lado, obtener mediante esta técnica derivados de alta carga enzimática para su empleo como biocatalizadores en reacciones de interés y analizar su estabilidad en las condiciones de reacción. En este apartado se estudiará el comportamiento de los derivados inmovilizados de FucA de alta carga enzimática como catalizadores de la reacción de adición aldólica entre dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y (S)-Cbz-alaninal en medio 50 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 20% v/v DMF, pH 7,0. Como se ha visto anteriormente, el metal presente en la columna modifica la actividad enzimática de la enzima es decir, el comportamiento catalítico de la enzima frente a la reacción del ensayo enzimático, de diferente manera dependiendo de la naturaleza del metal. Para poder determinar un posible efecto del metal sobre la catálisis de la reacción de interés se seleccionó el soporte IDA cargado con Ni<sup>+2</sup> y Co<sup>+2</sup>. El soporte Co-IDA se eligió por ser el soporte con el que se habían obtenido menores pérdidas de actividad en la inmovilización a partir de FucA purificada y el soporte Ni-IDA por ser el soporte con el que se tenía establecida una metodología de purificación.

##### *5.2.4.1. Preparación de derivados inmovilizados de FucA*

Para obtener unos derivados inmovilizados de alta carga enzimática de FucA sobre soportes de afinidad a metales, se realizaron dos inmovilizaciones sobre soportes Ni-IDA y Co-IDA a partir del lisado obtenido de un cultivo de alta densidad celular. Considerando que la actividad retenida del soporte Ni-IDA es un 40% y la

del soporte Co-IDA un 60%, valores obtenidos a partir de los resultados de las inmovilizaciones a partir de FucA purificada, se calculó la actividad ofrecida necesaria para obtener unos derivados inmovilizados de 30 UA/mL de soporte, resultando una actividad ofrecida de 75 UA/mL de soporte para Ni-IDA y 50 UA/mL de soporte para Co-IDA. Se seleccionó la carga enzimática de 30 UA/mL de soporte para poder comparar el comportamiento catalítico de estos derivados inmovilizados con los resultados obtenidos en la catálisis a 25°C con enzima soluble (3 UA/mL) empleando una relación entre el volumen de soporte y el volumen total de reacción de 1:10. Las inmovilizaciones se llevaron a cabo a 4°C.

Comparando entre sí el comportamiento de las dos resinas en la inmovilización a partir de lisado celular (tabla 5.6) se observa, al igual que en el caso de la enzima purificada, que para el soporte IDA cargado con cobalto se obtiene una mayor actividad retenida que para el mismo soporte cargado con níquel. El porcentaje de actividad retenida que se obtiene en ambos casos es inferior a la correspondiente a las inmovilizaciones realizadas a partir de FucA purificada debido a que en estos experimentos la actividad ofrecida es muy superior al caso anterior y el derivado puede presentar, por tanto, limitaciones difusionales a la hora de determinar su actividad. Esto ocurre porque existe un límite de carga enzimática a partir de la cual la cinética de la conversión de sustratos en productos deja de estar limitada por la velocidad de la reacción catalítica y comienza a verse influida por la velocidad de la difusión de reactivos y productos en el interior de los poros del soporte. Dado que la determinación de la actividad enzimática se realiza a partir de la velocidad de conversión de sustratos, la actividad observada bajo limitaciones difusionales será un valor inferior a la actividad enzimática real que se encuentra inmovilizada y el factor de eficacia  $\eta$ , que corresponde a la relación entre la velocidad de la reacción observada y la velocidad de la reacción que se obtendría en ausencia de limitaciones por difusión, será inferior a la unidad (apartado 1.4.2).

**Tabla 5.6.** Rendimiento de inmovilización y actividad retenida de la inmovilización de FucA proveniente de un lisado celular en soporte de GE Healthcare (IDA) cargado con cobalto y níquel a 4°C.

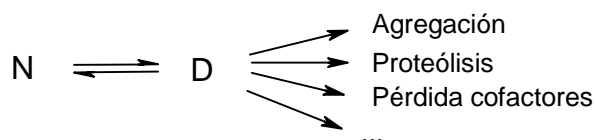
<i>Tipo de soporte</i>	<i>Rendimiento (%)</i>	<i>Actividad retenida (%)</i>
Ni-IDA	99	19
Co-IDA	98	33

#### *5.2.4.2. Estabilidad de derivados inmovilizados de FucA*

Para emplear la fuculosa-1-fosfato aldolasa inmovilizada en soportes de afinidad como biocatalizador en reacciones de síntesis, se ha de comprobar en primer lugar que estos derivados son estables en el medio de reacción de la adición aldólica de interés. Este medio contiene dimetilformamida al 20% v/v como cosolvente para obtener la adecuada solubilidad de ambos reactivos, dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y (S)-Cbz-alaninal.

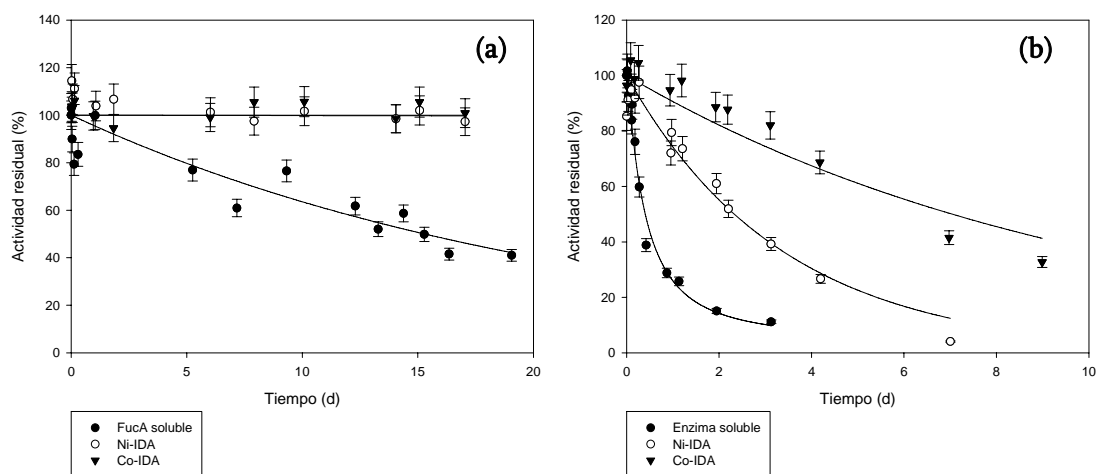
Las enzimas pueden sufrir procesos de inactivación irreversible en presencia de disolventes orgánicos (Budde y Khmel'nitsky, 1999). Estos procesos ocurren normalmente siguiendo un mecanismo en dos pasos; en primer lugar la enzima nativa en solución se encuentra en equilibrio con una forma inactiva parcialmente desplegada (inactivación reversible) y esta forma parcialmente desplegada puede sufrir algunos procesos de inactivación irreversible como agregación, proteólisis, modificación de residuos de aminoácidos, eliminación de coenzimas, pérdida de monómeros en proteínas oligoméricas o plegamientos incorrectos de la proteína (Mozhaev, 1993) (figura 5.5). La inmovilización de la enzima sobre un soporte rígido contribuye a la reducción de los procesos de inactivación enzimática ya que se eliminan los fenómenos de inactivación irreversible que implican un choque entre moléculas y, por otro lado, la inmovilización provoca una mayor rigidez en la

estructura de la enzima por lo que la cantidad de enzima parcialmente desplegada será menor y, por tanto, la inactivación irreversible se dará en menor medida.



**Figura 5.5.** Esquema de los fenómenos de inactivación enzimática: equilibrio reversible entre la estructura nativa (N) y estructura parcialmente desplegada (D) e inactivación irreversible debido a fenómenos de agregación, proteólisis, modificación de residuos de aminoácidos, eliminación de coenzimas, pérdida de monómeros en proteínas oligoméricas o plegamientos incorrectos de la proteína.

La estabilidad de los biocatalizadores inmovilizados de alta carga en el medio de reacción de la adición aldólica de interés (50 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 20% v/v DMF, pH 7,0) se estudió a 4°C y 24°C (figura 5.6). En ambos casos se ha obtenido una mayor estabilidad de los derivados inmovilizados respecto de la enzima soluble. En el caso de la incubación a 4°C, tanto el derivado inmovilizado en Ni-IDA como en Co-IDA conservaban prácticamente el 100% de la actividad inicial tras 19 días de incubación mientras que la enzima soluble presentaba únicamente un 40%. En la incubación a 24°C también se ha obtenido una mayor estabilidad de los derivados inmovilizados en comparación con la enzima soluble, siendo el biocatalizador más estable el inmovilizado en Co-IDA. Por otro lado, no se detectó actividad en el sobrenadante en ninguna de las incubaciones de los derivados inmovilizados lo que implica que, pese a la reversibilidad del enlace enzima-soporte, este equilibrio está suficientemente desplazado en el medio de reacción empleado como para evitar una desorción apreciable de la enzima, independientemente del metal que esté presente en el soporte. Por lo tanto, este tipo de inmovilización es eficaz en la estabilización de la enzima en el medio de reacción con dimetilformamida como cosolvente empleado.



**Figura 5.6.** Estabilidad de FucA soluble e inmovilizada en Ni-IDA y Co-IDA en el medio de reacción de la adición aldólica de interés (50 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 20% v/v DMF, pH 7,0): (a) incubación a 4°C y (b) incubación a 24°C.

#### 5.2.4.3. Adición aldólica catalizada por derivados inmovilizados de FucA

La reacción seleccionada para evaluar el empleo de fuculosa-1-fosfato aldolasa inmovilizada en soportes de afinidad a metales mediante un proceso de purificación e inmovilización simultánea fue la adición aldólica entre dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y (S)-Cbz-alaninal en un medio acuoso con dimetilformamida como cosolvente. Esta reacción había sido estudiada con anterioridad a 25°C catalizada por fuculosa-1-fosfato aldolasa soluble con una actividad ofrecida de 3 UA/mL empleando las mismas concentraciones iniciales de reactivos (Suau y col., 2006).

Para el estudio de esta misma reacción catalizada por la enzima inmovilizada en soportes Ni-IDA y Co-IDA se emplearon los derivados inmovilizados de alta carga preparados a partir de lisado celular con una actividad ofrecida de 75 y 50 UA/mL de soporte respectivamente. Considerando la actividad enzimática observada que presentan los derivados inmovilizados (19% en el caso de Ni-IDA y 33% en Co-IDA), se añadió la cantidad necesaria para ofrecer 3 UA/mL de suspensión a la mezcla de

reacción. Estos derivados inmovilizados presentan limitaciones difusionales a la hora de determinar su actividad mediante el ensayo enzimático por lo que la actividad enzimática real inmovilizada es superior.

En efecto, los derivados inmovilizados en soportes de afinidad catalizan satisfactoriamente la adición aldólica propuesta, tal y como se muestra en la tabla 5.7. En primer lugar, la velocidad de reacción obtenida en el caso de los biocatalizadores inmovilizados fue muy superior a la correspondiente a la enzima soluble, que corresponde a FucA purificada en columna de Ni-IDA con una posterior incubación en  $Zn^{+2}$ . Esto se debe a que la reacción de adición aldólica presenta una velocidad inferior a la velocidad de la reacción del ensayo enzimático ya que se lleva a cabo con un aldehído diferente al sustrato natural de la enzima y la velocidad de difusión, aunque puede haber sufrido alguna variación, no limitaría el proceso en la misma medida. Esto quiere decir que los reactivos es probable que puedan difundir más profundamente en el interior de los poros donde se encuentra inmovilizada una alta carga enzimática y, por tanto, la cantidad de enzima susceptible de catalizar la reacción de adición sea bastante mayor de la supuesta.

Puesto que en la adición aldólica entre DHAP y (S)-Cbz-alaninal se da simultáneamente una reacción secundaria de degradación de DHAP tanto química como enzimática (ver apartado 1.6), la selectividad de la reacción en los tres casos es inferior al 100%. Sin embargo, el hecho de inmovilizar la enzima sobre los soportes de afinidad hace que la selectividad aumente hasta un valor de 70% en el caso de la enzima inmovilizada en Co-IDA. Este aumento en la selectividad también se traduce en un aumento del rendimiento de la reacción ya que un porcentaje mayor del reactivo limitante, la DHAP, progresa a la formación de producto. En el caso de no existir reacciones secundarias en el sistema, las diferencias entre los catalizadores serían solamente cinéticas y el rendimiento sería el correspondiente al equilibrio para todos los casos. Sin embargo, la presencia de reacciones secundarias implica que el

rendimiento global del proceso venga determinado por la velocidad relativa entre las distintas reacciones que se dan en el sistema. Por lo tanto se deduce que, al igual que la presencia de níquel o cobalto en el soporte de afinidad modifica en distinta medida la actividad de la fuculosa-1-fosfato aldolasa frente a la actividad del ensayo enzimático, estos metales también influyen en distinto grado tanto la reacción de adición aldólica como la reacción secundaria, obteniéndose los resultados más favorables en el caso de la inmovilización de fuculosa-1-fosfato aldolasa en el soporte Co-IDA.

**Tabla 5.7.** Velocidad inicial de reacción, rendimiento y selectividad en la adición aldólica entre dihidroxiacetona fosfato y (S)-Cbz-alaninal a 25°C catalizada por fuculosa-1-fosfato aldolasa soluble e inmovilizada en soportes IDA cargados con níquel y cobalto. Condiciones iniciales: 30 mM DHAP, 49 mM (S)-Cbz-alaninal y 3 UA/mL de reacción.

<i>Biocatalizador</i>	<i>r<sub>0</sub> (mM/h)</i>	<i>Rendimiento (%)</i>	<i>Selectividad (%)</i>
FucA soluble	4,2	44	46
Ni-IDA	160	57	63
Co-IDA	236	63	70

Una de las reacciones secundarias, la degradación química de DHAP, presenta una baja velocidad de reacción cuando se trabaja a 4°C (Suau y col., 2007). Se propuso estudiar la biocatálisis de la reacción de adición aldólica entre DHAP y (S)-Cbz-alaninal a 4°C con FucA inmovilizada en el soporte Co-IDA, que es el soporte con el que se ha obtenido un mejor rendimiento y selectividad a 25°C, en las mismas condiciones de inmovilización. Como se puede observar en la tabla 5.8, al reducir la velocidad de una de las reacciones secundarias se ha producido un aumento tanto del rendimiento de la reacción, alcanzando un valor de 82%, como de la selectividad, obteniéndose un valor del 85%.



**Tabla 5.8.** Rendimiento y selectividad en la adición aldólica entre dihidroxiacetona fosfato y (S)-Cbz-alaninal a 4°C catalizada por fuculosa-1-fosfato aldolasa inmovilizada en soportes Co-IDA. Condiciones iniciales: 31 mM DHAP, 47 mM (S)-Cbz-alaninal y 3 UA/mL de reacción.

<i>Biocatalizador</i>	<i>Rendimiento (%)</i>	<i>Selectividad (%)</i>
Co-IDA	82	85

### 5.2.5. Limitaciones difusionales en derivados inmovilizados de FuCA

Como ya se ha comentado previamente (apartado 1.4.2), para trabajar con derivados inmovilizados como catalizadores en reacciones de síntesis interesa que éstos tengan una carga elevada pero que la difusión de sustratos no afecte a la cinética del proceso. Por tanto, se han de encontrar unas condiciones de trabajo en las que se maximice la actividad contenida en el soporte sin que aparezcan limitaciones difusionales.

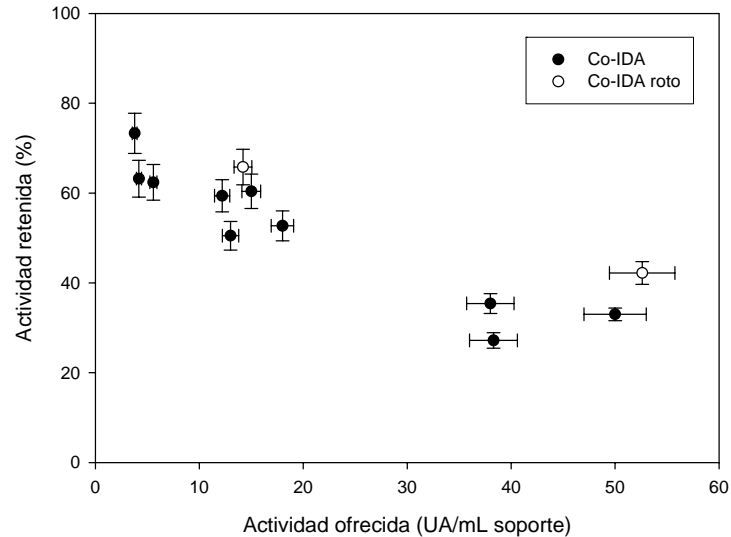
La carga enzimática a la que empiezan a aparecer limitaciones difusionales depende del tipo de reacción catalítica que se emplee y, más en concreto, de su velocidad. La reacción que se emplea para la determinación de la actividad enzimática se realiza en condiciones óptimas de pH y temperatura y frente a su sustrato natural, la L-fuculosa-1-fosfato, por lo que la velocidad de reacción es elevada. En la catálisis de otras reacciones de síntesis, la velocidad de reacción es muy probable que sea menor y, siempre que se utilicen sustratos con una velocidad de difusión similar, las limitaciones difusionales aparecerán a cargas enzimáticas más altas que para la reacción del ensayo enzimático.

Para determinar el límite de operación sin limitaciones difusionales del soporte Co-IDA frente a la reacción del ensayo enzimático, se representó el porcentaje de actividad retenida en el derivado inmovilizado frente a la actividad ofrecida inicialmente en un rango de 5-50 UA/mL de soporte (figura 5.7). En ausencia de limitaciones difusionales, el porcentaje de actividad retenida en el

soporte tras la inmovilización es independiente de la actividad ofrecida y depende sólo de las modificaciones que sufre la enzima al inmovilizarse. En el momento en comienzan a aparecer limitaciones difusionales, el porcentaje de actividad retenida disminuye ya que no es posible detectar toda la actividad enzimática que se encuentra inmovilizada en el soporte. En la inmovilización de FucA sobre el soporte Co-IDA se observa una disminución de la actividad retenida en todo el rango estudiado, incluso en las cargas más bajas que fueron analizadas. Esto quiere decir que aparecen limitaciones difusionales en estos biocatalizadores incluso trabajando a baja carga enzimática.

Para evitar la aparición de limitaciones difusionales es necesario hacer que el valor del factor de eficacia  $\eta$  (relación entre la velocidad de la reacción observada y la velocidad de la reacción que se obtendría en ausencia de limitaciones difusionales) sea la unidad, lo que se consigue reduciendo el valor del módulo de Thiele del sistema (apartado 1.4.2). En un biocatalizador inmovilizado con una determinada carga, el único parámetro de la definición del módulo de Thiele que se puede modificar es el tamaño de partícula (ecuación 1.1). El método que se utiliza generalmente para disminuir el tamaño de las partículas de agarosa es el de rotura mecánica, sometiendo el derivado enzimático a agitación magnética fuerte. Sin embargo, en el caso de los derivados enzimáticos de FucA en soportes de afinidad a metal quelado, al someterlos a agitación magnética fuerte se produce la desorción e inactivación de la enzima. Por ello, se decidió realizar la rotura mecánica del soporte previamente a la inmovilización y analizar el porcentaje de actividad retenida en este soporte (Co-IDA roto). Se puede observar en la figura 5.7 que empleando el soporte con menor tamaño de partícula se reducen en parte las limitaciones difusionales pero siguen apareciendo a cargas enzimáticas elevadas. Es posible, por tanto, que las limitaciones difusionales observadas también se produzcan por otras causas, como podría ser la inmovilización en multicapa en las zonas más accesibles del soporte poroso por lo que los sustratos

difunden con dificultad entre las capas de enzima, provocando la aparición de limitaciones difusionales incluso a tan baja carga enzimática.



**Figura 5.7.** Efecto de la carga enzimática de fuculosa-1-fosfato aldolasa sobre la actividad retenida en el biocatalizador inmovilizado.

Por lo tanto, para emplear un biocatalizador inmovilizado de FucA en soporte de Co-IDA en la reacción natural de la enzima y sin aparición de limitaciones difusionales es necesario trabajar a muy baja carga. En el caso de emplear estos biocatalizadores inmovilizados en otras reacciones catalíticas que presentan una velocidad de reacción inferior a la reacción natural, se puede prever que las limitaciones difusionales aparezcan con cargas enzimáticas más elevadas. Para cada reacción de síntesis particular se deberán estudiar las condiciones de inmovilización óptimas para seleccionar la carga enzimática adecuada y obtener así el biocatalizador más rentable en cada caso.

### 5.2.6. Carga enzimática máxima del soporte Co-IDA con FucA

Como se ha visto en el apartado anterior, en el estudio del efecto de la carga enzimática sobre la catálisis de fuculosa-1-fosfato aldolasa recombinante inmovilizada en soporte Co-IDA se han observado indicios de una posible inmovilización de la enzima en múltiples capas dado que se observan limitaciones difusionales incluso a cargas enzimáticas muy bajas. En diversas purificaciones de esta enzima realizadas mediante cromatografía IMAC en columna de Ni-IDA también se habían observado indicios de una posible inmovilización multicapa ya que estos soportes admitían una carga enzimática bastante superior al valor teórico suministrado por la casa comercial para estos soportes. Por lo tanto, se decidió determinar la carga enzimática máxima que admite el soporte Co-IDA o lo que es lo mismo, la cantidad de enzima capaz de saturar los grupos quelantes de la superficie de las partículas de soporte, con el fin de determinar la existencia de una posible inmovilización multicapa.

En primer lugar, se realizó una inmovilización en discontinuo a partir de enzima proveniente de lisado celular a una carga enzimática ofrecida muy elevada (1660 UA/mL de soporte) obteniéndose una carga inmovilizada de 1516 UA/mL de soporte (214 mg de proteína/mL de soporte). Sin embargo, a pesar de que este valor supera con mucho el valor de carga máxima suministrada por la casa comercial (10-20 mg de proteína/mL de soporte), el rendimiento de inmovilización fue muy elevado (92%). Se decidió entonces realizar una segunda carga de enzima sobre el soporte obtenido en esta última inmovilización. Para ello se filtró el derivado inmovilizado, se realizaron unos lavados con agua mili-Q y se realizó otra inmovilización con una carga enzimática ofrecida de 735 UA/mL de soporte empleando el mismo lisado celular de la primera carga. En esta ocasión, sí se alcanzó la saturación del soporte ya que el rendimiento de inmovilización fue del 71% siendo

la carga enzimática total inmovilizada en el soporte tras las dos etapas 2037 UA/mL de soporte (359 mg de proteína/mL de soporte). Sin embargo, posteriormente se observó una desorción parcial de la enzima inmovilizada al incubar el derivado inmovilizado en tampón de lisis (300 mM NaCl, 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 mM imidazol, pH 8,0). Este hecho llevó a pensar que es posible que la enzima se una inicialmente a los grupos quelantes del soporte formando un derivado estable en las condiciones de operación y que, una vez saturada la superficie del soporte, otras moléculas de enzima se unan a las moléculas de la primera capa a través de interacciones inespecíficas con las cadenas de aminoácidos de su superficie. Estas interacciones estarían favorecidas por una concentración elevada de enzima en el sobrenadante, pero al ser resuspendido el derivado inmovilizado en tampón exento de enzima, el equilibrio se vería desplazado hacia la desorción de esta segunda capa o posteriores. Por tanto, el valor de carga enzimática máxima, que corresponde únicamente a la cantidad de enzima que satura los grupos quelantes del soporte, sería inferior al valor observado en estos experimentos. Dada la dificultad de determinar la enzima desorbida en los lavados del derivado en el filtrado intermedio, se diseñó un nuevo experimento en columna que permite un mejor control del proceso.

