



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Universitat Autònoma de Barcelona

Escuela de ingeniería

Departamento de ingeniería química, biológica y ambiental

Co-inmovilización de la cloroperoxidasa y la fructosa-6- fosfato aldolasa para su utilización en la síntesis de pre-D-fagomina

Memoria para optar al grado de doctor en Biotecnología por
la Universidad Autònoma de Barcelona.

Presentada por

Luis Miguel Vázquez Costal

Bellaterra, 03 de Julio de 2019

Título:

Co-inmovilización de la cloroperoxidasa y la fructosa-6-fosfato aldolasa para su utilización en la síntesis de pre-D-fagomina.

Dirigida por:

Gregorio Álvaro Campos

Glòria Caminal Saperas

Programa de doctorado en Biotecnología

Departamento de ingeniería química, biológica y ambiental

Escuela de ingeniería

Universidad Autónoma de Barcelona

GREGORIO ÁLVARO Campos, como profesor agregado del Departamento de Ingeniería Química, Biológica y Ambiental de la Universidad Autónoma de Barcelona y GLÒRIA CAMINAL SAPERAS, como investigadora científica del Instituto de Química Avanzada de Cataluña del consejo Superior de investigaciones científicas.

CERTIFICAMOS:

Que el farmacéutico Luis Miguel Vázquez Costal ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo que con el título “Co-inmovilización de la cloroperoxidasa y la fructosa-6-fosfato aldolasa para su utilización en la síntesis de pre-D-fagomina” presenta en esta memoria y que constituye su Tesis para optar al grado de Doctor en Biotecnología por la Universidad Autónoma de Barcelona.

Y para que conste a los efectos oportunos, presentamos en la Escuela de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Barcelona la mencionada Tesis, firmando el presente certificado en

Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), 03 de julio de 2019

Dr. Gregorio Álvaro Campos

Dra. Glòria Caminal Saperas

*Las grandes cosas deben realizarse
sin dudar, así las posibles dificultades
no serán capaces de detenerte.*

-Cayo Julio César

*Tu talento determina lo que puedes hacer.
Tu motivación determina lo que estás dispuesto a hacer.
Tu actitud determina lo bien que lo haces.*

-Lou Holtz

Agradecimientos

Después de casi cuatro años en Barcelona debo agradecer a cada una de las personas que me han apoyado de una u otra forma durante el desarrollo de mi tesis, tanto en los buenos momentos como en los malos.

Este trabajo de tesis está dedicado a mis padres, Casiano y Rosario, porque sin ellos nada de esto habría sido posible. Sois y siempre seréis la luz de mi vida porque siempre que me he perdido me habéis ayudado a recuperar mi camino. Quiero agradecerlos porque sin vosotros no podría ser el hombre que soy hoy, os quiero. También quiero agradecer a mis padrinos, Camilo y Rosario, porque siempre habéis velado por mi bienestar y el de mi familia, me haría falta una vida entera para agradecerlos.

A mis hermanos Lex, Mau y Santi porque sois y siempre seréis mis mejores amigos. Sois mi inspiración para superarme cada día y mi apoyo cuando no puedo llevar todo el peso de mi carga. Allí donde estéis yo siempre os llevo en mi corazón.

A todos los Vázquez y Costal que me habéis visto crecer y derrumbar todas las barreras que me he encontrado en mi camino. Sé que no soy una persona fácil y que tengo lo peor del carácter de las dos familias, pero mi fortaleza está en vosotros y siempre volveré a casa para tomar un café, una copita de licor y jugar al domino cubano.

Gracias a Goyo y Glòria por confiar en mí y darme la oportunidad de realizar mi tesis doctoral en este grupo. Gracias por vuestra paciencia y por todo lo que me habéis enseñado durante estos 3 años y medio. A todos los miembros del grupo Aldolasas: Josep, Carles, Marina, Peter y Gloria G. por vuestro apoyo. Gracias también a María José Hernáiz y Andrés Alcántara por introducirme en el campo de la biocatálisis.