Para determinar la carga enzimática máxima del soporte Co-IDA se empleó un sistema FPLC (*fast protein liquid chromatography*) para cargar el soporte, contenido en una pequeña columna cromatográfica, con una disolución de fuculosa-1-fosfato aldolasa recombinante de concentración elevada. Se recogieron fracciones a la salida de la columna y se analizó la cantidad de proteína y la actividad enzimática hasta que en éstas aparece la presencia de la enzima en concentración similar a la de entrada, momento en que se ha alcanzado la saturación del soporte. Para eliminar la enzima unida únicamente por interacciones débiles, se realizó un lavado con tampón de lisis y se analizó la actividad y proteína de estos lavados. Estableciendo un balance de materia considerando la enzima desorbida en los lavados y la cargada se puede

obtener indirectamente la enzima retenida en el soporte, que corresponde a la carga enzimática máxima que se desea conocer. La carga máxima obtenida en este experimento fue de 169 mg de proteína/mL de soporte. Este valor es bastante menor que el que se obtuvo en los experimentos en discontinuo pero es un orden de magnitud más elevado que los valores típicos para esta clase de resinas (10-20 mg de proteína/mL de soporte) por lo que es posible que la enzima se inmovilice en multicapa con una unión lo suficientemente estable como para evitar su desorción en presencia de tampón exento de enzima. La unión entre capas de enzima podría estar ocurriendo mediante la interacción de la cola de histidinas con el metal del centro activo de otras moléculas de enzima dado que está localizada en el extremo N-terminal que es móvil y se encuentra orientado hacia el exterior de la molécula de enzima.

### **5.3. Inmovilización de ramnulosa-1-fosfato aldolasa recombinante**

Una vez estudiada la purificación e inmovilización en un solo paso de la enzima fuculosa-1-fosfato aldolasa recombinante (FucA) en soportes de afinidad a metales y probada la eficacia de estos biocatalizadores inmovilizados en la adición aldólica entre dihidroxiacetona fosfato y (S)-Cbz-alaninal, se decidió aplicar la misma metodología a otra aldolasa dependiente de DHAP, la enzima ramnulosa-1-fosfato aldolasa (RhuA), que cataliza la misma reacción de adición aldólica para producir el diastereoisómero (3R, 4R) complementario (apartado 1.6). Esta enzima también se produce como una proteína de fusión a una cola de seis histidinas en el extremo N-terminal de la enzima.

Las enzimas fuculosa-1-fosfato aldolasa y ramnulosa-1-fosfato aldolasa presentan una elevada similitud tanto en su estructura y configuración de su centro activo, que contiene en ambos casos un átomo de  $Zn^{+2}$  esencial para la catálisis, como en el mecanismo de catálisis (apartado 1.5.3). Es posible, por tanto, que RhuA se comporte de una forma similar a FucA frente a la inmovilización en soportes de afinidad a metales. De hecho, en estudios anteriores a este trabajo se observó que la actividad específica de RhuA desorbida tras inmovilización en soportes de afinidad IDA cargados con diferentes metales divalentes ( $Ni^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$  y  $Co^{+2}$ ) variaba en función del metal del soporte, observando un aumento de la actividad específica en el caso del soporte cargado con cobalto (Ruiz, 2007). Por tanto, es probable que en el caso de RhuA también se esté produciendo un intercambio del  $Zn^{+2}$  presente en el centro activo de la enzima por el metal del soporte y que la sustitución por cobalto provoque un aumento de la actividad enzimática, tal y como ocurría en FucA. Por esta razón, se seleccionó el soporte Co-IDA para analizar la aplicación del método de purificación e inmovilización en un solo paso de RhuA en la biocatálisis de la adición aldólica de interés.

En primer lugar, se prepararon unos derivados inmovilizados de alta carga enzimática a partir de ramnulosa-1-fosfato aldolasa recombinante proveniente de lisado celular con una actividad ofrecida de 50 y 60 UA/mL de soporte. Al ser derivados inmovilizados de alta carga enzimática, nuevamente se observa un bajo porcentaje de actividad retenida en el soporte, debido probablemente a la existencia de limitaciones difusionales (tabla 5.9). Atendiendo al rendimiento de inmovilización, se observa que este valor es bastante menor al obtenido con FucA en los mismos soportes (próximo al 100%). En el caso de RhuA, aproximadamente un 30% de la enzima activa ofrecida permanece en el sobrenadante tras la inmovilización. Estos bajos rendimientos de inmovilización de RhuA recombinante en soportes de afinidad a metales habían sido observados anteriormente (Ruiz y col.,

2009). En estos estudios se observó que en función de la estrategia de cultivo empleada en la producción de la enzima recombinante se produce un diferente grado de proteólisis en las células, lo que influye en el porcentaje de RhuA que presenta cola de histidinas en el lisado celular. Como la enzima se une a los soportes de afinidad a metales a través de la cola de histidinas, el que exista un menor porcentaje de enzima que presente la cola de histidinas en el lisado celular provocará una disminución del rendimiento de inmovilización en los soportes de afinidad. Para asegurar la presencia de cola de histidinas en las moléculas de enzima se decidió continuar el estudio de la purificación e inmovilización simultánea de ramnulosa-1-fosfato aldolasa empleando enzima purificada mediante columna IMAC cargada con cobalto.

**Tabla 5.9.** Rendimiento de inmovilización y actividad retenida de la inmovilización a 4°C de ramnulosa-1-fosfato aldolasa de lisado celular en soporte Co-IDA.

<i>Act. ofrecida (UA/mL soporte)</i>	<i>Rendimiento (%)</i>	<i>Actividad retenida (%)</i>
50	70	9,1
61	79	8,6

### 5.3.1. Limitaciones difusionales en derivados inmovilizados de RhuA

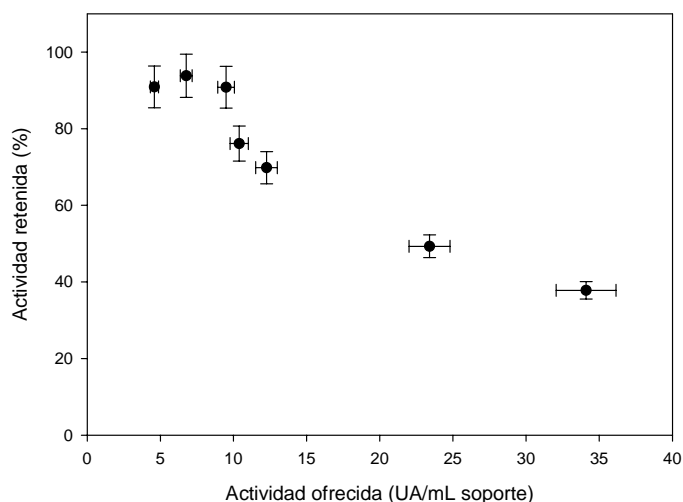
Como se ha comentado anteriormente, a la hora de emplear biocatalizadores inmovilizados en reacciones de síntesis interesa que éstos tengan una elevada carga enzimática pero que la difusión de sustratos no afecte a la cinética del proceso es decir, que no presenten limitaciones difusionales (apartado 1.4.2). Dado que la aparición de limitaciones difusionales depende de la reacción a catalizar, se determinó el efecto de la carga enzimática de los derivados inmovilizados sobre la actividad catalítica tanto en la reacción empleada en el ensayo enzimático como en la reacción de síntesis de interés, la adición aldólica entre DHAP y (S)-Cbz-alaninal.



Para determinar el límite de operación sin limitaciones difusionales de RhuA inmovilizada en el soporte Co-IDA en la reacción del ensayo enzimático, se representó el porcentaje de actividad retenida, calculado como la actividad que presenta el derivado inmovilizado respecto de la actividad ofrecida, frente a la actividad ofrecida inicialmente (figura 5.8). Se puede observar que para cargas inferiores a 10 UA/mL de soporte, no hay limitaciones difusionales ya que el porcentaje de actividad retenida en el soporte tras la inmovilización es independiente de la actividad ofrecida. Dado que el rendimiento de inmovilización fue próximo al 100% ya que se trabajó con RhuA purificada, las pérdidas de actividad son atribuibles a las modificaciones de la estructura tridimensional de la enzima que sufre tras su unión al soporte. A partir de esa carga enzimática, el porcentaje de actividad retenida disminuye y no es posible detectar toda la actividad enzimática que se encuentra inmovilizada en el soporte debido a limitaciones difusionales. Por lo tanto, la carga máxima que admiten estos soportes evitando la aparición de limitaciones difusionales frente a la reacción de determinación de la actividad enzimática es 10 UA/mL de soporte. Esta carga enzimática corresponde a 2 mg de proteína/mL de soporte, un valor bastante inferior al valor de saturación del soporte indicado por la casa comercial (12-20 mg de proteína/mL de soporte según el fabricante).

Una posible explicación a la aparición de limitaciones difusionales a tan bajas cargas puede deberse en parte, al igual que en el caso de FucA, a la inmovilización en multicapa en la parte más accesible del soporte. De hecho, el extremo N-terminal de RhuA, en donde se encuentra la cola de histidinas, también se encuentra hacia el exterior de la superficie de la enzima y presenta movilidad, por lo que podría estar influyendo en una posible agregación entre moléculas de enzima en las condiciones de inmovilización empleadas. Para poder determinar la posibilidad de inmovilización en multicapa de RhuA se calculó la carga enzimática máxima que admite el soporte Co-IDA en un experimento en columna tal y como se realizó anteriormente con

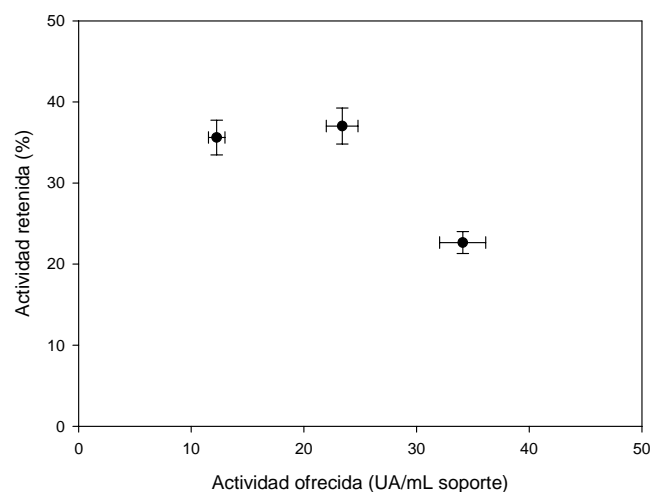
FucA. En este caso, la carga máxima obtenida es de 68 mg de proteína/mL de soporte. Por lo tanto, la enzima RhuA también presenta tendencia a la inmovilización en multicapa aunque en menor medida que FucA (169 mg de proteína/mL de soporte) lo que también explica el mayor valor umbral de aparición de limitaciones difusionales que se observa en RhuA.



**Figura 5.8.** Limitaciones difusionales de los derivados inmovilizados de ramnulosa-1-fosfato aldolasa inmovilizada en soportes de afinidad a metales Co-IDA

Posteriormente, se estudió el efecto de la carga enzimática ofrecida sobre la velocidad inicial de reacción en la adición aldólica entre DHAP y (S)-Cbz-alaninal a 4°C en medio acuoso con DMF como cosolvente catalizada por los derivados inmovilizados de RhuA en Co-IDA (figura 5.9). En este caso, para poder realizar una representación análoga a la realizada frente a la reacción del ensayo enzimático (figura 5.8), el porcentaje de actividad retenida se calculó como la relación entre la velocidad inicial de reacción y la actividad inicial ofrecida. Para expresar la actividad ofrecida (UA/mL de soporte) en las mismas unidades que la velocidad inicial de reacción (mM/h) se tuvo en cuenta la definición de unidades de actividad por la cual 1 UA es la cantidad de enzima que cataliza la rotura de 1  $\mu$ mol de L-ramnulosa-1-fosfato por minuto a 25°C y pH 7,5. Dado que la reacción del ensayo enzimático

presenta una mayor velocidad de reacción, tanto por emplear los sustratos naturales de la enzima como por llevarse a cabo a una mayor temperatura, el porcentaje de actividad retenida en este caso será menor que el 100%, independientemente de que también puedan existir pérdidas de actividad enzimática durante la inmovilización. Se puede observar en la figura 5.9 que hasta actividades ofrecidas de aproximadamente 25 UA/mL de soporte no se observa una disminución del porcentaje de actividad retenida, por lo que el derivado inmovilizado no presenta limitaciones difusionales. A partir de una carga enzimática ofrecida de 25 UA/mL de soporte se observa que la actividad retenida en el derivado inmovilizado disminuye, lo que implica la aparición de limitaciones difusionales. Por lo tanto, la carga enzimática óptima de los derivados inmovilizados de RhuA en soporte Co-IDA para ser empleados en la adición aldólica entre DHAP y (S)-Cbz-alaninal a 4°C en medio acuoso con DMF como cosolvente es 25 UA/mL de soporte.



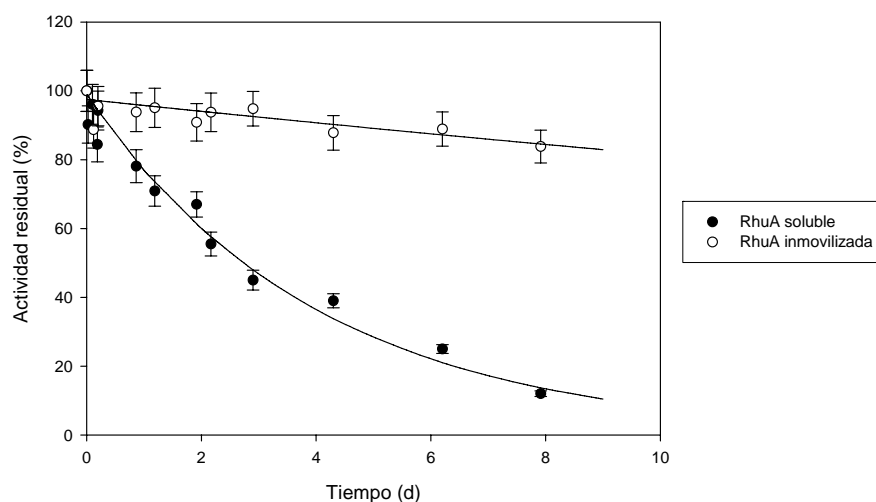
**Figura 5.9.** Limitaciones difusionales en la adición aldólica entre dihidroxiacetona fosfato y (S)-Cbz-alaninal a 4°C de los derivados inmovilizados de ramnulosa-1-fosfato aldolasa inmovilizada en soportes de afinidad a metales Co-IDA.

### 5.3.2. Estabilidad de derivados inmovilizados de RhuA

En el desarrollo de los derivados inmovilizados de ramnulosa-1-fosfato aldolasa en soporte Co-IDA para su aplicación como biocatalizadores de la adición aldólica entre DHAP y (S)-Cbz-alaninal, se ha de comprobar en primer lugar que estos derivados son estables en el medio de reacción propuesto. Este medio contiene dimetilformamida al 20% v/v como cosolvente para obtener la adecuada solubilidad de ambos reactivos, dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y (S)-Cbz-alaninal, lo que puede producir la inactivación de la enzima. La inmovilización de la enzima sobre un soporte sólido contribuye, con frecuencia, a la mejora de la estabilidad enzimática en el medio.

La estabilidad de estos derivados inmovilizados de RhuA en Co-IDA en el medio de reacción de la adición aldólica de interés (50 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 20% v/v DMF, pH 7,0) se ha estudiado a 4°C, que es la temperatura a la que se reducen las reacciones secundarias que tienen lugar durante la reacción (Suau y col., 2006). Se empleó un derivado inmovilizado con una actividad ofrecida de 7 UA/mL de soporte por lo que no presenta limitaciones difusionales frente a la reacción del ensayo enzimático. Se seleccionaron estas condiciones para que la velocidad de difusión de los productos no influyera a la hora de analizar la variación de la actividad de la enzima inmovilizada a lo largo del tiempo de incubación. Como se puede observar en la figura 5.10, se ha obtenido una mayor estabilidad del derivado inmovilizado respecto de la enzima soluble. El tiempo de vida medio del derivado inmovilizado estimado a partir de los datos experimentales es de 37 días frente a los 2,8 días de la enzima soluble en las mismas condiciones. Por otro lado, no se detectó actividad apreciable en el sobrenadante a lo largo de la incubación del derivado inmovilizado lo que implica que, pese a la reversibilidad del enlace enzima-soporte, este equilibrio está suficientemente desplazado hacia la inmovilización en el medio

de reacción empleado. En trabajos anteriores también se observó un aumento de la estabilidad de ramnulosa-1-fosfato aldolasa inmovilizada en Co-IDA respecto de la enzima soluble en un medio acuoso con azida sódica 0,02% (Ruiz, 2007).

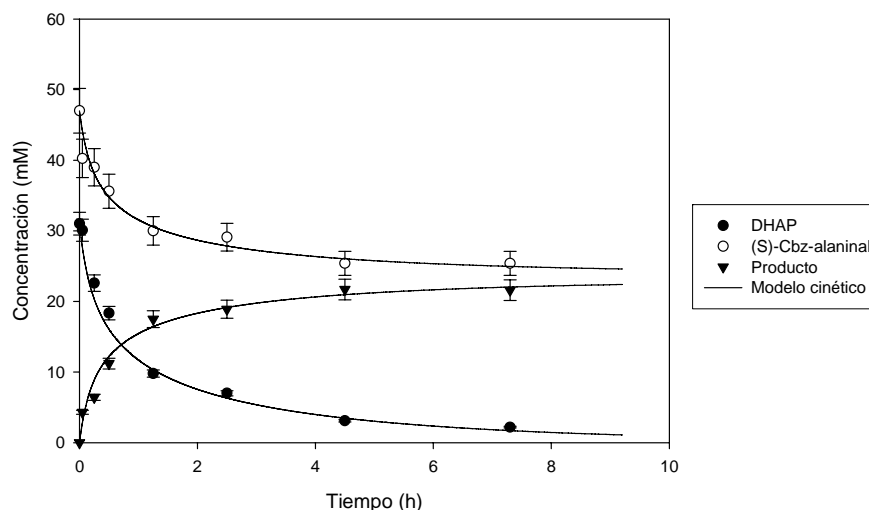


**Figura 5.10.** Estabilidad de ramnulosa-1-fosfato aldolasa soluble e inmovilizada en Co-IDA a 4°C en el medio de reacción de la adición aldólica (50 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 20% v/v DMF, pH 7,0).

### 5.3.3. Adición aldólica catalizada por derivados inmovilizados de RhuA

Finalmente, se evaluó la aplicación de los derivados inmovilizados de ramnulosa-1-fosfato aldolasa en soporte de afinidad Co-IDA en la catálisis de la adición aldólica entre dihidroxiacetona fosfato y (S)-Cbz-alaninal a 4°C en medio acuoso con dimetilformamida como cosolvente. Para ello se seleccionó un derivado inmovilizado de carga enzimática 23 UA/mL de soporte, un valor muy próximo a la carga enzimática máxima que admiten estos soportes sin la aparición de limitaciones difusionales (apartado 5.3.1). Como se puede observar en la figura 5.11, este biocatalizador inmovilizado cataliza satisfactoriamente la reacción de adición aldólica de interés. Además, el comportamiento catalítico observado se ajusta al modelo cinético que se había obtenido para la misma reacción catalizada por RhuA soluble

(líneas continuas en el gráfico). Por lo tanto, la inmovilización de la enzima sobre el soporte de afinidad Co-IDA no modifica la cinética intrínseca de catálisis frente a la adición aldólica de interés en ausencia de limitaciones difusionales.



**Figura 5.11.** Adición aldólica entre dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y (S)-Cbz-alaninal catalizada por ramnulosa-1-fosfato aldolasa inmovilizada en Co-IDA (actividad ofrecida 23 UA/mL de soporte) en medio de reacción 50 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 20% v/v DMF, pH 7,0.

En lo que respecta al rendimiento y la selectividad, se puede observar en la tabla 5.10 que no difieren significativamente entre la catálisis mediante enzima inmovilizada o soluble en reacciones llevadas a cabo a una relación de concentración inicial de reactivos similar. Esto es debido a que la enzima soluble había sido previamente purificada mediante cromatografía IMAC en columna de cobalto por lo que ya se había producido el intercambio del  $Zn^{+2}$  por el  $Co^{+2}$  de la columna y no se observa el efecto del metal sobre el rendimiento y selectividad como se había obtenido con FucA. En cuanto al valor obtenido, en el apartado 4.4 se ha visto que el rendimiento y selectividad dependen de la relación entre las concentraciones iniciales de reactivos. En este caso, la relación entre la concentración inicial de (S)-Cbz-alaninal y de DHAP fue próxima a 1,5 por lo que es posible que el valor de rendimiento y selectividad obtenidos en la catálisis con los derivados inmovilizados

se pueda aumentar, elevando la relación de concentraciones iniciales al igual que ocurre en la catálisis con RhuA soluble.

**Tabla 5.10.** Rendimiento y selectividad en la adición aldólica entre dihidroxiacetona fosfato y (S)-Cbz-alaninal a 4°C catalizada por ramnulosa-1-fosfato aldolasa soluble e inmovilizada en soporte Co-IDA. Condiciones iniciales RhuA soluble: 24,0 mM DHAP, 33,1 mM (S)-Cbz-alaninal, 3 UA/mL de reacción; condiciones iniciales RhuA inmovilizada: 31,0 mM DHAP, 47,3 mM (S)-Cbz-alaninal, 3 UA/mL de reacción.