Gracias a Gerard, Daniela, Jordi, Natalia, Miquel, Mario y Albert por todas las experiencias que hemos pasado entre los laboratorios de fermentaciones I,

fermentaciones V y enzimas. Gracias Gerard por el apoyo científico y emocional que bien sabes que era necesario. Tu Dani por dejarme claro que no soy un niño normal. Jordi por animarnos en los momentos difíciles. A ti Miquel por ser un gran amigo desde el primer día que entraste en el laboratorio, eres una persona increíble así que no cambies ni te rindas por más complicada que se ponga la vida. A ti Natalia por compartir penas e historias. Mario y Albert, mucho ánimo.

Gracias a los compañeros de despacho que animaron hasta los peores días. Mabel gracias por estar ahí siempre para animarme al ritmo de Marc Anthony. Enric gracias por las risas y compartir nuestras penurias. Kirian porque sabes que soy un fan más de Furi Helium. Eva gracias por preocuparte siempre y por las charlas en el despacho. Javi, porque tete no hay nadie mejor al analizar datos. Francesco porque llegaste sin hacer ruido y no dejaste de ayudarme hasta el último día. Gracias también a ustedes María, Dani y Rebeca.

A ti Luis Rafael gracias por ser mi amigo y revolucionar el departamento. A ti Francisco por la ayuda en el laboratorio y en la búsqueda de trabajo. Gracias a ustedes Juanjo y Josu que sois un ejemplo de lo que es la amistad y el compromiso con la tesis. Gracias Ponte por tu calma, tu paciencia y tu guía. Gracias a todos los demás integrantes del grupo de lipasas.

Gracias a todos los que habéis hecho de este departamento un lugar mejor Natalia R., Clara, Eva P., Edu, Irene y todos los demás. Gracias también a las secretarias, técnicos, personal de limpieza y demás personal del departamento que habéis hecho posible este trabajo.

Gracias a todos los alumnos de master que han pasado por el grupo porque he aprendido casi tanto yo de ustedes como ustedes de mí. En especial gracias a ti Bea porque has sido una compañera de laboratorio perfecta y una compañera de gimnasio excelente. Gracias por todo lo que vivimos los meses que estuviste aquí y por todo lo demás.

Gracias a ustedes Miguel y Diego que habéis vivido la montaña rusa emocional que ha sido para mí estos casi cuatro años en Barcelona. Habéis estado ahí en

los mejores momentos, pero sobre todo en los peores. Gracias a vosotros y a vuestra amistad puedo considerar a Hospitalet mi hogar.

Gracias a todos los residentes de enfermería de la unidad docente de Costa Ponent que me habéis recibido como a uno más de los vuestros, hasta el nivel de que me he llegado a sentir un enfermero más. Gracias en especial para ustedes Miriam y Lydia porque hemos formado un grupo de amigos muy bueno con Miguel, Tano y Raúl.

Gracias a todos mis amigos de Xesta, México, Ourense y Madrid y a todos los que habéis estado ahí para lo bueno y para lo malo durante estos casi cuatro años.

Finalmente, gracias a ti Cris por estar a mi lado y animarme para sacar la mejor versión de mí, te quiero teta.

Índice	i
Índice de tablas	v
Índice de figuras	vii
Abreviaturas	x
Resumen	xi

Capítulo 1. Introducción **1**

1.1. Biocatálisis	2
1.1.1. Procesos biocatalíticos con células	6
1.1.2. Procesos biocatalíticos con enzimas libres	7
1.1.3. Procesos biocatalíticos con enzimas inmovilizadas	8
1.1.4. Expresión de enzimas recombinantes	12
1.1.5. Procesos biocatalíticos multienzimáticos	13
1.2. D-fagomina	13
1.2.1. Síntesis de la D-fagomina	14
1.2.2. Síntesis quimio-enzimática de iminociclitoles	15
1.2.2.1. Aldolasas	16
1.2.3. Síntesis de aminoaldehídos	21
1.2.3.1. Cloroperoxidasa (CPO)	23
1.2.4. Modelo matemático de la reacción acoplada de síntesis de pre-D-fagomina	26

Capítulo 2. Objetivos **29**

Capítulo 3. Materiales y métodos **31**

3.1. Materiales	32
3.2. Ensayos de actividad de las enzimas	32
3.2.1. Ensayo de actividad de la FSA	32
3.2.2. Ensayo de actividad de la CPO	34
3.3. Producción de la FSA A129S	35
3.3.1. Parámetros operacionales de la fermentación	37
3.3.2. Métodos analíticos	38