<i>Biocatalizador</i>	<i>Rendimiento (%)</i>	<i>Selectividad (%)</i>
RhuA soluble	71	73
RhuA inmovilizada	70	75

## 5.4. Conclusiones

En este capítulo se ha desarrollado un proceso de purificación e inmovilización en un único paso aplicado a las enzimas fuculosa-1-fosfato aldolasa (FucA) y ramnulosa-1-fosfato aldolasa (RhuA) recombinantes empleando soportes de afinidad a metales quelados que permite reducir las pérdidas de actividad enzimática que se pueden producir realizando los dos procesos por separado. La naturaleza reversible del enlace de la enzima con el soporte de afinidad permite la desorción de la enzima inactiva tras diversos ciclos catalíticos y la posterior carga con enzima activa, haciendo posible la reutilización del soporte, lo que conlleva a una considerable reducción de los costes del proceso biocatalítico. Los biocatalizadores inmovilizados mediante este método se han aplicado satisfactoriamente en la catálisis de la adición aldólica entre dihidroxiacetona fosfato y (S)-Cbz-alaninal en medio acuoso con dimetilformamida como cosolvente.

Por un lado, se realizó un estudio de diferentes soportes y condiciones de inmovilización con el fin de seleccionar aquél soporte que permita obtener un mayor rendimiento de inmovilización y actividad retenida, empleando la enzima FucA. El

soporte de afinidad seleccionado para la producción de estos biocatalizadores inmovilizados fue el soporte Co-IDA con el que se obtuvo un rendimiento próximo al 100% y una actividad retenida del 60%. El empleo de este soporte de afinidad en la purificación convencional de FucA permitió elevar el rendimiento en actividad hasta un 83% frente el 61% alcanzado anteriormente con un soporte cargado con níquel. Posteriormente se determinó que este aumento de la actividad recuperada tras la purificación se debe a un intercambio del  $Zn^{+2}$  presente en el centro activo de la enzima con el metal del soporte de afinidad, y que el intercambio con cobalto produce un aumento de la actividad enzimática de FucA.

Para analizar la aplicación de estos biocatalizadores inmovilizados en la adición aldólica de interés, se estudió su estabilidad en el medio de reacción obteniéndose una mejora considerable de la estabilidad respecto la enzima soluble tanto a 4°C como a 24°C. Además, se observó que la estabilidad depende del metal presente en el soporte de inmovilización, siendo más favorable el empleo de Co-IDA. A continuación, estos derivados inmovilizados fueron aplicados con éxito en la biocatálisis de interés, obteniéndose un mejor rendimiento (63%) y selectividad (70%) que en el caso de emplear FucA soluble. Nuevamente, estos valores dependen del metal presente en el soporte y son mayores en el caso del soporte Co-IDA. Por último, se analizó el efecto de la carga enzimática de los derivados sobre la actividad que presentan, observándose la aparición de limitaciones difusionales frente a la reacción del ensayo enzimático incluso a muy bajas cargas. Esto puede deberse a una inmovilización en multicapa en las partes más accesibles del soporte ya que se determinó que estos soportes admiten una carga enzimática máxima de FucA un orden de magnitud superior a la carga teórica.

En el caso de la aplicación de la purificación e inmovilización en un solo paso empleando la enzima RhuA y el soporte Co-IDA, se obtuvieron un elevado rendimiento de inmovilización (próximo a 100%) y de actividad retenida (90%) en



ausencia de limitaciones difusionales. Se determinó el límite de operación sin limitaciones difusionales tanto frente a la reacción del ensayo enzimático como frente a la reacción de adición aldólica de interés siendo más alto que en el caso de FucA. El valor de carga máxima del soporte que se obtiene con RhuA (68 mg de proteína/mL de soporte) es aproximadamente 5 veces superior al valor teórico que admiten estos soportes y es menor que el obtenido con FucA (169 mg de proteína/mL de soporte), por lo que hay indicios de una posible inmovilización en multicapa aunque en menor extensión que la anterior enzima. Estos biocatalizadores inmovilizados presentan una mayor estabilidad en la incubación a 4°C en el medio de reacción que la enzima soluble y catalizan satisfactoriamente la adición aldólica entre dihidroxiacetona fosfato y (S)-Cbz-alaninal, obteniéndose un rendimiento y selectividad similar al obtenido con RhuA soluble purificada en columna de Co-IDA (en torno al 70%) y ajustándose al modelo cinético obtenido con RhuA soluble.



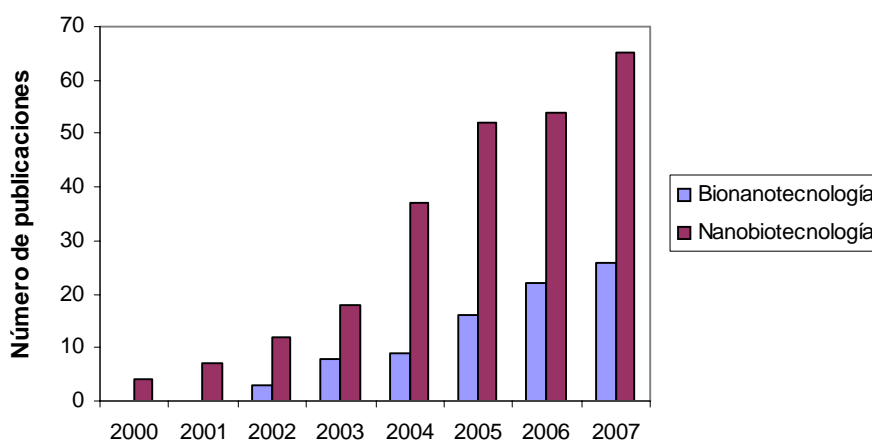
# Capítulo 6. BIOCATÁLISIS CON RAMNULOSA -1-FOSFATO ALDOLASA INMOVILIZADA EN NANOPARTÍCULAS DE ORO

## 6.1. Introducción

La Nanotecnología es el campo de las Ciencias Aplicadas dedicado al estudio y manipulación de la materia en la escala de átomos, moléculas y macromoléculas (entre 1 y 100 nanómetros) para conocer los fenómenos y propiedades de la materia a nanoescala y crear materiales, aparatos y sistemas novedosos con propiedades únicas (Siegel y col., 1999). El gran potencial de esta tecnología radica en que la materia exhibe unas propiedades físicas y químicas muy diferentes a una escala inferior a 100 nm que las que muestran a escala macroscópica. Dado que esta definición está basada únicamente en la escala de tamaño con la que trabaja, esta ciencia es esencialmente multidisciplinar, ofreciendo un gran potencial de interesantes aplicaciones para las ciencias ya existentes.

De este modo, a partir de la interacción y sinergia de la Nanotecnología con la Biotecnología han emergido nuevas disciplinas como la Bionanotecnología y la Nanobiotecnología. Aunque a veces se emplean como sinónimos, la Bionanotecnología está enfocada al diseño y modificación de biomoléculas y sus mecanismos de acción para que lleven a cabo funciones específicas a nivel nanométrico (Goodsell, 2004) mientras que la Nanobiotecnología se centra en el estudio de la interacción entre biomoléculas y materiales o estructuras nanométricas

para dar lugar a materiales híbridos de potencial aplicación en biosensores, sistemas de liberación controlada de fármacos (*drug delivery*) y fabricación de biocomposites entre otras (Kane y Stroock, 2007). Dado que estas dos disciplinas son de reciente creación, su campo de aplicación aún se está definiendo actualmente pero ofrecen un gran potencial, lo que queda de manifiesto en la evolución del número de publicaciones en estos campos a lo largo de los últimos años (figura 6.1).



**Figura 6.1.** Evolución del número de publicaciones que contienen el concepto Bionanotecnología y Nanobiotecnología entre los años 2000 y 2007.

Dentro del campo de la Nanobiotecnología surge la Nanobiotecnología de la fusión de los conocimientos de la Biocatálisis con las novedosas propiedades de los materiales desarrollados por la Nanotecnología (Kim y col., 2006a). Diversas nanoestructuras como son las nanopartículas, nanofibras, nanotubos y matrices nanoporosas han revelado el amplio potencial de aplicación de estos materiales en biocatálisis (Wang, 2006). Dentro de estos materiales, las nanopartículas presentan una serie de interesantes propiedades para ser empleadas como soportes de inmovilización enzimática y permiten superar algunos de los problemas más importantes que presentan los soportes convencionales (Kim y col., 2006a). Por un lado, su reducido tamaño (inferior a 100 nm) le confiere una gran área específica lo

que permite obtener cargas enzimáticas bastante más elevadas que en el caso de soportes macroscópicos. Por otro lado, al ser partículas no porosas, toda la enzima se inmoviliza sobre la superficie del soporte por lo que se evita la existencia de limitaciones difusionales. Además, numerosos autores han observado un aumento de la actividad enzimática al inmovilizar enzimas sobre nanopartículas en comparación con la enzima soluble (Chen y Su, 2001; Huang y col., 2003; Kouassi y col., 2005; Pandey y col., 2007) o con la enzima inmovilizada en soportes convencionales (Phadtare y Sastry, 2006). Otra característica interesante de estos prometedores soportes de inmovilización es que presentan un movimiento Browniano (movimiento aleatorio de partículas microscópicas debido a la agitación térmica de las moléculas del fluido) cuando se encuentran en suspensión en un líquido, en lo que diversos autores han denominado un estado de transición entre catálisis homogénea y heterogénea, por lo que se podrían reducir las necesidades de agitación en el biorreactor (Jia y col., 2003; Kim y col., 2006a).

En la inmovilización de enzimas sobre nanopartículas, algunos de los soportes más prometedores actualmente son las nanopartículas magnéticas y las de oro. Por un lado, las partículas magnéticas, por lo que pueden ser separadas del medio de reacción mediante un campo magnético (imán) y presentan una baja toxicidad, lo que amplía sus aplicaciones en el campo de la medicina y la biotecnología (Liao y Chen, 2001). Por otro lado, las nanopartículas de oro presentan una elevada afinidad por las biomoléculas (Daniel y Astruc, 2004) y su alta densidad les permite poder ser separadas del medio mediante centrifugación. Por otro lado, favorecen la transferencia de electrones en reacciones enzimáticas redox (Kim y col., 2006b). Estas nanopartículas se han empleado en diferentes aplicaciones como la inmovilización de glucosa oxidasa para sensores (Pandey y col., 2007; Pingarrón y col., 2008), inmunoensayos (Huang y col., 2006), liberación controlada de fármacos (Baron y col., 2007) y en el calentamiento remoto para la eliminación de agregados proteicos

(Bastus y col., 2007). Las nanopartículas pueden emplearse para inmovilizar la enzima directamente o a través de la unión en su superficie de otras moléculas o *linkers* que pueden unirse covalentemente o por afinidad con las enzimas. Este es el caso de nanopartículas funcionalizadas con ácido nitriloacético (NTA) que tiene una gran afinidad por la cola de histidinas que presentan algunas enzimas recombinantes (De y col., 2009).

Uno de los principales problemas observados anteriormente en la inmovilización de ramnulosa-1-fosfato aldolasa recombinante en soportes de afinidad fue la aparición de limitaciones difusionales a cargas enzimáticas muy bajas (apartado 5.3.1). Por ello, se propuso la inmovilización de RhuA en nanopartículas ya que permiten obtener elevadas cargas enzimáticas específicas en ausencia de limitaciones difusionales. Se seleccionaron las nanopartículas de oro como soportes de inmovilización por diversos motivos. Por un lado, se ha visto que la disposición de las bandas de energía de las nanopartículas de oro influye en la biocatálisis de reacciones redox (Kim y col., 2006b) y teniendo en cuenta que la catálisis con RhuA depende de la presencia de un metal divalente en el centro activo, se pensó que la interacción de la esfera electrónica de la nanopartícula de oro con el metal del centro activo de la enzima podría influir en la catálisis. Por otro lado, la enzima presenta un residuo de cisteína en la superficie de cada subunidad (Grueninger y Schulz, 2008) que hace posible la inmovilización en este tipo de soportes dado la elevada afinidad de estas partículas por los grupos tiol (Daniel y Astruc, 2004). La posibilidad de reutilizar el biocatalizador mediante separación por centrifugación y la reducción de las necesidades de agitación son unas ventajas adicionales de este sistema biocatalítico. En ese sentido, se emplearon nanopartículas de oro de gran tamaño (40-55 nm) que, dado su mayor peso, mejoran la eficacia de separación mediante centrifugación.

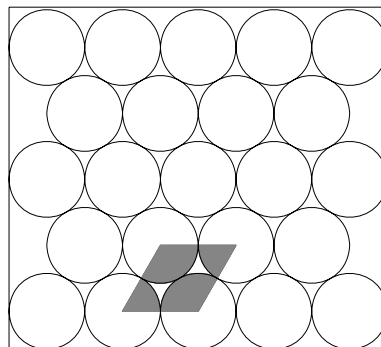
Este capítulo se ha realizado en colaboración con el grupo del doctor Víctor Puentes del Institut Català de Nanotecnologia, que fue el responsable de la síntesis y caracterización de las nanopartículas de oro así como del seguimiento de la inmovilización de ramnulosa-1-fosfato aldolasa mediante UV-Visible, dispersión dinámica de luz (DLS), y microscopía de transmisión de electrones (TEM).

## **6.2. Inmovilización de RhuA en nanopartículas de oro**

La inmovilización de ramnulosa-1-fosfato aldolasa (RhuA) sobre nanopartículas de oro de 55 nm de diámetro se llevó a cabo a 4°C y en una disolución de citrato sódico 2,2 mM, pH 6,7. La presencia de citrato estabiliza la carga superficial de las nanopartículas de oro evitando que aglomeren (Zhang y col., 2008). La aglomeración produce un cambio en el espectro de absorción UV-Visible que modifica el color de la suspensión de rojo a azul (Geneviève y col., 2007). Puesto que el pH de este medio se encuentra en el límite superior de la zona de tamponación efectiva de este compuesto, se estudió el empleo de otras disoluciones tampón (Tris y Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) con el fin de mantener el pH en un rango más adecuado para la enzima (pH 7,0-8,0). Desafortunadamente, los medios estudiados provocaban la aglomeración de las nanopartículas por lo que se decidió no cambiar la composición del medio durante la inmovilización.

Con el fin de determinar la cantidad de enzima ofrecida necesaria en la inmovilización para obtener un derivado inmovilizado de máxima carga enzimática, se realizó en primer lugar una estimación teórica del número máximo de moléculas de enzima que se pueden unir a la superficie de una nanopartícula formando una monocapa teniendo en cuenta las dimensiones de la nanopartícula y de la molécula de enzima. Por un lado, las dimensiones del tetrámero de RhuA se pueden aproximar

a un prisma de  $7 \times 7 \times 5$  nm (Ringler y Schulz, 2003) cuyo volumen equivale al de una esfera de 7,8 nm de diámetro equivalente. Por otro lado, la superficie externa de la nanopartícula se considera como una superficie plana equivalente recubierta totalmente por moléculas de enzima consideradas como esferas de igual tamaño dispuestas en empaquetamiento hexagonal, que es la forma más eficiente de empaquetar esferas idénticas sobre una superficie plana (Poole y Owens, 2007). En este tipo de empaquetamiento, la celda unitaria corresponde a un rombo de lado igual a dos veces el radio de la esfera tal y como se muestra en la figura 6.2. El factor de empaquetamiento se define como la relación entre el área ocupada por las esferas en la celda unitaria respecto al área total de la celda. En este caso, el área ocupada corresponde al área ecuatorial de una esfera,  $\pi \cdot r^2$ , y el área total de la celda es el área de un rombo de lado y diámetro menor igual a 2 veces el radio,  $2 \cdot r^2 \cdot \sqrt{3}$ . Relacionando estas dos áreas se obtiene un factor de empaquetamiento de 0,91. Teniendo en cuenta estas consideraciones, el número máximo de moléculas de enzima que se pueden unir a la superficie de una nanopartícula en monocapa se puede obtener dividiendo el área superficial de una nanopartícula de diámetro 55 nm suponiéndola esférica ( $9503 \text{ nm}^2$ ) entre el área ecuatorial de una esfera de 7,8 nm de diámetro que representa a la molécula de enzima ( $47,8 \text{ nm}^2$ ) y multiplicando por el factor de empaquetamiento. Este resultado indica que un máximo de 180 moléculas de RhuA podrían inmovilizarse sobre la superficie de la nanopartícula formando una monocapa.



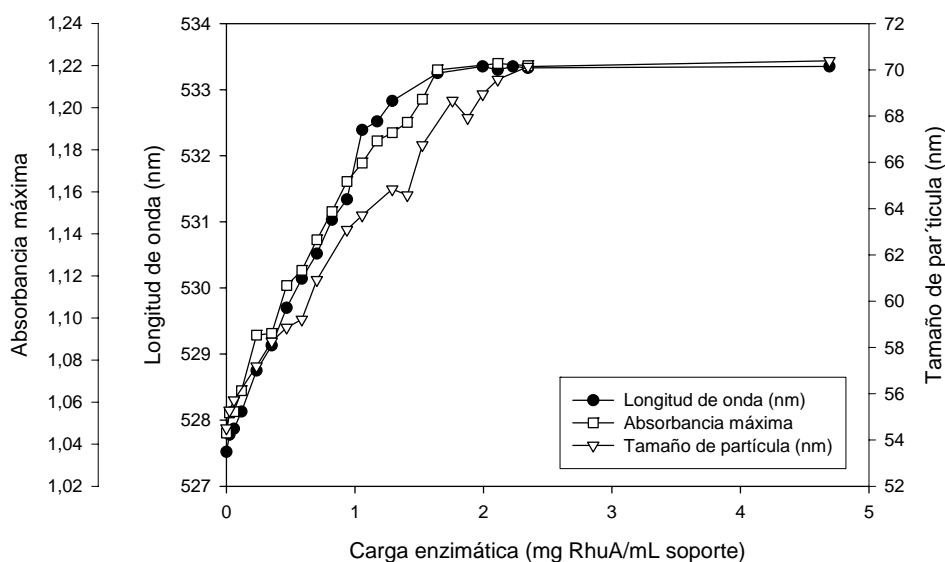
**Figura 6.2.** Esquema de empaquetamiento hexagonal y su celda unitaria.



A continuación se realizaron una serie de experimentos con el fin de determinar experimentalmente la saturación del soporte empleando diferentes cargas enzimáticas ofrecidas hasta 4,7 mg de RhuA/mL de soporte a partir de una disolución de enzima purificada y se analizó al final de la inmovilización el espectro UV-Visible del medio y el tamaño de las partículas mediante dispersión dinámica de luz (DLS). En estos experimentos no se realizaron medidas de actividad enzimática ya que las nanopartículas cuando no están suficientemente recubiertas de enzima agregan en el medio empleado en el ensayo enzimático produciéndose un cambio de absorbancia que interfería en la determinación de la actividad (Geneviève y col., 2007; Wu y col., 2008).

Como se puede observar en la figura 6.3, a medida que se aumenta la carga enzimática en la inmovilización se observa un desplazamiento de la longitud de onda del pico del espectro UV-Visible y un aumento de su absorbancia máxima a consecuencia de la inmovilización de la enzima sobre la superficie de la nanopartícula (Kimling y col., 2006). Por otro lado, la curva alcanza un valor máximo a una carga enzimática ofrecida de 2,1 mg de RhuA/mL de soporte, a partir de la cual un aumento de la enzima ofrecida no produce un cambio en estos dos valores, lo que es un indicio de que se ha conseguido la saturación de la superficie. Se observa también que el tamaño de las partículas crece en función de la carga enzimática ofrecida hasta un valor de 2,3 mg de RhuA/mL de soporte, ligeramente superior al obtenido anteriormente a partir del espectro UV-Visible. El tamaño final de las partículas saturadas fue de 70 nm y, teniendo en cuenta que el diámetro de las nanopartículas es 55 nm y el diámetro aparente de la enzima 7,8 nm, se concluye que se ha formado una monocapa de enzima sobre la superficie de las partículas. El valor correspondiente a la saturación obtenido equivale a 1020 moléculas de enzima ofrecida por nanopartícula, lo que representa un exceso de 5,7 sobre el valor teórico de monocapa (180 moléculas de RhuA por nanopartícula). Este exceso coincide con

los valores que normalmente se emplean en la conjugación de nanopartículas de oro con otras moléculas químicas para favorecer el desplazamiento del equilibrio hacia la unión con el soporte y que se encuentran en un rango entre 5 y 10 de exceso sobre la monocapa teórica (Tsai y col., 2008).



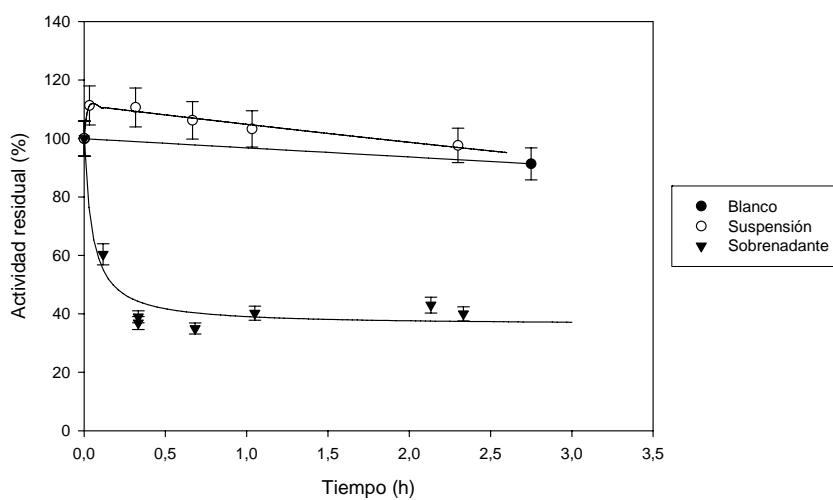
**Figura 6.3.** Efecto de la carga de enzima ofrecida en la inmovilización de ramnulosa-1-fosfato aldolasa en nanopartículas de oro sobre la longitud de onda del pico en el espectro UV-Visible y su absorbancia máxima y el tamaño de las partículas obtenido mediante dispersión dinámica de luz (DLS).

Con el fin de obtener un derivado inmovilizado de máxima carga enzimática, se realizó la inmovilización de RhuA sobre nanopartículas de oro por encima de las condiciones de saturación, a una concentración de enzima ofrecida de 3,5 mg de proteína/mL de soporte (16,9 UA/mL de soporte), y se llevó a cabo el seguimiento del proceso mediante el análisis de la actividad enzimática y de la concentración de proteína en suspensión y sobrenadante, así como en un blanco de RhuA disuelta en el medio de inmovilización. Cuando las nanopartículas de oro se encuentran suficientemente recubiertas de enzima, mejora su estabilidad en medios salinos y no se produce agregación, por lo que en estas condiciones es posible la determinación de la actividad enzimática (Geneviève y col., 2007; Wu y col., 2008).

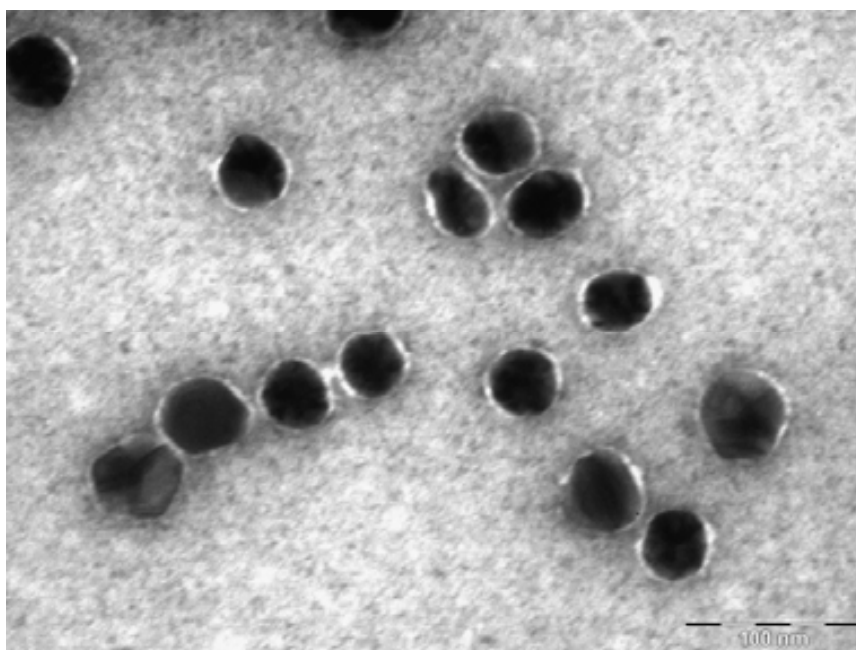
Como se puede observar en la figura 6.4, se produce en efecto la inmovilización de RhuA sobre nanopartículas de oro con un rendimiento de inmovilización del 60%, siendo el proceso bastante rápido dado que tras media hora de incubación ya no se observa una disminución significativa de la enzima en el sobrenadante. La inmovilización de RhuA podría estar ocurriendo a través de un residuo de cisteína que se encuentra en la superficie de cada subunidad de RhuA (Grueninger y Schulz, 2008) dado la elevada afinidad del oro por los grupos tiol, o bien por interacciones inespecíficas a través de grupos amina y ácido carboxílico, por los que el oro también presenta afinidad, y que se encuentran en gran número en la superficie de las proteínas (Daniel y Astruc, 2004).

Por otro lado, se observa una leve caída de actividad de la suspensión similar a la del blanco de inmovilización lo que podría indicar que las pérdidas de actividad de la suspensión se deben únicamente a la estabilidad de la enzima en el medio y no a pérdidas de actividad atribuibles al proceso de inmovilización. Asimismo, también se observa un ligero aumento de la actividad enzimática de la suspensión (110%) respecto de la actividad inicial ofrecida. Este aumento de actividad podría deberse a los cambios conformacionales que se pueden producir al inmovilizarse la enzima y que pueden resultar en una mayor accesibilidad a los centros activos en comparación con la enzima libre. Esto es lo que han postulado diversos autores tras observar una disminución de  $K_M$  y por tanto, un aumento de la afinidad por el sustrato, en la inmovilización de diversas enzimas sobre nanopartículas (Huang y col., 2003; Kouassi y col., 2005). De hecho, se ha constatado un cambio en la estructura secundaria de glucosa oxidasa al inmovilizarse sobre nanopartículas de oro tioladas que provoca la disminución de su  $K_M$  al valor más bajo publicado hasta el momento en la inmovilización de esta enzima en nanopartículas de distintos materiales (Pandey y col., 2007).

La carga enzimática de RhuA inmovilizada sobre las nanopartículas de oro es 10,1 UA/mL de soporte (2,5 mg de RhuA/mL de soporte), calculada a partir de la diferencia entre la suspensión y el sobrenadante de la inmovilización, lo que corresponde a un 16% en peso enzima/soporte. Este valor es superior a la mayor carga máxima que se ha encontrado en bibliografía en la inmovilización de enzimas en nanopartículas de tamaño inferior a 100 nm, que corresponde al 10% en peso (Kim y col., 2006a). De hecho, la carga enzimática obtenida corresponde a 1107 moléculas de enzima inmovilizadas por nanopartícula, un orden de magnitud superior al valor teórico de inmovilización en monocapa que se había determinado (180 moléculas de RhuA por nanopartícula). Sin embargo, se analizó una muestra representativa del biocatalizador inmovilizado mediante microscopía de transmisión de electrones (TEM), observándose una monocapa de enzima en todas las partículas analizadas (figura 6.5). Se ha determinado experimentalmente mediante dispersión dinámica de luz (DLS) que la enzima forma agregados de tamaño entre 100 nm y 4 micras en las condiciones de inmovilización (pH 6,7) dado su proximidad al punto isoeléctrico de la enzima (pH 5,5) y es posible que estos agregados se estén inmovilizando sobre las nanopartículas junto con las moléculas de enzima libre. Sin embargo, el porcentaje de estos agregados debe ser pequeño respecto la enzima libre dado que no se detectaron agregados inmovilizados en las partículas que fueron analizadas por TEM. Por lo tanto, se propone que los agregados enzimáticos se inmovilizan sobre las nanopartículas y contribuyen a la elevada carga enzimática observada pero el porcentaje es pequeño y la mayoría de las nanopartículas se encuentran recubiertas por una monocapa.



**Figura 6.4.** Inmovilización a 4°C de ramnulosa-1-fosfato aldolasa en nanopartículas de oro



**Figura 6.5.** Imágenes de nanopartículas de oro recubiertas por una monocapa de ramnulosa-1-fosfato aldolasa recombinante obtenidas mediante microscopía de transmisión de electrones (TEM) con tinción negativa.

### **6.3. Estabilidad del derivado inmovilizado de RhuA**

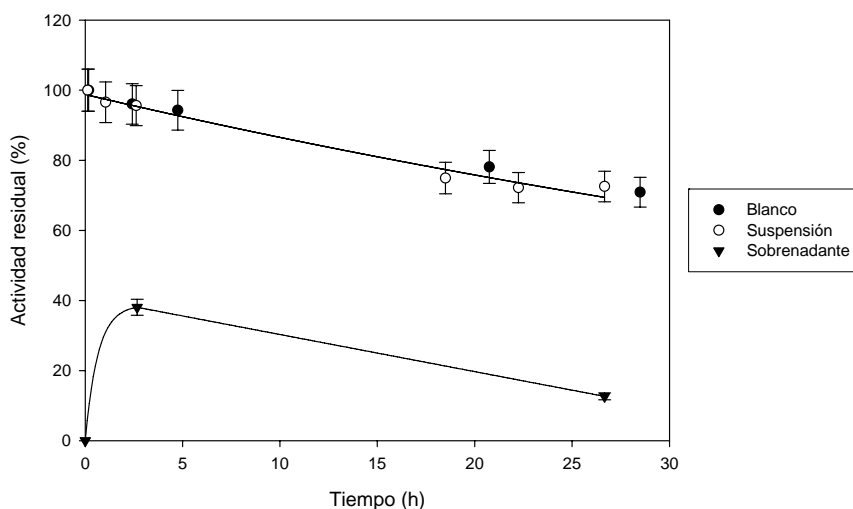
A la hora de emplear biocatalizadores inmovilizados en biorreactores, es necesario que éstos presenten una elevada estabilidad enzimática en las condiciones de reacción para aumentar el número de ciclos de operación en el biorreactor y reducir la cantidad de enzima requerida para obtener una determinada productividad.

La estabilidad del derivado inmovilizado de RhuA en nanopartículas de oro ha sido estudiada a 4°C en el medio de la reacción de interés, la adición aldólica entre DHAP y (S)-Cbz-alaninal (50 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 20% v/v DMF, pH 7,0). El medio de inmovilización se centrifugó para concentrar la suspensión del biocatalizador inmovilizado en un pequeño volumen, seleccionando cuidadosamente las condiciones de centrifugación para obtener una eficiente separación de las partículas pero, por otro lado, evitar la agregación de las partículas que se produce a condiciones de centrifugación drásticas. Al derivado inmovilizado concentrado se le añadió el medio de reacción hasta un volumen final 25 veces menor que el inicialmente centrifugado, condiciones que se emplean en la catálisis de la reacción de interés para aumentar la actividad ofrecida, sin apreciarse visualmente la agregación de las partículas en el medio. La actividad inicial en el medio fue 0,93 UA/mL, lo que corresponde al 76,8% de la actividad inicial teórica del derivado inmovilizado. Estas pérdidas de actividad enzimática se atribuyen al proceso de centrifugación.

En la figura 6.6 se puede observar la evolución de la actividad enzimática del derivado inmovilizado suspendido en el medio de reacción, expresada como porcentaje de la actividad enzimática inicialmente medida. Se puede observar que un 38% de la actividad enzimática inicialmente medida se encontraba en el sobrenadante tras 2,7 horas de incubación, observándose después una pérdida de

actividad similar a la de la enzima soluble. Se debe tener en cuenta que el derivado inmovilizado se añade como una suspensión concentrada tras la inmovilización y que el medio en el que se encuentra suspendido el derivado inmovilizado contiene enzima soluble. Sin embargo, este efecto es despreciable frente la desorción de RhuA del derivado inmovilizado debido al reducido volumen de sobrenadante en el que se encuentran suspendidas. Si esta desorción se produjese de la enzima inmovilizada en monocapa, se observaría un mayor grado de agregación en el medio del que se observó experimentalmente, ya que las nanopartículas parcialmente recubiertas no son estables a concentraciones tan elevadas y medios salinos en presencia de cosolventes orgánicos. Por lo tanto, se sugiere que la mayor parte de la enzima desorbida proviene de los agregados enzimáticos que se encuentran en pequeño porcentaje inmovilizados sobre las nanopartículas de oro.

Por otro lado, se observa que la actividad del biocatalizador que se encuentra inmovilizado, calculada como la diferencia entre la actividad de la suspensión y del sobrenadante, es del 60% y permanece prácticamente constante durante la incubación, mientras que la enzima soluble ha perdido un 25% de actividad en el mismo tiempo. Por lo tanto, es posible que la inmovilización de RhuA sobre nanopartículas de oro aumente la estabilidad de la enzima en el medio de reacción empleado, conservando prácticamente la misma actividad durante 27 días de incubación.



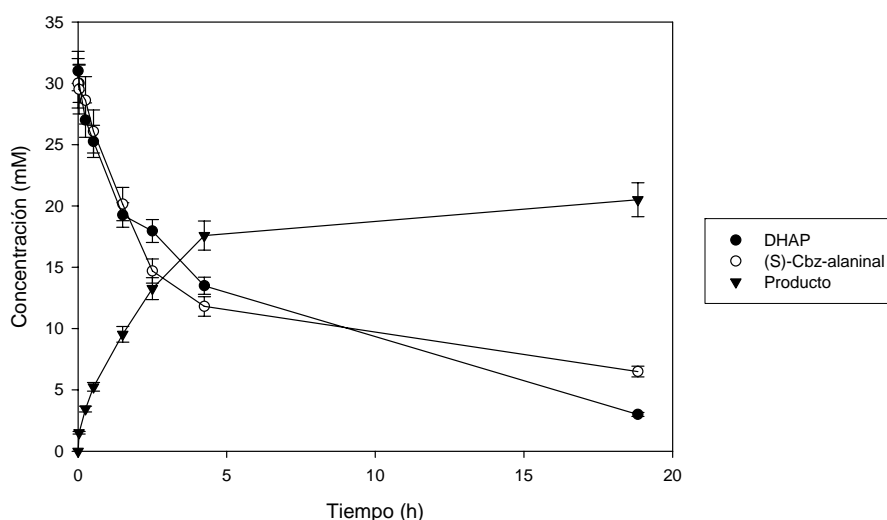
**Figura 6.6.** Estabilidad a 4°C del derivado inmovilizado de ramnulosa-1-fosfato aldolasa en nanopartículas de oro en medio de reacción 50 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 20% v/v DMF, pH 7,0.

#### 6.4. Adición aldólica catalizada por RhuA inmovilizada

La ramnulosa-1-fosfato aldolasa inmovilizada en nanopartículas de oro ha sido empleada en la catálisis de la reacción de adición aldólica entre dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y (S)-Cbz-alaninal a 4°C en medio 50 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 20% v/v DMF, pH 7,0 y se ha comparado con la misma reacción catalizada por la enzima soluble en las mismas condiciones de operación. Para alcanzar una elevada actividad enzimática inicial se añadió el derivado inmovilizado en una concentración 25 veces superior a la empleada durante la inmovilización. La actividad enzimática ofrecida se determinó a partir de un experimento en paralelo en las mismas condiciones pero en ausencia de los reactivos, siendo 0,93 UA/mL de reacción. La adición aldólica se llevó a cabo a 4°C y sin agitación ya que se consideró que el movimiento Browniano de las nanopartículas en suspensión era suficiente para mantener el sistema homogéneo.



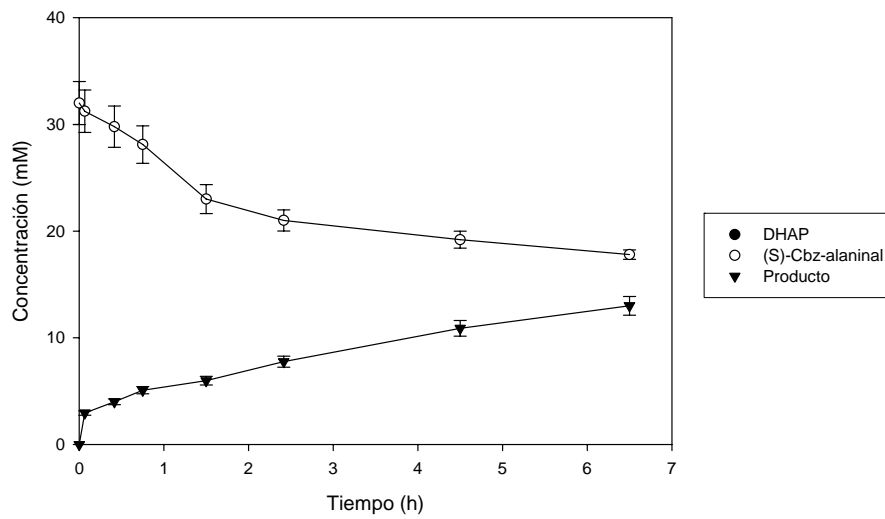
En efecto, se ha podido comprobar que la enzima inmovilizada en nanopartículas de oro cataliza la reacción de adición aldólica de interés (figura 6.7) obteniéndose un rendimiento de producto del 66% tras 19 horas de reacción y una selectividad de 73,2%, valores ligeramente superiores a los obtenidos con RhuA soluble. Además, la velocidad de reacción es superior a la obtenida en la reacción catalizada por la enzima soluble en las mismas condiciones de operación y con el doble de carga enzimática (2 UA/mL de reacción) por lo que se puede deducir que la actividad que presenta el derivado inmovilizado en la reacción de adición aldólica es superior a la estimada inicialmente. Relacionando la velocidad de reacción del biocatalizador inmovilizado con la velocidad de reacción de RhuA soluble se puede estimar que la actividad que presenta el biocatalizador inmovilizado es 4,1 UA/mL de reacción, valor mucho mayor que el determinado inicialmente mediante ensayo enzimático (0,93 UA/mL). Por lo tanto, se produce la activación de la enzima frente a la reacción de adición aldólica al encontrarse inmovilizada en nanopartículas de oro, en mayor grado que frente a la reacción del ensayo enzimático. Como ya se ha comentado anteriormente, diversos autores han relacionado el aumento de actividad de las enzimas inmovilizadas en nanopartículas con una disminución de su  $K_M$  y por tanto, un aumento de la afinidad de la enzima por su sustrato (Huang y col., 2003; Kouassi y col., 2005; Pandey y col., 2007). Por lo tanto, la activación de la enzima podría ocurrir en distinto grado en la reacción del ensayo de determinación de la actividad y en la reacción de adición aldólica dado que los sustratos y productos que emplean son diferentes.



**Figura 6.7.** Adición aldólica entre dihidroxiacetona fosfato y (S)-Cbz-alaninal a 4°C catalizada por ramnulosa-1-fosfato aldolasa inmovilizada en nanopartículas de oro. Primer ciclo del biocatalizador.

A continuación, se estudió la posibilidad de reutilización del biocatalizador inmovilizado en un segundo ciclo de reacción. Para ello el medio de reacción se centrifugó en condiciones suaves y se resuspendió el derivado inmovilizado concentrado en el medio de reacción con DHAP y (S)-Cbz-alaninal en las mismas condiciones que las empleadas en el primer ciclo de reacción. Debido a problemas circunstanciales del equipo analítico, no se pudo realizar el seguimiento de la concentración de DHAP en el transcurso de la reacción. La actividad inicial ofrecida fue de 0,52 UA/mL, determinada a partir de un experimento en paralelo en ausencia de reactivos que recibió el mismo tratamiento.

Se puede observar que el derivado inmovilizado cataliza la adición aldólica en un segundo ciclo de reacción con una velocidad de reacción correspondiente a 1,6 UA/mL, lo que corresponde otra vez a una actividad enzimática bastante superior a la que se había estimado (figura 6.8). Relacionando esta actividad con la obtenida en el primer ciclo (4,1 UA/mL) se concluye que tras el proceso de reutilización del biocatalizador se recupera el 40% de la actividad del ciclo anterior.



**Figura 6.8.** Adición aldólica entre dihidroxiacetona fosfato y (S)-Cbz-alaninal a 4°C catalizada por ramnulosa-1-fosfato aldolasa inmovilizada en nanopartículas de oro. Segundo ciclo del biocatalizador.

## 6.5. Conclusiones

En este capítulo se ha realizado con éxito la inmovilización de ramnulosa-1-fosfato aldolasa recombinante en nanopartículas de oro de 55 nm para la obtención de un biocatalizador inmovilizado de alta carga, siendo necesaria una carga enzimática ofrecida superior a 2,3 mg de RhuA/mL de soporte para alcanzar la saturación de la superficie de la nanopartícula. Se han obtenido indicios de que la inmovilización de RhuA sobre nanopartículas de oro se produce mayoritariamente en monocapa. Los derivados inmovilizados conservan un 60% de la actividad inicial tras 27 horas de incubación a 4°C en el medio de reacción en el que se realiza la adición aldólica entre dihidroxiacetona fosfato y (S)-Cbz-alaninal, habiéndose observado indicios de un posible aumento de la estabilidad de la enzima inmovilizada respecto a la enzima soluble. Estos derivados inmovilizados se han empleado en la catálisis de la reacción de interés, obteniéndose una elevada velocidad de reacción que corresponde a una actividad enzimática 4,5 veces mayor a la que teóricamente se había

inmovilizado, por lo que es probable que se produzca la activación de la enzima al inmovilizarla sobre estos soportes. Este biocatalizador se empleó en la catálisis de un segundo ciclo de reacción constatándose una recuperación de la actividad del biocatalizador del 40%.

# Capítulo 7. ESTRATEGIAS DE REACCIÓN EN MEDIOS ALTERNATIVOS

## 7.1. Introducción

En la búsqueda de la estrategia óptima de operación en un proceso biocatalítico se ha de seleccionar un medio de reacción que permita una elevada solubilidad de los reactivos, elevada actividad y estabilidad del biocatalizador y favorecer la separación del producto de reacción. Cuando en el medio se encuentran productos de diferente hidrofobicidad, entre las posibles estrategias se encuentran el empleo de medios acuosos con un disolvente orgánico como cosolvente o el uso de medios bifásicos fase orgánica/fase acuosa.

En este capítulo se ha realizado un estudio preliminar de distintas estrategias de reacción en la biocatálisis con ramnulosa-1-fosfato aldolasa recombinante (RhuA) de la adición aldólica entre dihidroxiacetona fosfato y (S)-Cbz-alaninal. Por un lado, se estudió la aplicación de un novedoso medio de reacción, los líquidos iónicos, como alternativa al medio de reacción con dimetilformamida como cosolvente que se había empleado hasta el momento. Por otro lado, se estudió el empleo de medios bifásicos en un reactor de membrana con el fin de obtener una elevada solubilidad de reactivos y aumentar la productividad de la reacción.

## **7.2. Biocatálisis con RhuA en líquidos iónicos como medio de reacción**

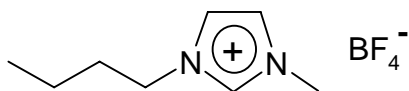
En la selección de un medio de reacción adecuado para llevar a cabo la adición aldólica de interés se ha de tener en cuenta que los dos reactivos de la reacción presentan diferente hidrofobicidad; mientras que (S)-Cbz-alaninal es hidrofóbico, la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) es hidrofílico. Una posibilidad para conseguir la solubilidad simultánea de ambos compuestos es el empleo de medios acuosos con cosolventes orgánicos donde la proporción de cosolvente se debe ajustar para no reducir en exceso la estabilidad enzimática en el medio de reacción o provocar la precipitación del reactivo soluble en medio acuoso.

Unos prometedores medios de reacción son los líquidos iónicos, que son sales con un punto de fusión inferior a 100°C por lo que también se les denomina sales líquidas a temperatura ambiente (*room temperature ionic liquids*, RTILs) (Wilkes, 2002). Estos compuestos están formados en su mayoría por un catión orgánico y un anión inorgánico y la gran variedad de posibles combinaciones entre ellos ha llevado a que se denominen disolventes de diseño o “a la carta” (Lee y Lee, 2005). Las propiedades más interesantes de estos compuestos son, principalmente, la extremadamente baja volatilidad que presentan y la capacidad para disolver compuestos orgánicos, inorgánicos y poliméricos tanto polares como no polares así como el amplio rango de comportamiento en agua y disolventes orgánicos, que va desde prácticamente inmiscibles a totalmente miscibles (Rogers y col., 2001; Lee y Lee, 2005; Ou y Huang, 2006; Roosen y col., 2008). La casi nula volatilidad que presentan permite que los productos de reacción sean extraídos del medio mediante evaporación, destilación, extracción líquido-líquido o extracción mediante CO<sub>2</sub> supercrítico (Scurto y col., 2003). Debido a su baja volatilidad se presentan como una

prometedora alternativa a los disolventes orgánicos desde el punto de vista ambiental en el desarrollo de procesos respetuosos con el medio ambiente (Domaiska, 2005; Lee y Lee, 2005; Shvedene y col., 2005; Roosen y col., 2008). Estos compuestos se han empleado en distintas aplicaciones tales como síntesis orgánica e inorgánica, catálisis y biocatálisis, síntesis de polímeros, química de coordinación y electroquímica (Rogers y col., 2001). Los líquidos iónicos se han empleado en numerosas reacciones catalíticas tanto en sistemas monofásicos (como disolventes o cosolventes) como en sistemas bifásicos con fases acuosas (de Maria, 2008), obteniéndose aumentos en la actividad, estabilidad y enantioselectividad en un gran número de biocatalizadores (Roosen y col., 2008).