3.3.2.1. Gel de electroforesis	39
3.4. Purificación de la FSA A129S	39
3.4.1. Preparación de las columnas del AKTA pure	40
3.4.2. Purificación por afinidad	41
3.4.3. Desalting de la FSA	41
3.5. Inmovilización de las enzimas	42
3.5.1. Nanoclústers magnéticos (mNC)	42
3.5.2. Glioxal-agarosa	43
3.5.3. MANA-agarosa	44
3.5.4. Soportes IDA-sefarosa	45
3.5.5. Eupergit CM	46
3.6. Oxidación del β-OH catalizado por la CPO	46
3.7. Adición aldólica catalizada por la FSA	48
3.8. Reacción acoplada de la FSA y la CPO	49
3.9. Cuantificación de la concentración de β-OH, β-CHO y pre-D-fagomina	50
<u>Capítulo 4. Producción y purificación de la FSA</u>	<u>51</u>
4.1. Introducción	52
4.2. Objetivos	56
4.3. Resultados y discusión	56
4.3.1. Producción de la FSA A129S	56
4.3.2. Purificación de la FSA A129S	60
4.3.2.1. Purificación por afinidad	60
4.3.2.1. Estudio de la resina	60
4.3.2.2. Selección de la concentración de imidazol para la elución	62
4.3.2.3. Purificación en el AKTA pure 150	63
4.3.2.4. Desalting utilizando el AKTA pure 150	64
4.4. Consideraciones globales	66
4.5. Conclusiones	67

Capítulo 5. Inmovilización de la CPO y la FSA	71
5.1. Introducción	72
5.1.1. Nanopartículas	72
5.1.2. Macropartículas	73
5.1.2.1. Soportes derivados de la agarosa	74
5.1.2.2. Eupergit CM	77
5.1.3. Inmovilización de la CPO y la FSA	79
5.1.3.1. Inmovilización de la FSA	79
5.1.3.2. Inmovilización de la CPO	80
5.1.3.3. Co-inmovilización de la CPO y la FSA	81
5.2. Objetivos	81
5.3. Resultados y discusión	81
5.3.1. Inmovilización de la FSA	81
5.3.1.1. Inmovilización en nanopartículas	81
5.3.1.2. Inmovilización en macropartículas	85
5.3.1.2.1. Inmovilización en Co-IDA-sefarosa	86
5.3.1.2.2. Inmovilización en MANA-agarosa	88
5.3.1.2.3. Inmovilización en Glioxal-agarosa	90
5.3.1.2.4. Inmovilización en Eupergit CM	92
5.3.1.3. Estudio de la reutilización del biocatalizador Inmovilizado	95
5.3.2. Inmovilización de la CPO	105
5.3.2.1. Inmovilización en glioxal-agarosa	105
5.3.2.2. Inmovilización en Eupergit CM	107
5.3.2.3. Inmovilización en MANA-agarosa	108
5.3.3. Co-inmovilización de la CPO y la FSA	109
5.3.3.1. Estudio del efecto del pH	110
5.4. Conclusiones	112
Capítulo 6. Aplicación del derivado co-inmovilizado en la síntesis de pre-D-fagomina	115
6.1. Introducción	116
6.2. Objetivos	121

6.3. Resultados y discusión	122
6.3.1. Síntesis de pre-D-fagomina en “batch”	122
6.3.2. Efecto de la naturaleza de peróxido en la síntesis de pre-D-fagomina	125
6.3.2.1. Reacción en “batch” con H ₂ O ₂ 40 mM	126
6.3.2.2. Restitución de una concentración 3 mM de <i>t</i> -BuOOH cada hora	126
6.3.2.3. Restitución de una concentración 3 mM de H ₂ O ₂ cada hora	127
6.3.3. Reacción acoplada en reactor de lecho fijo operado en discontinuo	128
6.3.3.1. Estudio de la capacidad del derivado co-inmovilizado para catalizar la adición aldólica	128
6.3.3.2. Síntesis de pre-D-fagomina en las condiciones del modelo	130
6.3.3.3. Estudio de la proporción de ambas enzimas en el derivado	132
6.3.3.4. Efecto de la adición de <i>t</i> -BuOOH al medio	135
6.4. Conclusiones	148
Capítulo 7. Bibliografía	151