Debido a las propiedades que presentan los líquidos iónicos como alternativa al uso de disolventes orgánicos en biocatálisis, se estudió la posibilidad de emplearlos como medio de reacción alternativo al uso de cosolventes orgánicos en la adición aldólica de dihidroxiacetona fosfato y (S)-Cbz-alaninal catalizada por ramnulosa-1-fosfato aldolasa recombinante que ha sido estudiada previamente en un medio acuoso con dimetilformamida como cosolvente. Dado que los líquidos iónicos pueden actuar como disolventes de compuestos con una baja solubilidad en agua (Dreyer y Kragl, 2008), se pensó que podrían mejorar la solubilidad del reactivo hidrofóbico de la reacción, el (S)-Cbz-alaninal. Dentro del amplio rango de líquidos iónicos disponibles, se seleccionó el 1-butil-3-metil-imidazolio tetrafluoroborato ([BMIM][BF<sub>4</sub>]) por ser el líquido iónico más empleado en biocatálisis hasta el momento (Roosen y col., 2008) (figura 7.1). Este compuesto ha sido propuesto como un adecuado medio de reacción en la aminoxilación de aldehídos y cetonas mediante biocatálisis con L-prolina (Guo y col., 2006). En un primer lugar se pensó en emplear este líquido iónico puro como medio de reacción, pero su elevada viscosidad, unas 230 veces superior a la del agua a 30°C (Suarez y col., 1998), dificulta su manejo y podría disminuir en exceso la velocidad de transferencia de materia de los reactivos y

productos en el medio. Se decidió, por ello, emplear este líquido iónico como cosolvente, sustituyendo así el cosolvente orgánico que se venía utilizando hasta ahora, la dimetilformamida.



**Figura 7.1.** Estructura del líquido iónico 1-butil-3-metil-imidazolio tetrafluoroborato ([BMIM][BF<sub>4</sub>]).

### 7.2.1. Selección de la composición del medio de reacción

En la selección de la composición del medio de reacción se ha de fijar, por un lado, la composición de la fracción acuosa del medio y por otro, la proporción adecuada de [BMIM][BF<sub>4</sub>] para obtener una elevada estabilidad de la enzima y una adecuada solubilidad de los reactivos y productos.

A la hora de seleccionar la composición de la parte acuosa del medio de reacción se estudió inicialmente el tampón empleado en la determinación de la actividad enzimática (100 mM Tris-HCl, 200 mM KCl, pH 7,5), ya que su composición ha sido optimizada para obtener la mayor actividad de la enzima (Vidal, 2006). Sin embargo, al preparar una mezcla de [BMIM][BF<sub>4</sub>] al 15% v/v en este tampón se produjo la formación de un precipitado de color blanco. Diversos autores han estudiado el efecto que producen las sales inorgánicas sobre mezclas de [BMIM][BF<sub>4</sub>]:H<sub>2</sub>O, habiendo observado que la presencia del líquido iónico provoca en algunas condiciones la precipitación de dichas sales, en distinta proporción según su naturaleza (Trindade y col., 2007). Es por esto que se decidió cambiar la composición del tampón para evitar la presencia de precipitados en el medio. Puesto que la sal KCl provoca un aumento de la actividad específica de ramnulosa-1-fosfato aldolasa (Vidal, 2006), se decidió sustituir el tampón Tris-HCl por tampón fosfato



$\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , que presenta un rango de tamponación adecuado al rango de pH de trabajo y ya había sido utilizado previamente con esta enzima durante su purificación. Sin embargo, se observó que una mezcla de  $[\text{BMIM}][\text{BF}_4]$  al 15% v/v en tampón 80 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 150 mM KCl, pH 7,4 presentaba nuevamente un precipitado blanco en suspensión. Dado que ha sido publicado anteriormente la baja solubilidad de KCl (inferior a 0,1 M) en otro líquido iónico basado en imidazol, el 1-ethyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethanesulfonyl) imide (Ohno y col., 2003), se decidió suprimir la sal KCl del medio. Finalmente, la mezcla de  $[\text{BMIM}][\text{BF}_4]$  al 15% v/v en tampón  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  80 mM, pH 7,4 no presentaba ningún precipitado en suspensión por lo que se seleccionó para el estudio de la biocatálisis con RhuA en medios con  $[\text{BMIM}][\text{BF}_4]$  como cosolvente.

Una vez seleccionado el contenido acuoso del medio de reacción, se estudió el comportamiento de las mezclas de  $[\text{BMIM}][\text{BF}_4]$  en tampón fosfato (80 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,4) en proporciones volumétricas 15%, 50% y 75%. Al llevar estas disoluciones a 4°C, que es la temperatura a la que se realiza la reacción de adición aldólica de interés para minimizar la degradación química de DHAP (Suau y col., 2006), se observó la presencia de una segunda fase líquida en las disoluciones al 50% y 75% v/v, mientras que la mezcla al 15% v/v seguía siendo homogénea. Este comportamiento bifásico dependía de la temperatura ya que cuando la mezcla se llevaba de nuevo a temperatura ambiente, la interfase desaparecía en ambos casos. Estas observaciones están de acuerdo con el comportamiento bifásico de las mezclas  $[\text{BMIM}][\text{BF}_4]:\text{H}_2\text{O}$  que ha sido publicado por diversos autores (Dullius y col., 1998; Lin y col., 2007) (figura 7.2). De acuerdo con la ecuación del equilibrio de fases desarrollada por Lin y col. (2007), se puede obtener que a una temperatura de 4°C (277,15K), la composición de las dos fases en equilibrio es 29% y 60% v/v de líquido iónico. Esto quiere decir que cualquier mezcla de composición intermedia entre estos dos valores en un sistema  $[\text{BMIM}][\text{BF}_4]:\text{H}_2\text{O}$  daría lugar a dos fases de composición la

correspondiente al equilibrio y de volumen el determinado por la regla de la palanca (figura 7.3), mientras que mezclas en proporciones diferentes presentan un comportamiento monofásico. Sin embargo, y contradiciendo esta afirmación, se ha observado que la mezcla al 75% v/v de [BMIM][BF<sub>4</sub>] en tampón fosfato sí es bifásica a esa temperatura. Esta observación puede explicarse teniendo en cuenta que el sistema no es estrictamente [BMIM][BF<sub>4</sub>]:H<sub>2</sub>O sino que presenta también otras especies iónicas en solución, concretamente Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. La presencia de sales inorgánicas en mezclas [BMIM][BF<sub>4</sub>]:H<sub>2</sub>O puede producir efectos de *salting-out* ya que la sal inorgánica retiene fuertemente las moléculas de agua de su esfera de hidratación, haciendo disminuir las moléculas disponibles para la hidratación de los iones correspondientes al [BMIM][BF<sub>4</sub>] y provocando que la separación en dos fases se produzca en un rango más amplio de composiciones (Trindade y col., 2007).

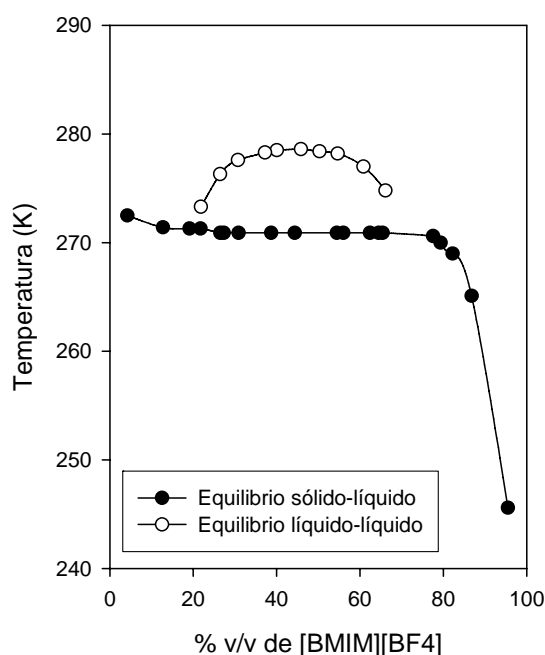
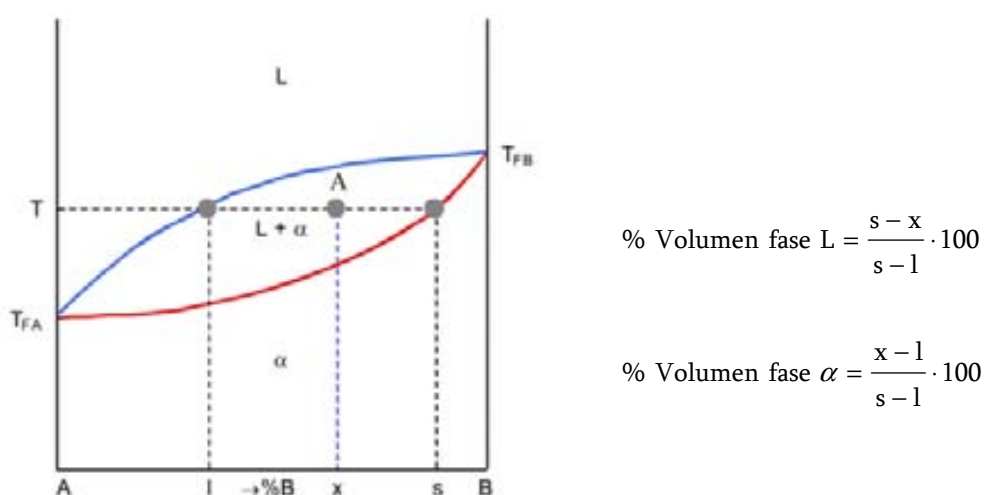


Figura 7.2. Diagrama de fases de mezclas [BMIM][BF<sub>4</sub>]:H<sub>2</sub>O (modificado de Lin y col., 2007).



**Figura 7.3.** Regla de la palanca para un sistema bifásico genérico.

Finalmente, para seleccionar la proporción de [BMIM][BF<sub>4</sub>] más adecuada para su empleo como cosolvente en el medio de reacción se debe tener en cuenta, además de la existencia del comportamiento bifásico observado a la temperatura de operación, también la estabilidad enzimática de ramnulosa-1-fosfato aldolasa y la solubilidad de los sustratos y productos de la reacción de interés.

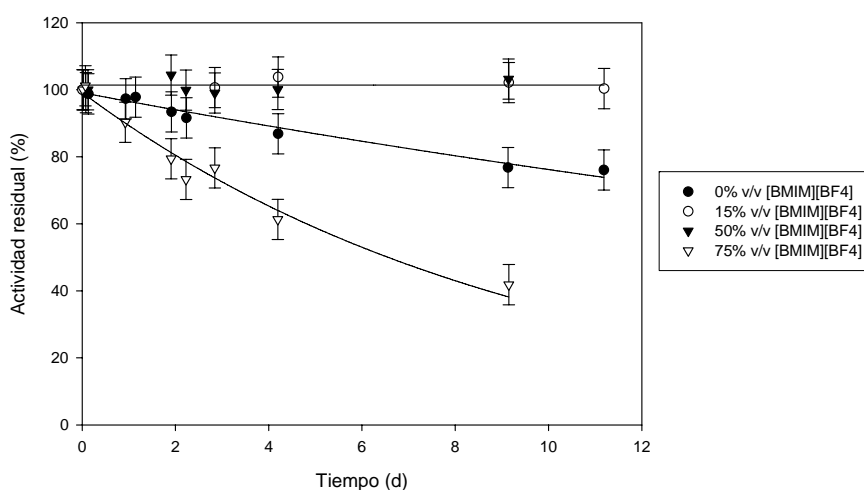
### 7.2.2. Estabilidad de RhuA en presencia de [BMIM][BF<sub>4</sub>]

Para reducir el coste de biocatalizador en un proceso biocatalítico es necesario que la enzima presente una elevada estabilidad en el medio de reacción y condiciones de operación seleccionadas. Por ello, se estudió la estabilidad enzimática de ramnulosa-1-fosfato aldolasa recombinante a 4°C, en presencia de distintas proporciones de líquido iónico en tampón fosfato (80 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4) con el fin de seleccionar la composición del medio más favorable en la biocatálisis de la adición aldólica de interés.

En la figura 7.4 se muestran las curvas de estabilidad enzimática de ramnulosa-1-fosfato aldolasa a 4°C obtenidas en disoluciones al 15%, 50% y 75% v/v de [BMIM][BF<sub>4</sub>] en tampón fosfato y de un blanco de RhuA disuelta en tampón sin líquido iónico. En primer lugar, se puede apreciar las mezclas de [BMIM][BF<sub>4</sub>] al 15% y 50% v/v conservan prácticamente el 100% de la actividad inicial tras 11 días de incubación mientras que el blanco de enzima en tampón fosfato ha perdido aproximadamente un 25% de actividad. Sin embargo, en la mezcla de [BMIM][BF<sub>4</sub>] al 75% v/v se observan unas pérdidas de actividad superiores al blanco de enzima, conservando un 35% v/v tras 14 días de incubación. Un aumento de la estabilidad enzimática en medios con líquidos iónicos ha sido observado anteriormente con algunas alcohol deshidrogenasas (Dreyer y Kragl, 2008) y esterases inmovilizadas (Persson y Bornscheuer, 2003).

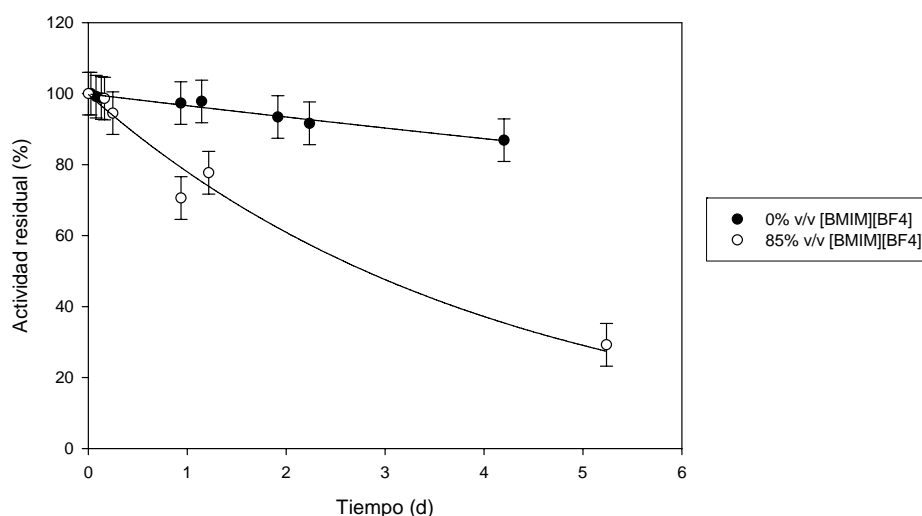
Para explicar el diferente comportamiento de la estabilidad enzimática en función del porcentaje de líquido iónico ha de tenerse en cuenta que, como ya se ha mencionado en el apartado anterior, las mezclas de [BMIM][BF<sub>4</sub>] al 50% y 75% v/v presentan un comportamiento bifásico y, por tanto, ambos sistemas presentan dos fases en equilibrio con distinta concentración de líquido iónico cada una. El volumen de estas dos fases es similar en el caso de la mezcla al 50% v/v por estar aproximadamente en la mitad de la zona de inmiscibilidad mientras que en la mezcla al 75% v/v la fase pobre en líquido iónico tendrá un volumen pequeño respecto al de la otra fase ya que está próxima a la concentración de equilibrio de la fase enriquecida en líquido iónico. Una medida de actividad enzimática a cada una de las fases de la mezcla al 50% v/v tras 15 días de incubación permitió observar que toda la actividad enzimática se concentraba en la fase pobre en líquido iónico mientras que la fase enriquecida no mostraba actividad detectable. Por tanto, las pérdidas de actividad observadas en la mezcla al 75% v/v pueden deberse a que toda la enzima se concentra en un volumen pequeño de fase pobre en líquido iónico y disoluciones concentradas

de enzima son propensas a sufrir fenómenos de agregación que pueden inactivar la enzima. Por otra parte, en esas condiciones aumenta la probabilidad de que la enzima entre en contacto con la interfase, por lo que puede sufrir en mayor medida el efecto inactivador de la presencia de interfases que suele darse en la mayoría de enzimas a excepción de las lipasas.



**Figura 7.4.** Estabilidad de ramnulosa-1-fosfato aldolasa a 4°C en mezclas de [BMIM][BF<sub>4</sub>] en tampón fosfato (80 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4).

Para poder ver el efecto del líquido iónico a altas concentraciones en ausencia de separación de fases, se incubó la enzima en un medio acuoso con [BMIM][BF<sub>4</sub>] al 85% v/v a 4°C, observándose unas elevadas pérdidas de actividad tras cinco días de incubación (figura 7.5). Se puede deducir que una elevada concentración de líquido iónico en el medio afecta negativamente a la estabilidad de la enzima a 4°C. Este efecto también ha sido observado en la biocatálisis con alcohol deshidrogenasa (de Gonzalo y col., 2007).



**Figura 7.5.** Estabilidad de ramnulosa-1-fosfato aldolasa a 4°C en [BMIM][BF<sub>4</sub>] al 85% v/v en tampón fosfato (80 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4).

Posteriormente, se pensó en la posibilidad de añadir al medio de reacción la sal NaCl ya que esta sal produce una ligera activación de la enzima, siendo 150 mM su valor óptimo de concentración (Vidal, 2006). Al contrario de lo observado con KCl, esta sal no precipita en mezclas [BMIM][BF<sub>4</sub>]:H<sub>2</sub>O en el rango de concentración de trabajo (Trindade y col., 2007). En efecto, la mezcla de [BMIM][BF<sub>4</sub>] al 15% v/v en 80 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, pH 7,4 no presentaba ningún precipitado en suspensión, observándose un aumento de la actividad enzimática. También se observó que la presencia de NaCl no afectaba a la estabilidad de la enzima tras 6 días de incubación a 4°C.

Por lo tanto, a partir de los resultados obtenidos del estudio de estabilidad enzimática en distintas mezclas de [BMIM][BF<sub>4</sub>] como cosolvente, se seleccionó el medio al 15% v/v en 80 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, pH 7,4 para el estudio de biocatálisis de la reacción de interés ya que a esta proporción el medio es monofásico y se observó una buena estabilidad de la enzima. Un medio de composición muy similar ha sido seleccionado en una reacción de hidrólisis

catalizada por la enzima Novozym 435 obteniéndose un aumento de la velocidad inicial de reacción y selectividad en un medio 20% v/v [BMIM][BF<sub>4</sub>] en tampón fosfato (Lou y col., 2006).

### 7.2.3. Solubilidad de (S)-Cbz-alaninal y dihidroxiacetona fosfato

Como se ha comentado anteriormente, la diferente solubilidad de los dos reactivos de la reacción de adición aldólica entre DHAP y (S)-Cbz-alaninal, provoca una serie de limitaciones a la hora de operar con este sistema. Uno de los retos en la búsqueda de nuevos medios es conseguir mejorar la solubilidad de los dos reactivos sin comprometer la estabilidad de la enzima ni el rendimiento y selectividad de la reacción de interés.

Para determinar la solubilidad del (S)-Cbz-alaninal en el medio propuesto se preparó una solución concentrada de (S)-Cbz-alaninal en [BMIM][BF<sub>4</sub>] al 15% v/v en tampón fosfato (80 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, pH 7,4) y se realizaron diversas diluciones hasta observar la completa disolución del compuesto. A una concentración de 16 mM se observó que el (S)-Cbz-alaninal se disolvía prácticamente en su totalidad por lo que el límite de solubilidad de este compuesto en [BMIM][BF<sub>4</sub>] al 15% v/v en tampón fosfato se estableció a esta concentración. Esto quiere decir que los componentes de este medio de reacción hacen aumentar ligeramente la solubilidad del (S)-Cbz-alaninal respecto de la solubilidad en agua mili-Q que es 10 mM aproximadamente, pero este valor es muy inferior al valor obtenido en el medio acuoso con dimetilformamida como cosolvente que ha sido estudiado con anterioridad, en el cual la solubilidad del (S)-Cbz-alaninal es en torno a 50 mM.

En lo referente al reactivo hidrófilo de la reacción, DHAP, no se esperaban problemas de solubilidad debido al elevado contenido acuoso del medio de reacción por lo que no se ha realizado un estudio de solubilidad exhaustivo, pudiéndose

obtener disoluciones de DHAP en [BMIM][BF<sub>4</sub>] al 15% v/v en tampón fosfato en concentraciones de hasta 40,5 mM sin observarse ningún precipitado en el medio.

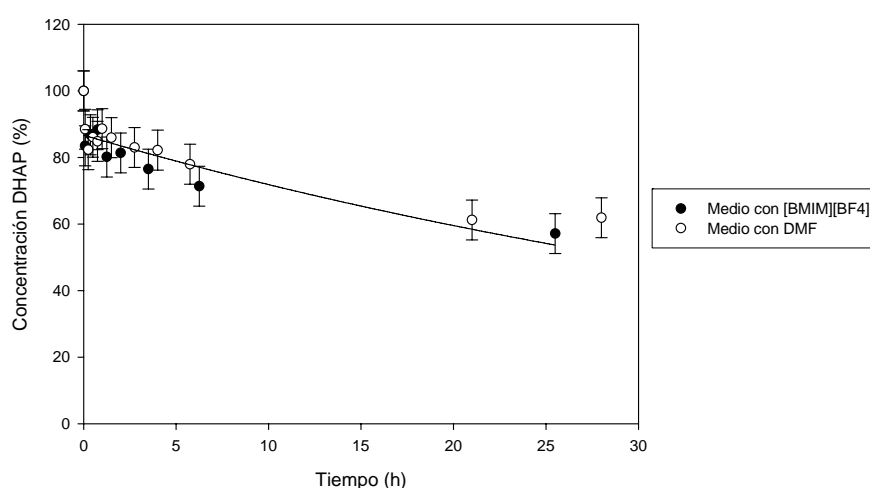
#### 7.2.4. Adición aldólica entre DHAP y (S)-Cbz-alaninal catalizada por RhuA

Por último, se llevó a cabo la biocatálisis de la adición aldólica entre dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y (S)-Cbz-alaninal a 4°C catalizada por ramnulosa-1-fosfato aldolasa en el medio de reacción propuesto ([BMIM][BF<sub>4</sub>] al 15% v/v en 80 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, pH 7,4) como medio alternativo al empleo de cosolventes orgánicos. En este medio de reacción no se puede determinar la concentración de (S)-Cbz-alaninal y del producto de adición mediante HPLC ya que no se consiguió desarrollar un método que permitiese superar la interferencia que produce el líquido iónico en el método analítico, por lo que el seguimiento de la reacción se realizó mediante determinación de la concentración de DHAP. Como se ha podido ver en capítulos anteriores, en medios con dimetilformamida como cosolvente se produce la reacción de degradación enzimática de DHAP simultáneamente a la reacción de adición aldólica de interés. Por este motivo, esta reacción secundaria también ha sido estudiada en el medio de reacción propuesto. El perfil de consumo de DHAP en ambas reacciones se comparó con el obtenido anteriormente en un medio acuoso con dimetilformamida como cosolvente.

En primer lugar se llevó a cabo la degradación enzimática de una disolución 40,5 mM de DHAP a 4°C y catalizada por 3 UA/mL de ramnulosa-1-fosfato aldolasa tanto en el medio propuesto (80 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, 15% v/v [BMIM][BF<sub>4</sub>], pH 7,4) como en el medio acuoso con cosolvente que había sido previamente estudiado (50 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 20% v/v DMF, pH 7,0).



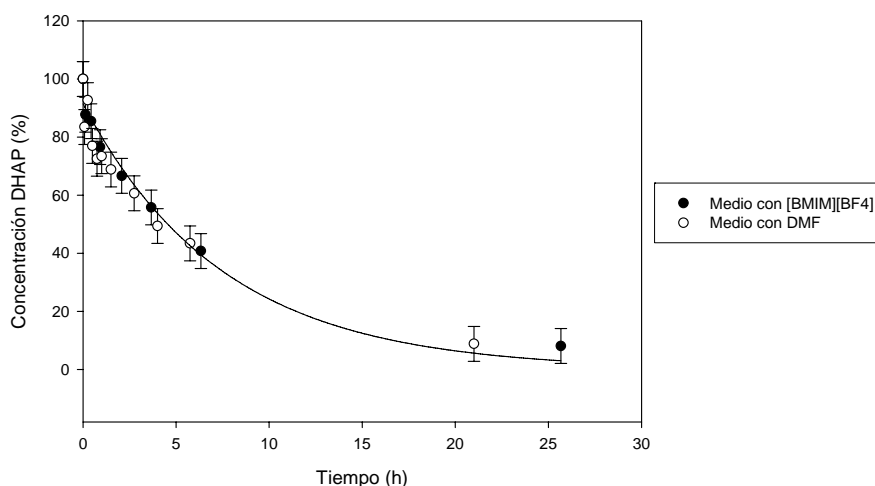
Como puede observarse en la figura 7.6, los perfiles de consumo de DHAP en ambos medios, expresados como porcentaje de la concentración inicial, son muy similares, sugiriendo que la catálisis de esta reacción mediante ramnulosa-1-fosfato aldolasa no se ve afectada significativamente por la presencia de [BMIM][BF<sub>4</sub>] como cosolvente en vez del disolvente orgánico empleado hasta el momento.



**Figura 7.6.** Degradación enzimática de DHAP catalizada por ramnulosa-1-fosfato aldolasa a 4°C en medio 80 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, 15% v/v [BMIM][BF<sub>4</sub>], pH 7,4 y en medio 50 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 20% v/v DMF, pH 7,0.

Finalmente, se llevó a cabo la reacción de adición aldólica entre DHAP y (S)-Cbz-alaninal y se comparó con los resultados obtenidos en un medio de reacción con DMF como cosolvente. En ambas reacciones se empleó una concentración inicial de DHAP de 40,5 mM, y una actividad enzimática de ramnulosa-1-fosfato aldolasa de 3 UA/mL. Respecto al (S)-Cbz-alaninal, se empleó una concentración próxima al límite de solubilidad en cada medio (16 mM en medio acuoso con [BMIM][BF<sub>4</sub>] y 50 mM en medio acuoso con dimetilformamida). Como se puede observar en la figura 7.7, los perfiles de consumo de DHAP en los dos casos resultaron ser muy similares a pesar de que ambas reacciones se han llevado a cabo a diferentes concentraciones iniciales de (S)-Cbz-alaninal. Dado que el perfil de consumo de DHAP corresponde a

la suma de las velocidades de la reacción de síntesis y de la secundaria y teniendo en cuenta que el comportamiento de la enzima frente a la reacción secundaria no parece verse afectado por el cambio de cosolvente, la enzima en medio acuoso con [BMIM][BF<sub>4</sub>] presenta la misma velocidad de síntesis que en medio acuoso con DMF a una concentración inicial de (S)-Cbz-alaninal mucho menor. Por lo tanto, hay indicios de que ramnulosa-1-fosfato aldolasa pueda presentar una mayor actividad enzimática frente la adición aldólica entre DHAP y (S)-Cbz-alaninal a 4°C en medio acuoso con [BMIM][BF<sub>4</sub>] como cosolvente probablemente debido a interacciones electroestáticas entre la enzima y el líquido iónico (Persson y Bornscheuer, 2003).



**Figura 7.7.** Adición aldólica entre dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y (S)-Cbz-alaninal catalizada por ramnulosa-1-fosfato aldolasa a 4°C en medio 80 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, 15% v/v [BMIM][BF<sub>4</sub>], pH 7,4 y en medio 50 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 20% v/v DMF, pH 7,0.

### 7.3. Biocatálisis con RhuA en reactor de membrana

Como se ha visto anteriormente, el empleo de medios con cosolventes orgánicos aumentan la solubilidad de (S)-Cbz-alaninal respecto de medios acuosos. Sin embargo, con los medios estudiados no se han obtenido valores suficientemente elevados como para hacer rentable su operación a nivel industrial ya que

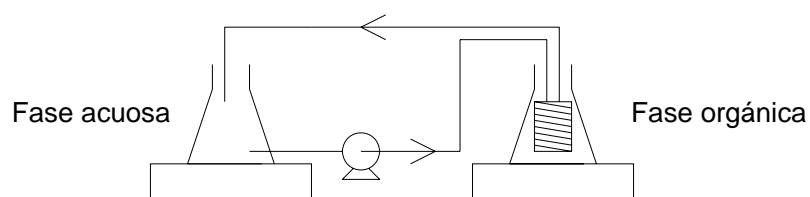
concentraciones bajas de reactivos dificultan notablemente la recuperación de producto o *down-stream* (Woodley, 2008).

Una posibilidad para superar esta dificultad es el empleo de medios bifásicos acuoso/orgánico en un sistema que permita una elevada solubilidad de los reactivos con un reparto favorable entre las fases y la difusión de estos compuestos hacia la fase donde se encuentra el biocatalizador. Otra ventaja de estos medios es que, en función de la hidrofobicidad del producto de la reacción y, por tanto, de la fase en la que se acumule, se puede facilitar su separación y hacer más rentable el proceso de *down-stream*. Los medios bifásicos en biocatálisis han sido ampliamente utilizados, observándose en algunas condiciones la inactivación de la enzima debido a la presencia de interfases o bien fenómenos de emulsión que dificultan la operación (Woodley y col., 1995). Para solucionar estos problemas, es posible el empleo de reactores de membrana que permiten la separación de ambas fases pero permiten la difusión de los compuestos a través de la membrana de una manera selectiva en función de sus características de tamaño de poro o hidrofobicidad (Drioli y Giorno, 1999).

El biorreactor de membrana para biotransformaciones (MBB) ha sido diseñado para su aplicación en reacciones biocatalíticas en medios bifásicos acuoso/orgánico y contiene una membrana tubular de silicona hidrofóbica, compacta y no porosa que separa las dos fases líquidas y que permite reducir las pérdidas de disolvente a su través respecto de las membranas porosas convencionales (Livingston y col., 1996). La membrana sumergida en el medio capta moléculas de disolvente orgánico, aumentando su volumen y presentando propiedades físicas intermedias entre la membrana seca y el disolvente (Doig y col., 1999). Las moléculas del disolvente acuoso, sin embargo, no penetran en la membrana. Esta membrana permite el paso de pequeñas moléculas hidrófobas mediante fenómenos de disolución-difusión a través

de su estructura polimérica, siendo impermeable a macromoléculas como por ejemplo, enzimas.

El biorreactor de membrana para biotransformaciones permite dos tipos de configuraciones: en continuo, en la que las dos fases se encuentran en circulación y en semicontinuo, en el que solo una de las fases se encuentra circulando por el interior de la membrana. En este caso se seleccionó la configuración en semicontinuo ya que permite emplear un menor volumen de fases y un menor gasto de reactivos. Esta configuración consta de una carcasa metálica, en la que se encuentra enrollada la membrana tubular por la que circula el medio acuoso, sumergida en la fase orgánica que se mantiene agitada mediante agitación magnética. En este caso, la única fase que es bombeada es la fase acuosa, cuyo recipiente también es agitado mediante agitación magnética (figura 7.8) (Doig y col., 1998).



**Figura 7.8.** Configuración del biorreactor de membrana para biotransformaciones (MBB) en semicontinuo.

En este apartado se estudió la aplicación del biorreactor de membrana para biotransformaciones en semicontinuo en la adición aldólica de dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y (S)-Cbz-alaninal catalizada por ramnulosa-1-fosfato aldolasa para superar los problemas de solubilidad simultánea de ambos reactivos y evitar la presencia de interfases que puedan inactivar la enzima. La DHAP se encontrará mayoritariamente en la fase acuosa mientras que (S)-Cbz-alaninal y probablemente el producto de adición, en la fase orgánica. A pesar de que el MBB ha sido diseñado para llevar a cabo la reacción enzimática en la fase acuosa, en este caso es necesario que la

enzima se encuentre presente en la fase orgánica para evitar la reacción secundaria de degradación enzimática de DHAP en la fase acuosa. Por tanto, dado que las enzimas no suelen ser solubles en disolventes orgánicos, se propuso trabajar con enzima inmovilizada, seleccionando el soporte Co-IDA anteriormente estudiado (apartado 5.3). Este estudio se ha realizado en parte en el grupo de investigación responsable del desarrollo y patente del MBB en el Imperial College de Londres, bajo supervisión de Prof. David C. Stuckey.

### 7.3.1. Selección del sistema bifásico

En la selección del sistema bifásico a emplear en el biorreactor de membrana MBB, se estudiaron como fase orgánica la serie de alcanos hexano, heptano, octano, isooctano, decano y dodecano, dado que existía experiencia previa en el uso de estos disolventes en el biorreactor, y acetato de etilo, puesto que este disolvente se emplea en la síntesis de (S)-Cbz-alaninal y permite una alta solubilidad de este compuesto. En primer lugar, se analizó el porcentaje de disolvente que presenta la membrana en cada sistema ya que este parámetro influye en la transferencia de materia a través de la membrana (Doig y col., 1999) y posteriormente, el coeficiente de reparto de los reactivos de la reacción de interés.

La membrana en contacto con disolventes orgánicos capta moléculas de disolvente, en distinto grado dependiendo de su naturaleza, con lo que se produce un aumento de su volumen y un cambio en sus propiedades físicas de modo que cuanto mayor es el porcentaje de disolvente en la membrana, menor es la resistencia a la transferencia de materia a través de la misma (Doig y col., 1999). El parámetro que se emplea para medir este efecto es el porcentaje de disolvente que presenta la membrana hinchada, calculado como la diferencia de volumen entre la membrana

hinchada y la membrana seca en relación a su volumen (ecuación 7.1). Este parámetro depende de la viscosidad del disolvente y del reparto que se produce entre el disolvente y la membrana.

$$\text{Porcentaje de disolvente (\%)} = \frac{V_{\text{memb hinchada}} - V_{\text{memb seca}}}{V_{\text{memb hinchada}}} \cdot 100 \quad (7.1)$$

Para calcular el volumen de la membrana hinchada se incubó un trozo de membrana de dimensiones conocidas en el disolvente a 4°C durante 24 horas. Se observó que en lo referente a la serie de alcanos, según aumenta el número de carbonos del alcano, el porcentaje de disolvente en la membrana disminuye (tabla 7.1). Esto puede deberse a que al aumentar la cadena carbonada, a pesar de que el compuesto se vuelve más hidrófobo, el tamaño de la molécula aumenta y por tanto, es más difícil que penetre en la matriz polimérica de la membrana. Comparando estos resultados con el porcentaje de disolvente a 20°C en la serie de alcanos (Doig y col., 1999), se puede observar que siguen la misma tendencia en función de la longitud de la cadena carbonada, aunque a 20°C el porcentaje de disolvente es mayor. Esto puede deberse a que al disminuir la temperatura se produce un aumento de la viscosidad y, por tanto, es más difícil que el disolvente pueda introducirse en la membrana. Por otro lado, el porcentaje de disolvente en la membrana en acetato de etilo es menor que en los alcanos, probablemente porque este disolvente presenta una mayor polaridad que los anteriores, siendo menos afín a la membrana hidrofóbica. Por lo tanto, el sistema bifásico en el que se puede esperar una mayor velocidad de transferencia de materia es empleando alcanos de cadena corta.

**Tabla 7.1.** Porcentaje de disolvente en la membrana tras incubación a 4°C y 20°C durante 24 horas (datos a 20°C extraídos de Doig y col., 1999).

<i>Disolvente</i>	<i>Porcentaje disolvente (%)</i>	
	<i>4°C</i>	<i>20°C</i>
Hexano	41	-
Heptano	41	-
Octano	39	72
Isooctano	38	-
Decano	32	66
Dodecano	30	59
Acetato de etilo	22	-

Posteriormente, se determinó la solubilidad y el coeficiente de reparto de los reactivos de la adición aldólica en los sistemas bifásicos propuestos. El coeficiente de reparto de un compuesto químico en un medio bifásico se define como la relación entre la concentración del compuesto en cada una de las fases. En este estudio, el coeficiente de reparto se definió como el cociente entre la concentración del soluto en la fase orgánica respecto de la concentración en la fase acuosa (ecuación 7.2).

$$P_{ac}^{org} = \frac{C_{fase\ orgánica}}{C_{fase\ acuosa}} \quad (7.2)$$

En primer lugar, se observó que la solubilidad de (S)-Cbz-alaninal en los sistemas bifásicos correspondientes a la serie de alcanos es muy baja en todos los casos. Una posible explicación es que la molécula de (S)-Cbz-alaninal es hidrófoba pero contiene también grupos polares por lo que es probable que presente una baja afinidad por los alcanos que son apolares. Por lo tanto, se seleccionó el sistema bifásico acetato de etilo:H<sub>2</sub>O para continuar el estudio de la biocatálisis de la adición aldólica entre DHAP y (S)-Cbz-alaninal y se determinó el coeficiente de reparto de ambos reactivos en el sistema propuesto (tabla 7.2). Para realizar el cálculo del coeficiente de reparto de DHAP la concentración en la fase orgánica no fue

detectable por lo que se estimó a partir de la diferencia entre el reactivo inicialmente añadido y la concentración medida en la fase acuosa. Como se puede observar, los coeficientes de reparto de ambos reactivos presentan un valor muy diferente entre sí, lo que es necesario para que cada reactivo se concentre mayoritariamente en la fase que le corresponde. En este caso, se puede observar a partir de los resultados obtenidos que la DHAP se concentra en la fase acuosa mientras que el (S)-Cbz-alaninal se encuentra principalmente en la fase orgánica del sistema.

**Tabla 7.2.** Coeficiente de reparto de dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y (S)-Cbz-alaninal a 4°C en medio bifásico acetato de etilo:H<sub>2</sub>O.

<i>Reactivo</i>	<i>Coeficiente de reparto, P<sub>ac</sub><sup>org</sup></i>
DHAP	0,032 ± 0,012
(S)-Cbz-alaninal	49,1 ± 5,5

### 7.3.2. Adición aldólica en MBB con medio bifásico acetato de etilo:H<sub>2</sub>O

Posteriormente, se estudió la aplicación del reactor de membrana para biotransformaciones (MBB) operando en semicontinuo en la biocatálisis de la adición aldólica entre DHAP y (S)-Cbz-alaninal a 4°C catalizada por ramnulosa-1-fosfato aldolasa empleando el medio bifásico acetato de etilo:H<sub>2</sub>O. Como se ha comentado anteriormente, la DHAP se encuentra mayoritariamente en la fase acuosa mientras que el aldehído se concentra en la fase orgánica. Con respecto al biocatalizador, se propuso operar con ramnulosa-1-fosfato aldolasa inmovilizada en Co-IDA en la fase orgánica para evitar la posible degradación enzimática de DHAP que se había observado anteriormente en otros medios de reacción. Por lo tanto, es necesario estudiar en primer lugar la estabilidad de la enzima en la fase orgánica propuesta, acetato de etilo.

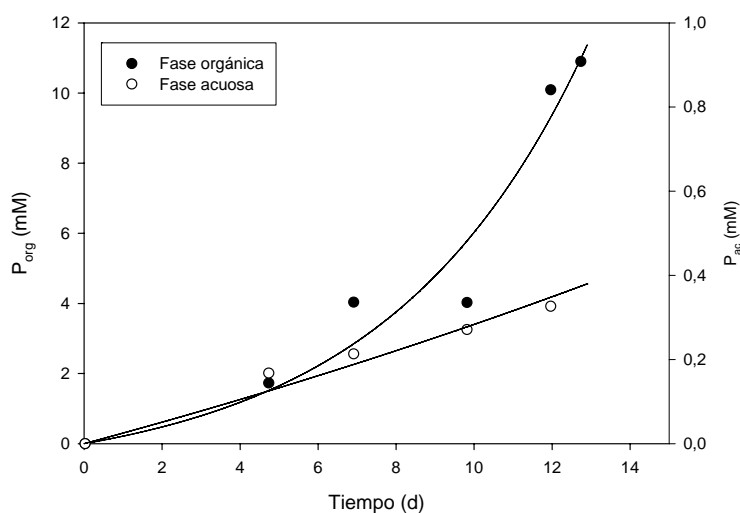


En el estudio de la estabilidad a 4°C de la enzima inmovilizada en Co-IDA en acetato de etilo se pudo observar que la suspensión no era homogénea ya que las partículas tendían a aglomerarse y sedimentaban muy rápidamente al cesar la agitación. No se pudo continuar el estudio de estabilidad debido a la falta de homogeneidad del medio pero se observó que tras varias horas de incubación se conservaba actividad en el derivado inmovilizado.

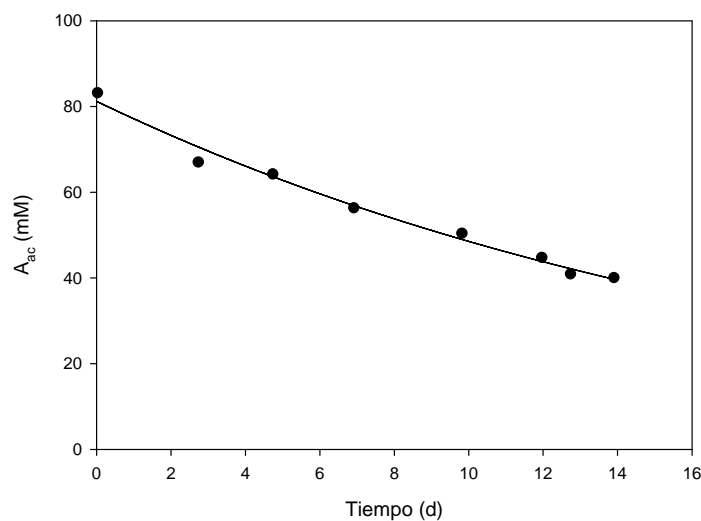
Finalmente, se llevó a cabo la adición aldólica entre dihidroxiacetona fosfato y (S)-Cbz-alaninal a 4°C en el reactor de membrana MBB en semicontinuo empleando un sistema bifásico acetato de etilo:H<sub>2</sub>O con enzima inmovilizada en soporte Co-IDA presente en la fase orgánica. Se empleó un derivado inmovilizado de alta carga, siendo la actividad inicial en la reacción de 3,6 UA/mL de reacción. Se seleccionó una velocidad de agitación de la fase orgánica baja para evitar la rotura del biocatalizador inmovilizado pero asegurando una buena mezcla en el sistema. El caudal de fase acuosa se seleccionó teniendo en cuenta que para evitar las pérdidas de disolvente orgánico hacia la fase acuosa (*leakage*) es necesario crear una sobrepresión en el lado de la fase acuosa, lo que se consigue a caudales de circulación elevados (Doig y col., 1999). Experimentalmente se determinó que el mínimo caudal en el que no se observa este efecto fue de 17,6 mL/min, que fue el que empleado.

Inicialmente, se introdujeron en el biorreactor la fase acuosa con DHAP y la fase orgánica con (S)-Cbz-alaninal y se dejó estabilizar el sistema hasta que no se observó variación en las concentraciones de ambos reactivos, lo que ocurrió tras 2 días de operación. Se deduce, por tanto, que la velocidad de transferencia de materia de los dos reactivos a través de la membrana del MBB presenta un valor bastante bajo. Una vez estabilizado el sistema, se añadió el biocatalizador inmovilizado en la fase orgánica del MBB y se tomaron muestras de ambas fases durante 15 días de operación.

Como se puede observar en la figura 7.9, se ha producido, en efecto, la biocatálisis de la adición aldólica de interés, obteniéndose un rendimiento de reacción del 9,8% tras 15 días de operación. El producto se concentra mayoritariamente en la fase orgánica del sistema. Por otro lado, el consumo de (S)-Cbz-alaninal observado concuerda con la aparición de producto obtenido. Respecto al comportamiento de DHAP durante la reacción (figura 7.10), se puede observar una caída en la concentración en la fase acuosa superior a la correspondiente a la adición aldólica, lo que es probable que se deba a degradación química de DHAP, que en este medio puede exhibir una mayor velocidad de la que se había estudiado anteriormente en un medio acuoso con dimetilformamida como cosolvente (Suau y col., 2006). Por lo tanto, se puede concluir que es posible llevar a cabo la adición aldólica entre DHAP y (S)-Cbz-alaninal en el biorreactor MBB propuesto aunque es necesario un mayor trabajo de optimización del sistema y de las condiciones de operación para mejorar el rendimiento de reacción obtenido.



**Figura 7.9.** Evolución de la concentración de producto en la fase orgánica ( $P_{org}$ ) y en la fase acuosa ( $P_{ac}$ ) en la adición aldólica entre DHAP y (S)-Cbz-alaninal a 4°C catalizada por ramnulosa-1-fosfato aldolasa inmovilizada en Co-IDA en reactor de membrana con medio bifásico acetato de etilo:H<sub>2</sub>O.



**Figura 7.10.** Evolución de la concentración de dihidroxiacetona fosfato en la fase acuosa ( $A_{ac}$ ) en la adición aldólica entre DHAP y (S)-Cbz-alaninal a 4°C catalizada por ramnulosa-1-fosfato aldolasa inmovilizada en Co-IDA en reactor de membrana con medio bifásico acetato de etilo:H<sub>2</sub>O.

## 7.4. Conclusiones

En el presente capítulo se han estudiado dos estrategias de reacción diferentes en la biocatálisis con ramnulosa-1-fosfato aldolasa recombinante (RhuA) de la adición aldólica entre dihidroxiacetona fosfato y (S)-Cbz-alaninal. Por un lado, se ha propuesto el medio de reacción 80 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, 15% v/v [BMIM][BF<sub>4</sub>], pH 7,4 como medio alternativo al medio acuoso con dimetilformamida como cosolvente que se había empleado hasta el momento en la adición aldólica entre DHAP y (S)-Cbz-alaninal catalizada por ramnulosa-1-fosfato aldolasa a 4°C. En este medio de reacción se ha obtenido una elevada estabilidad de la enzima así como un posible aumento de la velocidad de reacción de adición aldólica respecto del medio anteriormente empleado. Sin embargo, la baja solubilidad del (S)-Cbz-alaninal obtenida en el medio propuesto junto con la falta de un método analítico de cuantificación del producto de adición y del (S)-Cbz-alaninal limitan la aplicación de este medio en la reacción de adición aldólica de interés.

Por otro lado, se ha estudiado la aplicación de un biorreactor de membrana para biotransformaciones empleando un medio bifásico acetato de etilo:H<sub>2</sub>O a la biocatálisis de la adición aldólica de interés. Se ha obtenido una elevada solubilidad de DHAP en la fase acuosa y de (S)-Cbz-alaninal en la fase orgánica, obteniéndose una baja concentración en la fase menos afín, pudiéndose determinar los coeficientes de reparto en el sistema propuesto. El biorreactor de membrana ha sido operado durante 15 días observándose un rendimiento de un 10% aproximadamente, causado probablemente por la baja velocidad de transferencia de materia entre fases observada o por una posible inactivación de la enzima en la fase orgánica. Por lo tanto, es necesario un futuro trabajo de optimización del sistema y de las condiciones de operación para obtener un mayor rendimiento de reacción y productividad en este sistema. Para ello, se propone el estudio de membranas hidrófilas que permitan una mayor transferencia de DHAP hacia la fase orgánica que contiene la enzima y el reactivo hidrófobo así como un estudio de otros sistemas bifásicos que presenten unos coeficientes de reparto de reactivos más favorables.

# CONCLUSIONES

Las conclusiones que se extraen del presente trabajo de tesis doctoral se pueden resumir como sigue:

- Se ha obtenido y validado un modelo cinético de la adición aldólica entre dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y (S)-Cbz-alaninal catalizada por ramnulosa-1-fosfato aldolasa recombinante (RhuA) a 4°C en medio 50 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 20% v/v DMF, pH 7,0. El modelo cinético que ajusta los datos experimentales corresponde a un mecanismo ordenado de dos sustratos con inhibición competitiva por metilglioxal y por producto y presenta una reacción secundaria de degradación enzimática de DHAP que se ajusta a una cinética de Michaelis-Menten de un sustrato con inhibición competitiva por metilglioxal.

- El máximo rendimiento y selectividad de la adición aldólica entre DHAP y (S)-Cbz-alaninal catalizada por RhuA soluble en medio acuoso con dimetilformamida como cosolvente depende de la relación entre las concentraciones iniciales de los reactivos, siendo la relación óptima propuesta 3, con la que se obtiene un rendimiento y una selectividad superiores al 80%.

- Se ha desarrollado un proceso de purificación e inmovilización en un único paso aplicado a las enzimas fuculosa-1-fosfato aldolasa (FucA) y ramnulosa-1-fosfato aldolasa (RhuA) recombinantes empleando soportes de afinidad a metales quelados que permite reducir las pérdidas de actividad enzimática que se pueden producir realizando los dos procesos por separado.

- Tras el estudio del efecto del metal presente en los soportes de afinidad, la densidad de grupos quelantes y la temperatura de inmovilización con FucA

recombinante se seleccionó el soporte Co-IDA con el que se obtuvo a 4°C el mayor rendimiento de inmovilización (próximo al 100%) y actividad retenida (60%). Los derivados inmovilizados de FucA en este soporte exhibieron una mayor estabilidad que la enzima soluble en un medio de dimetilformamida como cosolvente tanto a 4°C como a 24°C y fueron aplicados con éxito en la biocatálisis de interés, obteniéndose un mayor rendimiento y selectividad que en el caso de emplear FucA soluble. Se observó que tanto la estabilidad enzimática como el rendimiento y selectividad de la reacción dependen del metal que contenga el soporte.

- El empleo del soporte de afinidad Co-IDA en la purificación convencional de FucA permitió elevar el rendimiento en actividad alcanzado hasta un 83%. Posteriormente se determinó que este aumento de la actividad recuperada tras la purificación se debe a un intercambio del  $Zn^{n+2}$  presente en el centro activo de la enzima con el metal del soporte de afinidad, y que el intercambio con cobalto produce un aumento de la actividad enzimática de FucA.

- Los derivados inmovilizados de FucA sobre Co-IDA presentan limitaciones difusionales frente a la reacción del ensayo enzimático incluso a muy baja carga enzimática. Esto puede deberse a una inmovilización en multicapa en las partes más accesibles del soporte ya que se determinó que estos soportes admiten una carga enzimática máxima muy superior a la carga teórica.

- Se han obtenidos unos derivados inmovilizados de RhuA recombinante en soporte Co-IDA mediante purificación e inmovilización en un solo paso, alcanzado unos elevados rendimientos de inmovilización (próximo al 100%) y de actividad retenida (90%) en ausencia de limitaciones difusionales. Estos biocatalizadores inmovilizados presentan una mayor estabilidad en la incubación a 4°C en el medio de reacción que la enzima soluble y catalizan satisfactoriamente la adición aldólica entre dihidroxiacetona fosfato y (S)-Cbz-alaninal, obteniéndose un rendimiento y

selectividad similar al obtenido con RhuA purificada en columna de Co-IDA (en torno al 70%) y ajustándose al modelo cinético obtenido con RhuA soluble.

- Se determinó el límite de operación sin limitaciones difusionales en la catálisis con derivados inmovilizados de RhuA en Co-IDA estableciéndose en 10 UA/mL de soporte para la reacción del ensayo enzimático y 26 UA/mL de soporte para la reacción de adición aldólica de interés. Se sugiere también una posible inmovilización en multicapa, aunque en menor extensión que la anterior enzima, lo que también se observa en el menor valor de carga máxima del soporte que se obtiene en RhuA respecto FucA (68 y 169 mg de proteína/mL de soporte respectivamente).

- Se ha realizado con éxito la inmovilización de ramnulosa-1-fosfato aldolasa recombinante en nanopartículas de oro de 55 nm para la obtención de un biocatalizador inmovilizado de alta carga, siendo necesaria una carga enzimática ofrecida superior a 2,3 mg de RhuA/mL de soporte para alcanzar la saturación de la superficie de la nanopartícula. La inmovilización de RhuA sobre nanopartículas de oro se produce mayoritariamente en monocapa.

- El derivado inmovilizado de RhuA en nanopartículas de oro conserva un 60% de la actividad inicial tras 27 horas de incubación a 4°C en el medio 50 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 20% v/v DMF, pH 7,0, habiéndose observado indicios de un aumento de la estabilidad de la enzima inmovilizada respecto a la enzima soluble. Estos derivados inmovilizados se han empleado en la catálisis de la reacción de interés, obteniéndose una elevada velocidad de reacción que corresponde a una actividad enzimática 4,5 veces mayor a la que teóricamente se había inmovilizado, por lo se produce una activación de la enzima al inmovilizarla sobre estos soportes y en mayor grado en el caso de la adición aldólica. Este biocatalizador se empleó en la catálisis de un segundo ciclo de reacción constatándose una recuperación de la actividad del biocatalizador del 40%.

- Se ha propuesto el medio de reacción [BMIM][BF<sub>4</sub>] al 15% v/v en 80 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, pH 7,4 como medio alternativo al medio acuoso con dimetilformamida como cosolvente que se había empleado hasta el momento en la adición aldólica entre DHAP y (S)-Cbz-alaninal catalizada por ramnulosa-1-fosfato aldolasa a 4°C. En este medio de reacción se ha obtenido una elevada estabilidad de la enzima así como un posible aumento de la velocidad de reacción de adición aldólica respecto del medio anteriormente empleado.

- Se ha estudiado la aplicación de un biorreactor de membrana para biotransformaciones empleando un medio bifásico acetato de etilo:H<sub>2</sub>O a la biocatálisis de la adición aldólica de interés. Se ha obtenido una elevada solubilidad de DHAP en la fase acuosa y de (S)-Cbz-alaninal en la fase orgánica, obteniéndose una baja concentración en la fase menos afín, pudiéndose determinar los coeficientes de reparto en el sistema propuesto. Se ha obtenido un rendimiento de reacción del 10% aproximadamente tras 15 días de operación, probablemente debido a la baja velocidad de transferencia de materia entre fases observada o a una posible inactivación de la enzima en la fase orgánica.

Con el fin de seguir avanzando en el desarrollo de un proceso biocatalítico con ramnulosa-1-fosfato aldolasa recombinante de aplicación industrial se proponen distintas líneas de trabajo enumeradas a continuación.

- Estudiar la posibilidad de recuperación del biocatalizador inmovilizado en Co-IDA en sucesivos ciclos de reacción en batch.

- Estudiar la operación en columna de lecho fijo con el biocatalizador inmovilizado en Co-IDA, lo que permitiría realizar la purificación, inmovilización y reacción catalítica en el mismo equipo, con la consiguiente reducción de los tiempos de operación.



- Emplear otros métodos de inmovilización con ramnulosa-1-fosfato aldolasa como pueden ser nanopartículas magnéticas y Lentikats®.

- Analizar otros medios de reacción como por ejemplo, otros líquidos iónicos monofásicos o bifásicos, para aumentar la solubilidad del reactivo hidrófilo de la reacción y poder alcanzar mayores productividades.

- Ampliar el estudio de la operación en el biorreactor de membrana MBB mediante el estudio de membranas hidrófilas así como un estudio de otros sistemas bifásicos que presenten unos favorables coeficientes de reparto.

- Analizar diferentes estrategias *down-stream* de recuperación del producto de adición.

- Estudiar la integración de la adición aldólica con ramnulosa-1-fosfato aldolasa recombinante con otras reacciones enzimáticas de producción de (S)-Cbz-alaninal que se están desarrollando en el grupo.

- Realizar un estudio de viabilidad económica del proceso global considerando las distintas estrategias estudiadas con el fin de seleccionar el proceso más rentable a nivel industrial.

- Modelizar, simular y optimizar las condiciones de operación del sistema seleccionado y realizar el escalado del proceso.



# BIBLIOGRAFÍA

- Aehle, W. (2004). *Enzymes in industry. Production and applications*. Wiley-VCH, Weinheim.
- Baganz, F.; Chen, B.; Dalby, P.; Hibbert, E.; Lye, G.; Micheletti, M.; Woodley, J.; Kaulmann, U.; Ward, J.; Hailes, H.; Smith, M.; Smithies, K. (2007). Accelerating biocatalytic process design: integrating new tools from biology, chemistry and engineering. *Journal of Biotechnology*, 131(2, Supplement 1), S78-S78.
- Balcão, V.M.; Mateo, C.; Fernández-Lafuente, R.; Malcata, F.X.; Guisán, J.M. (2001). Structural and functional stabilization of L-asparaginase via multisubunit immobilization onto highly activated supports. *Biotechnology Progress*, 17, 537-542.
- Baron, R.; Willner, B.; Willner, I. (2007). Biomolecule–nanoparticle hybrids as functional units for nanobiotechnology. *Chemical Communications*, 4, 323-332.
- Bastus, N.G.; Kogan, M.J.; Amigo, R.; Grillo-Bosch, D.; Araya, E.; Turiel, A.; Labarta, A.; Giralt, E.; Puentes, V.F. (2007). Gold nanoparticles for selective and remote heating of B-amyloid protein aggregates. *Materials Science and Engineering C*, 27, 1236-1240.
- Beilen, J.B.v.; Li, Z. (2002). Enzyme technology: an overview. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(4), 338-344.
- Bernhardt, P.; O'Connor, S.E. (2009). Opportunities for enzyme engineering in natural product biosynthesis. *Current Opinion in Chemical Biology*, 13, 35-42.
- Betancor, L.; Hidalgo, A.; Fernández-Lorente, G.; Mateo, C.; Fernández-Lafuente, R.; Guisán, J.M. (2003). Preparation of a stable biocatalyst of bovine liver catalase using immobilization and postimmobilization techniques. *Biotechnology Progress*, 19, 763-767.
- Bommarius, A.S.; Riebel, B.R. (2004). *Biocatalysis*. Wiley-VCH, Weinheim.
- Bonner, P.L.R. (2007). *Protein purification*. Taylor&Francis Group, New York.
- Boyer, P.D. (1972). *The enzymes*. Academic Press, New York.
- Breuer, M.; Hauer, B. (2003). Carbon-carbon coupling in biotransformation. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(6), 570-576.

- Buchholz, K.; Seibel, J. (2008). Industrial carbohydrate biotransformations. *Carbohydrate Research*, 343(12), 1966-1979.
- Budde, C.L.; Khmelnsky, Y.L. (1999). Aldolase stability in the presence of organic solvents. *Biotechnology Letters*, 21(1), 77-80.
- Buque-Taboada, E.M.; Straathof, A.J.J.; Heijnen, J.J.; Wielen, L.A.M.v.d. (2004). In situ product removal using a crystallization loop in asymmetric reduction of 4-oxoisophorone by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 86(7), 795-800.
- Burton, S.G.; Cowan, D.A.; Woodley, J.M. (2002). The search for the ideal biocatalyst. *Nature Biotechnology*, 20(1), 37-45.
- Cabral, J.M.S.; Best, D.; Boross, L.; Tramper, J. (1994). *Applied Biocatalysis*. Harwood Academic Publishers, Chur.
- Caines, M.E.C.; Hancock, S.M.; Tarling, C.A.; Wrodnigg, T.M.; Stick, R.V.; Stütz, A.E.; Vasella, A.; Withers, S.G.; Strynadka, N.C.J. (2007). The structural basis of glycosidase inhibition by five-membered iminocyclitols: the clan A glycoside hydrolase endoglycoceramidase as a model system. *Angewandte Chemie International Edition*, 46(24), 4474-4476.
- Cao, L. (2005). *Carrier-bound immobilized enzymes*. Wiley-VCH, Weinheim.
- Cleland, W.W. (1979). *Methods in Enzymology*, 63, 500-551.
- Comenge, J. (2009). *Synthesis and characterization of large biocompatible gold nanoparticles*. Memoria de máster, Universitat Autònoma de Barcelona
- Chen, J.-P.; Su, D.-R. (2001). Latex particles with thermo-flocculation and magnetic properties for immobilization of alpha-chymotrypsin. *Biotechnology Progress*, 17(2), 369-375.
- Chiu, T.-H.; Feingold, D.S. (2002). L-rhamnulose-1-phosphate aldolase from *Escherichia coli*. Crystallization and properties. *Biochemistry*, 8(1), 98-108.
- Daniel, M.C.; Astruc, D. (2004). Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chemical Reviews*, 104, 293-346.
- de Gonzalo, G.; Lavandera, I.; Faber, K.; Kroutil, W. (2007). Enzymatic reduction of ketones in "micro-aqueous" media catalyzed by ADH-A from *Rhodococcus ruber*. *Organic Letters*, 9(11), 2163-2166.

- De, M.; Rana, S.; Rotello, V.M. (2009). Nickel-ion-mediated control of the stoichiometry of His-tagged protein/nanoparticle interactions. *Macromolecular Bioscience*, 9, 174-178.
- de Maria, P.D. (2008). Nonsolvent applications of ionic liquids in biotransformations and organocatalysis. *Angewandte Chemie International Edition*, 47, 6960-6968.
- De Vos, D.E.; Vankelecom, I.F.J.; Jacobs, P.A. (2000). Chiral catalyst immobilization and recycling. Wiley-VCH, Weinheim.
- Doig, S.D.; Boam, A.T.; Leak, D.J.; Livingston, A.; Stuckey, D.C. (1998). A membrane bioreactor for biotransformations of hydrophobic molecules. *Biotechnology and Bioengineering*, 58(6), 587-594.
- Doig, S.D.; Boam, A.T.; Livingston, A.; Stuckey, D.C. (1999). Mass transfer of hydrophobic solutes in solvent swollen silicone rubber membranes. *Journal of Membrane Science*, 154, 127-140.
- Domaiska, U. (2005). Solubilities and thermophysical properties of ionic liquids. *Pure and Applied Chemistry*, 77(3), 543-557.
- Dreyer, M.K.; Schulz, G.E. (1996a). Catalytic mechanism of the metal-dependent fuculose aldolase from *Escherichia coli* as derived from the structure. *Journal of Molecular Biology*, 259(3), 458-466.
- Dreyer, M.K.; Schulz, G.E. (1996b). Refined high-resolution structure of the metal-ion dependent L-fuculose-1-phosphate aldolase (class II) from *Escherichia coli*. *Acta Crystallographica Section D*, 52(6), 1082-1091.
- Dreyer, S.; Kragl, U. (2008). Ionic liquids for aqueous two-phase extraction and stabilization of enzymes. *Biotechnology and Bioengineering*, 99, 1416-1424.
- Drioli, E.; Giorno, L. (1999). Biocatalytic membrane reactors: applications in biotechnology and the pharmaceutical industry. Taylor&Francis Group, New York.
- Dullius, J.E.L.; Suarez, P.A.Z.; Einloft, S.; de Souza, R.F.; Dupont, J.; Fischer, J.; De Cian, A. (1998). Selective catalytic hydrodimerization of 1,3-butadiene by palladium compounds dissolved in ionic liquids. *Organometallics*, 17(5), 815-819.
- Durany, O. (2000). Desenvolupament de metodologia per a la producció de fuculosa-1-fosfat aldolasa. Memoria de máster, Universitat Autònoma de Barcelona
- Durany, O.; de Mas, C.; López Santín, J. (2005). Fed-batch production of recombinant fuculose-1-phosphate aldolase in *E. coli*. *Process Biochemistry*, 40(2), 707-716.

- Espelt, L.; Bujons, J.; Parella, T.; Calveras, J.; Joglar, J.; Delgado, A.; Clapés, P. (2005). Aldol additions of dihydroxyacetone phosphate to N-Cbz-Amino aldehydes catalyzed by L-fuculose-1-phosphate aldolase in emulsion systems: inversion of stereoselectivity as a function of the acceptor aldehyde. *Chemistry-A European Journal*, 11, 1392-1401.
- Espelt, L.; Parella, T.; Bujons, J.; Solans, C.; Joglar, J.; Delgado, A.; Clapés, P. (2003). Stereoselective aldol additions catalyzed by dihydroxyacetone phosphate-dependent aldolases in emulsion systems: preparation and structural characterization of linear and cyclic iminopolyols from aminoaldehydes. *Chemistry-A European Journal*, 9, 4887-4899.
- Faber, K. (2004). *Biotransformations in organic chemistry*. Springer, Berlín.
- Fernández-Lafuente, R.; Hernández-Jústiz, O.; Mateo, C.; Terreni, M.; Fernández-Lorente, G.; Moreno, M.A.; Alonso, J.; García-López, J.L.; Guisán, J.M. (2001). Biotransformations catalyzed by multimeric enzymes: stabilization of tetrameric ampicillin acylase permits the optimization of ampicillin synthesis under dissociation conditions. *Biomacromolecules*, 2, 95-104.
- Fessner, W.-D.; Helaine, V. (2001). Biocatalytic synthesis of hydroxylated natural products using aldolases and related enzymes. *Current Opinion in Biotechnology*, 12(6), 574-586.
- Fessner, W.-D.; Schneider, A.; O, E.; Sinerius, G.; Badia, J. (1993). 6-deoxy-L-lyxo- and 6-deoxy-L-arabino-hexulose 1-phosphates. Enzymic synthesis by antagonistic metabolic pathways. *Tetrahedron Asymmetry*, 41, 781-790.
- Fessner, W.-D.; Walter, C. (1997). Enzymatic C-C bond formation in asymmetric synthesis. *Topics in Current Chemistry*, 184, 97-194.
- García-Junceda, E.; García-García, J.F.; Bastida, A.; Fernández-Mayoralas, A. (2004). Enzymes in the synthesis of bioactive compounds: the prodigious decades. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 12(8), 1817-1834.
- García-Junceda, E.; Shen, G.-J.; Sugai, T.; Wong, C.-H. (1995). A new strategy for the cloning, overexpression and one step purification of three DHAP-dependent aldolases: rhamnulose-1-phosphate aldolase, fuculose-1-phosphate aldolase and tagatose-1,6-diphosphate aldolase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 3(7), 945-953.
- Geneviève, M.; Vieu, C.; Carles, R.; Zwick, A.; Brière, G.; Salomé, L.; Trévisiol, E. (2007). Biofunctionalization of gold nanoparticles and their spectral properties. *Microelectronic Engineering*, 84(5-8), 1710-1713.
- Gòdia, F.; López-Santín, J. (1998). *Ingeniería Bioquímica*. Editorial Síntesis, Madrid.
- Goodsell, D.S. (2004). *Bionanotechnology: lessons from nature*. Wiley-Liss, Inc., New Jersey.

- Grueninger, D.; Schulz, G.E. (2008). Antenna domain mobility and enzymatic reaction of L-rhamnulose-1-phosphate aldolase. *Biochemistry*, 47(2), 607-614.
- Guo, H.-M.; Niu, H.-Y.; Xue, M.-X.; Guo, Q.-X.; Cun, L.-F.; Mi, A.-Q.; Jiang, Y.-Z.; Wang, J.-J. (2006). L-Proline in an ionic liquid as an efficient and reusable catalyst for direct asymmetric  $\alpha$ -aminoxylation of aldehydes and ketones. *Green Chemistry*, 8, 682-684.
- Hage, D.S. (2006). *Handbook of affinity chromatography*. Taylor&Francis Group, New York.
- Hilker, I.; Baldwin, C.; Alphand, V.; Furstoss, R.; Woodley, J.; Wohlgemuth, R. (2006). On the influence of oxygen and cell concentration in an SFPR whole cell biocatalytic Baeyer-Villiger oxidation process. *Biotechnology and Bioengineering*, 93(6), 1138-1144.
- Ho, L.-F.; Li, S.-Y.; Lin, S.-C.; Hsu, W.-H. (2004). Integrated enzyme purification and immobilization processes with immobilized metal affinity adsorbents. *Process Biochemistry*, 39, 1573-1581.
- Huang, G.S.; Chen, Y.-S.; Yeh, H.-W. (2006). Measuring the flexibility of immunoglobulin by gold nanoparticles. *Nano Letters*, 6(11), 2467-2471.
- Huang, S.-H.; Liao, M.-H.; Chen, D.-H. (2003). Direct binding and characterization of lipase onto magnetic nanoparticles. *Biotechnology Progress*, 19(3), 1095-1100.
- Illanes, A. (2008). *Enzyme biocatalysis. Principles and applications*. Springer, Berlín.
- Jia, H.; Zhu, G.; Wang, P. (2003). Catalytic behaviors of enzymes attached to nanoparticles: the effect of particle mobility. *Biotechnology and Bioengineering*, 84(4), 406-414.
- Joerger, A.C.; Gosse, C.; Fessner, W.-D.; Schulz, G.E. (2000). Catalytic action of fuculose 1-phosphate aldolase (class II) as derived from structure-directed mutagenesis. *Biochemistry*, 39(20), 6033-6041.
- Kane, R.S.; Stroock, A.D. (2007). Nanobiotechnology: protein-nanomaterial interactions. *Biotechnology Progress*, 23, 316-319.
- Kim, J.; Grate, J.W.; Wang, P. (2006a). Nanostructures for enzyme stabilization. *Chemical Engineering Science*, 61(3), 1017-1026.
- Kim, J.; Jia, H.; Wang, P. (2006b). Challenges in biocatalysis for enzyme-based biofuel cells. *Biotechnology Advances*, 24(3), 296-308.
- Kimling, J.; Maier, M.; Okenve, B.; Kotaidis, V.; Ballot, H.; Plech, A. (2006). Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited. *The Journal of Physical Chemistry B*, 110(32), 15700-15707.

- Kirk, O.; Borchert, T.V.; Fuglsang, C.C. (2002). Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(4), 345-351.
- Kouassi, G.; Irudayaraj, J.; McCarty, G. (2005). Examination of cholesterol oxidase attachment to magnetic nanoparticles. *Journal of Nanobiotechnology*, 3(1).
- Kroemer, M.; Merkel, I.; Schulz, G.E. (2003). Structure and catalytic mechanism of L-rhamnulose-1-phosphate Aldolase. *Biochemistry*, 42(36), 10560-10568.
- Kroemer, M.; Schulz, G.E. (2002). The structure of L-rhamnulose-1-phosphate aldolase (class II) solved by low-resolution SIR phasing and 20-fold NCS averaging. *Acta Crystallographica Section D*, 58(5), 824-832.
- Lee, S.H.; Lee, S.B. (2005). The Hildebrand solubility parameters, cohesive energy densities and internal energies of 1-alkyl-3-methylimidazolium-based room temperature ionic liquids. *Chemical Communications*, 3469-3471.
- Levenspiel, O. (1998). *Ingeniería de las reacciones químicas*. Editorial Reverté, Barcelona.
- Liang, P.-H.; Cheng, W.-C.; Lee, Y.-L.; Yu, H.-P.; Wu, Y.-T.; Lin, Y.-L.; Wong, C.-H. (2006). Novel five-membered iminocyclitol derivatives as selective and potent glycosidase inhibitors: new structures for antivirals and osteoarthritis. *ChemBioChem*, 7(1), 165-173.
- Liao, M.-H.; Chen, D.-H. (2001). Immobilization of yeast alcohol dehydrogenase on magnetic nanoparticles for improving its stability. *Biotechnology Letters*, 23, 1723-1727.
- Lin, H.-M.; Tien, H.-Y.; Hone, Y.-T.; Lee, M.-J. (2007). Solubility of selected dibasic carboxylic acids in water, in ionic liquid of [Bmim][BF<sub>4</sub>], and in aqueous [Bmim][BF<sub>4</sub>] solutions. *Fluid Phase Equilibria*, 253(2), 130-136.
- Liu, J.; Lin, S.; Qi, D.; Deng, C.; Yang, P.; Zhang, X. (2007). On-chip enzymatic microreactor using trypsin-immobilized superparamagnetic nanoparticles for highly efficient proteolysis. *Journal of Chromatography A*, 1176(1-2), 169-177.
- Livingston, A.; Boam, A.T.; Stuckey, D.C.; Leak, D.J. Apparatus and method for biotransformations. World patent, WO 96/18719, 20/06/96.
- Lorenz, P.; Eck, J. (2005). Metagenomics and industrial applications. *Nature Reviews Microbiology*, 3(6), 510-516.
- Lou, W.-Y.; Zong, M.-H.; Liu, Y.-Y.; Wang, J.-F. (2006). Efficient enantioselective hydrolysis of d,l-phenylglycine methyl ester catalyzed by immobilized *Candida antarctica* lipase B in ionic liquid containing systems *Journal of Biotechnology*, 125(1), 64-74.



- Machajewski, T.D.; Wong, C.-H. (2000). The catalytic asymmetric aldol reaction. *Angewandte Chemie International Edition*, 39(8), 1352-1375.
- Mateo, C.; Fernández-Lorente, G.; Cortés, E.; García, J.L.; Fernández-Lafuente, R.; Guisán, J.M. (2001). One step purification, covalent immobilization, and additional stabilization of poly-his-tagged proteins using novel heterofunctional chelate-epoxy supports. *Biotechnology and Bioengineering*, 76(3), 269-276.
- Mathews, C.K.; Van Holde, K.E. (1990). *Biochemistry*. Benjamin Cummings, Redwood City.
- Moralejo, P.; Egan, S.M.; Hidalgo, E.; Aguilar, J. (1993). Sequencing and characterization of a gene-cluster encoding the enzymes for L-rhamnose metabolism in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 175(17), 5585-5594.
- Mozhaev, V.V. (1993). Mechanism-based strategies for protein thermostabilization. *Tibtech*, 11, 88-95.
- Ohno, H.; Suzuki, C.; Fukumoto, K.; Yoshizawa, M.; Fujita, K. (2003). Electron transfer process of poly(ethylene oxide)-modified cytochrome C in imidazolium type ionic liquid. *Chemistry Letters*, 32(5), 450-451.
- Ou, W.-H.; Huang, Z.-Z. (2006). An efficient and practical synthesis of chiral imidazolium ionic liquids and their application in an enantioselective Michael reaction. *Green Chemistry*, 8, 731-734.
- Pandey, P.; Singh, S.P.; Arya, S.K.; Gupta, V.; Datta, M.; Singh, S.; Malhotra, B.D. (2007). Application of thiolated gold nanoparticles for the enhancement of glucose oxidase activity. *Langmuir*, 23(6), 3333-3337.
- Persson, M.; Bornscheuer, U.T. (2003). Increased stability of an esterase from *Bacillus stearothermophilus* in ionic liquids as compared to organic solvents *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 22(1-2), 21-27.
- Pessela, B.C.C.; Mateo, C.; Fuentes, M.; Vian, A.; García, J.L.; Carrascosa, A.V.; Guisán, J.M.; Fernández-Lafuente, R. (2004). Stabilization of a multimeric  $\beta$ -galactosidase from *Thermus sp.* strain T2 by immobilization on novel heterofunctional epoxy supports plus aldehyde-dextran cross-linking. *Biotechnology Progress*, 20, 388-392.
- Phadtare, S.; Sastry, M. Process for the immobilization of enzymes. US patent, US 2006/0141596, 29/06/2006.
- Pingarrón, J.M.; Yáñez-Sedeño, P.; González-Cortés, A. (2008). Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors. *Electrochimica Acta*, 53(19), 5848-5866.

- Pinsach, J.; de Mas, C.; López-Santín, J. (2006). A simple feedback control of *Escherichia coli* growth for recombinant aldolase production in fed-batch mode. *Biochemical Engineering Journal*, 29(3), 235-242.
- Poole, C.P.; Owens, F.J. (2007). *Introducción a la Nanotecnología*. Editorial Reverté, Barcelona.
- Powell, K.A.; Ramer, S.W.; Cardayré, S.B.d.; Stemmer, W.P.C.; Tobin, M.B.; Longchamp, P.F.; Huisman, G.W. (2001). Directed evolution and biocatalysis. *Angewandte Chemie International Edition*, 40(21), 3948-3959.
- Qiagen (2003). *The QIAexpressionist™*. Catálogo comercial.
- Ringler, P.; Schulz, G.E. (2003). Self-assembly of proteins into designed networks. *Science*, 302(5642), 106-109.
- Roe, S. (2001). *Protein purification techniques*. Oxford University Press, New York.
- Rogers, R.D.; Broker, G.A.; LKlingshirn, M.A.; Holbrey, J.D. (2001). Solubility determination of organic and inorganic compounds in hydrophobic and hydrophilic room temperature ionic liquids. Abstracts of the Papers, 222nd American Chemical Society National Meeting.
- Roosen, C.; Müller, P.; Greiner, L. (2008). Ionic liquids in biotechnology: applications and perspectives for biotransformations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81, 607-614.
- Ruiz, J. (2007). *Estudi de derivats enzimàtics immobilitzats de ramnulosa-1-fosfat aldolasa*. Memoria de máster, Universitat Autònoma de Barcelona
- Ruiz, J.; Pinsach, J.; Álvaro, G.; González, G.; Mas, C.d.; Resina, D.; López-Santín, J. (2009). Alternative production process strategies in *E. coli* improving protein quality and downstream yields *Process Biochemistry*, 44(9), 1039-1045.
- Scurto, A.M.; Aki, S.N.V.K.; Brennecke, J.F. (2003). Carbon dioxide induced separation of ionic liquids and water. *Chemical Communications*, 572-573.
- Schmid, A.; Hollmann, F.; Park, J.B.; Bühler, B. (2002). The use of enzymes in the chemical industry in Europe. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(4), 359-366.
- Schoevaart, R.; van Rantwijk, F.; Sheldon, R.A. (2000). A four-step enzymatic cascade for the one-pot synthesis of non-natural carbohydrates from glycerol. *The Journal of Organic Chemistry*, 65(21), 6940-6943.
- Seetharam, R.; Sharma, S.K. (1991). *Purification and analysis of recombinant proteins*. Marcel Dekker, Inc., New York.

- Segel, I.H. (1993). *Enzyme kinetics: behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems*. John Wiley and Sons, New York.
- Shvedene, N.V.; Borovskaya, S.V.; Sviridov, V.V.; Ismailova, E.R.; Pletnev, I.V. (2005). Measuring the solubilities of ionic liquids in water using ion-selective electrodes. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 381, 427-430.
- Siegel, R.W.; Hu, E.; Roco, M.C. (1999). *Nanostructure science and technology: a worldwide study*. National Science and Technology Council, Maryland.
- Suarez, P.A.Z.; Einloft, S.; Dullius, J.E.L.; Souza, R.F.d.; Dupont, J. (1998). Synthesis and physical-chemical properties of ionic liquids based on 1-n-butyl-3-methylimidazolium cation. *Journal de Chimie Physique et de Physico-Chimie Biologique*, 95(7), 1626-1639.
- Suau, T. (2007). Fuculosa-1-fosfat aldolasa com a biocatalitzador en síntesi: model cinètic i immobilització. Tesis Doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona
- Suau, T.; Álvaro, G.; Benaiges, M.D.; López-Santín, J. (2006). Influence of secondary reactions on the synthetic efficiency of DHAP-aldolases. *Biotechnology and Bioengineering*, 93(1), 48-55.
- Suau, T.; Álvaro, G.; Benaiges, M.D.; López-Santín, J. (2008). Kinetic modelling of aldolase-catalyzed addition between dihydroxyacetone phosphate and (S)-alaninal. *Biochemical Engineering Journal*, 41(1), 95-103.
- Sugiyama, M.; Hong, Z.; Greenberg, W.A.; Wong, C.-H. (2007). In vivo selection for the directed evolution of L-rhamnulose aldolase from L-rhamnulose-1-phosphate aldolase (RhaD). *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15(17), 5905-5911.
- Sukumaran, J.; Hanefeld, U. (2005). Enantioselective C-C bond synthesis catalysed by enzymes. *Chemical Society Reviews*, 34(6), 530-542.
- Takayama, S.; McGarvey, G.J.; Wong, C.-H. (1997). Microbial aldolases and transketolases: new biocatalytic approaches to simple and complex sugars. *Annual Review of Microbiology*, 51(1), 285-310.
- Tao, J.; Xu, J.-H. (2009). Biocatalysis in development of green pharmaceutical processes. *Current Opinion in Chemical Biology*, 13(1), 43-50.
- Taylor, K.B. (2004). *Enzyme kinetics and mechanisms*. Kluwer Academic Publishers, New York.

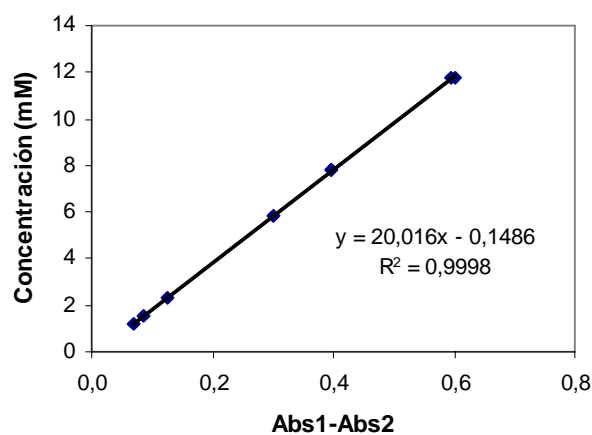
- Torres-Pazmiño, D.E.; Snajdrova, R.; Baas, B.-J.; Ghobrial, M.; Mihovilovic, M.D.; Fraaije, M.W. (2008). Self-sufficient Baeyer-Villiger monooxygenases: effective coenzyme regeneration for biooxygenation by fusion engineering. *Angewandte Chemie International Edition*, 47(12), 2275-2278.
- Trindade, J.R.; Visak, Z.P.; Blesic, M.; Marrucho, I.M.; Coutinho, J.A.P.; Lopes, J.N.C.; Rebelo, L.P.N. (2007). Salting-out effects in aqueous ionic liquid solutions: cloud-point temperature shifts. *Journal of Physical Chemistry B*, 111(18), 4737-4741.
- Tsai, D.-H.; Zangmeister, R.A.; Pease, L.F.; Tarlov, M.J.; Zachariah, M.R. (2008). Gas-phase ion-mobility characterization of SAM-functionalized Au nanoparticles. *Langmuir*, 24, 8483-8490.
- van Herk, T.; Hartog, A.F.; Schoemaker, H.E.; Wever, R. (2006). Simple enzymatic in situ generation of dihydroxyacetone phosphate and its use in a cascade reaction for the production of carbohydrates: increased efficiency by phosphate cycling. *The Journal of Organic Chemistry*, 71(16), 6244-6247.
- Vidal, L. (2006). Producción de aldolasas recombinantes: de la biología molecular al desarrollo de procesos. Tesis Doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona
- Vidal, L.; Pinsach, J.; Striedner, G.; Caminal, G.; Ferrer, P. (2008). Development of an antibiotic-free plasmid selection system based on glycine auxotrophy for recombinant protein overproduction in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 134, 127-136.
- Wang, P. (2006). Nanoscale biocatalyst systems. *Current Opinion in Biotechnology*, 17, 574-579.
- Wilkes, J.S. (2002). A short history of ionic liquids-from molten salts to neoteric solvents. *Green Chemistry*, 4(2), 73-80.
- Wohlgemuth, R. (2009). The locks and keys to industrial biotechnology. *New Biotechnology*, 25(4), 204-213.
- Wong, C.-H.; Whitesides, G.M. (1994). *Enzymes in synthetic organic chemistry*. Pergamon, Oxford.
- Woodley, J.; Lawrence, M.B.; Lilly, M.D. (1995). Use of membranes to separate emulsions for product recovery from two liquid-phase biotransformations. *Abstracts of the Papers of the American Chemical Society*, 209, 126.
- Woodley, J.M. (2008). New opportunities for biocatalysis: making pharmaceutical processes greener. *Trends in Biotechnology*, 26(6), 321-327.

- Woodley, J.M.; Bisschops, M.; Straathof, A.J.J.; Ottens, M. (2008). Future directions for 'in-situ' product removal (ISPR). *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 83(2), 121-123.
- Wu, C.-S.; Wu, C.-T.; Yang, Y.-S.; Ko, F.-H. (2008). An enzymatic kinetics investigation into the significantly enhanced activity of functionalized gold nanoparticles. *Chemical Communications*, 5327 - 5329.
- Zagalak, B.; Frey, P.A.; Karabatsos, G.L.; Abeles, R.H. (1966). The stereochemistry of the conversion of D- and L-1,2-propanediols to propionaldehyde. *Journal of Biological Chemistry*, 241(13), 3028-3035.
- Zhang, S.; Leem, G.; Srisombat, L.-O.; Lee, T.R. (2008). Rationally designed ligands that inhibit the aggregation of large gold nanoparticles in solution. *Journal of the American Chemical Society*, 130(1), 113-120.

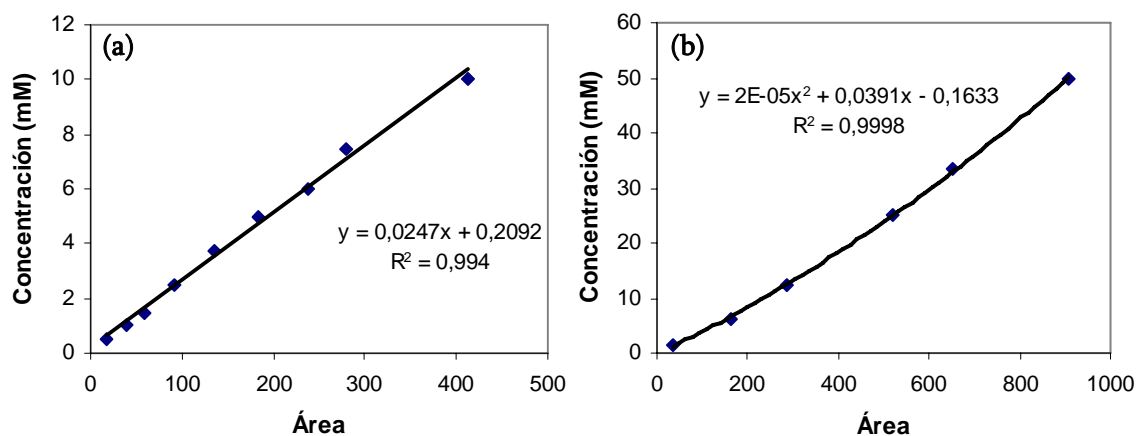


# ANEXOS

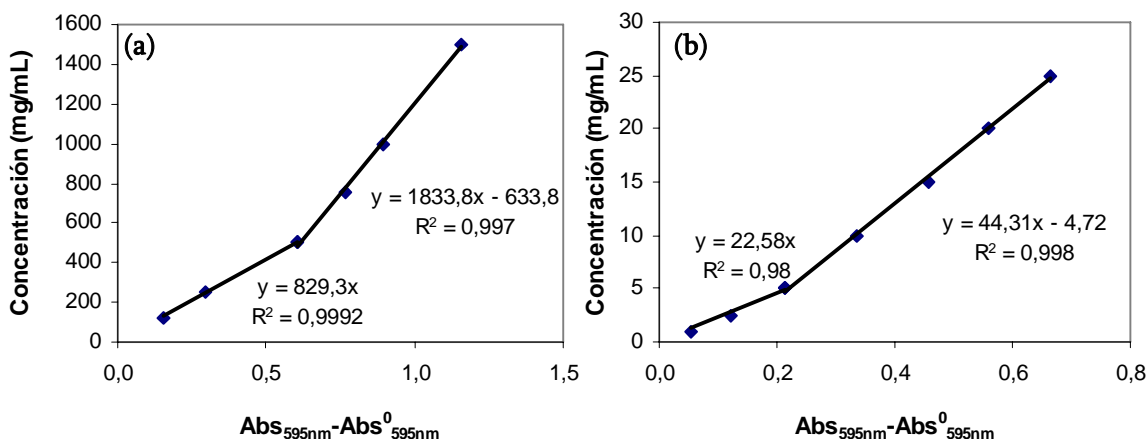
## A.1. Calibrados de los métodos analíticos



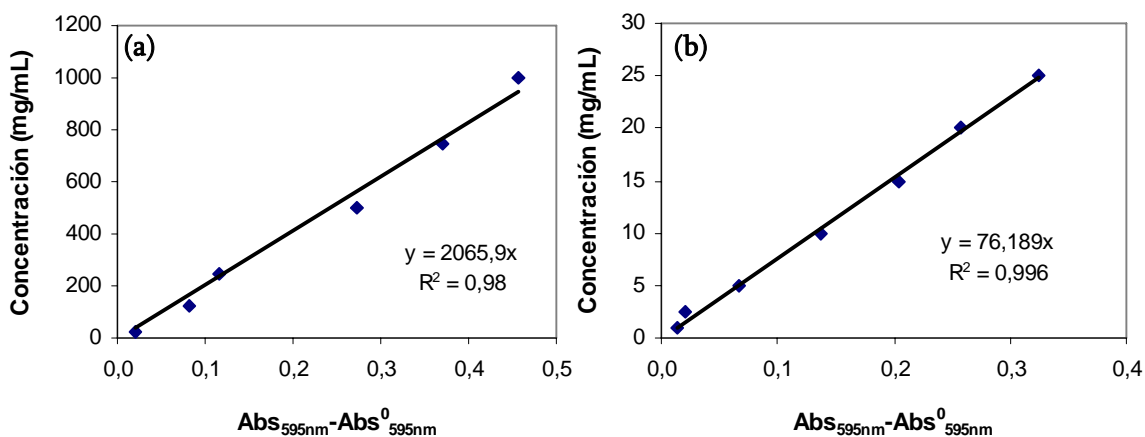
**Figura A.1.** Calibrado para la determinación de la concentración de dihidroxiacetona fosfato (DHAP) a partir de la variación de absorbancia observada a 340 nm.



**Figura A.2.** Calibrado para la determinación de la concentración de (S)-Cbz-alaninal y producto de adición a partir del área de pico obtenido mediante HPLC: (a) medio 50 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 20% v/v DMF, pH 7,0 y (b) acetato de etilo.



**Figura A.3.** Ejemplos de calibrados a partir de patrones de albúmina de sérum bovino (BSA) en la determinación de la concentración de proteína total mediante el método de Bradford: (a) rango 100-1500 µg/mL y (b) rango 1-25 µg/mL.



**Figura A.4.** Ejemplos de calibrados a partir de patrones de ramnulosa-1-fosfato aldolasa (RhuA) en la determinación de la concentración de proteína total a partir de la medida de la absorbancia a 595 nm ( $Abs_{595nm}$ ) menos la absorbancia del blanco a 595 nm ( $Abs_{595nm}^0$ ) mediante el método de Bradford: (a) rango 100-1000 µg/mL y (b) rango 1-25 µg/mL.