Índice de tablas

Tabla 3.1. Composición del medio definido utilizado para crecer el inóculo en el Erlenmeyer de 1 L	35
Tabla 3.2. Composición de la solución stock de microelementos	36
Tabla 3.3. Composición del medio definido utilizado en el biorreactor	37
Tabla 3.4. Composición de la solución de alimento empleada en la fase Fed-batch	37
Tabla 4.1. Resultados de la producción de la FSA	59
Tabla 4.2. Estudio de la purificación de la FSA A129S	61
Tabla 4.3. Determinación de la carga máxima de FSA que admite el soporte	61
Tabla 4.4. Estudio del efecto de la concentración de imidazol en el proceso de elución	62
Tabla 4.5. Resultados de la purificación de la FSA A129S	64
Tabla 4.6. Desalting utilizando una columna XK 16/20 empaquetada con 127 mL de sephadex	66
Tabla 4.7. Balance final teórico de la producción y purificación de la FSA A129S	67
Tabla 4.8. Balance económico de la producción y purificación de la FSA	68
Tabla 5.1. Estudio de la inmovilización de la FSA en mNC funcionalizados Con diferentes grupos en su superficie	83
Tabla 5.2. Métodos de inmovilización que se estudiarán para realizar la Inmovilización de la FSA en distintos soportes de macropartículas	85
Tabla 5.3. Resumen de la inmovilización de la FSA en distintos soportes de macropartículas	94
Tabla 5.4. Condiciones para la reacción aldólica catalizada por los derivados inmovilizados de la FSA	96
Tabla 5.5. Rendimiento de reacción, conversión y velocidad inicial de la reacción de adición aldólica catalizada por FSA inmovilizada en mNC-NH ₂ , en Co-IDA-sefarosa, en glioxal-agarosa y en MANA-agarosa y enzima soluble con 1 U FSA mL ⁻¹ de reacción	96

Tabla 5.6. Productividad, rendimiento total de reacción y rendimiento de biocatalizador calculados para los ciclos de reacción catalizados por los derivados inmovilizados de la FSA en 1 mL de los soportes derivados de la agarosa y la reacción con la enzima soluble	102
Tabla 5.7. Resumen de la co-inmovilización de la FSA y la CPO en MANA-agarosa a diferentes pH	112
Tabla 6.1. Valores estimados de los parámetros de las ecuaciones 1 y 2	119
Tabla 6.2. Valores estimados de los parámetros de la ecuación 3	119
Tabla 6.3. Valores estimados de los parámetros de las ecuaciones 4,5 y 6	120
Tabla 6.4. Valores estimados de los parámetros de las ecuaciones 7 y 8	120
Tabla 6.5. Valores estimados de los parámetros de las ecuaciones 9 y 10	121
Tabla 6.6. Valores óptimos propuestos por el modelo para la síntesis de pre-D-fagomina catalizada por CPO/FSA en soluble	122
Tabla 6.7. Consumo de distintas concentraciones de <i>t</i> -BuOOH por 5000 U de CPO	124
Tabla 6.8. Resumen de las reacciones de síntesis de pre-D-fagomina en “batch”	126
Tabla 6.9. Resumen de las reacciones de síntesis de pre-D-fagomina en “batch” (Resultados)	127
Tabla 6.10. Condiciones de reacción aldólica catalizada por el derivado co-inmovilizado	129
Tabla 6.11. Valores óptimos propuestos por el modelo para la síntesis de pre-D-fagomina catalizada por CPO/FSA en soluble y condiciones de la reacción en el reactor de lecho fijo	130
Tabla 6.12. Resumen del estudio de la proporción de FSA y CPO en el derivado co-inmovilizado	135
Tabla 6.13. Diseño del estudio de la adición continua de <i>t</i> -BuOOH al medio	137

Índice de figuras

Figura 1.1. Métodos empleados en la inmovilización de enzimas	11
Figura 1.2. Estructura de la 1,2-dideoxinojirimicina (D-fagomina)	14
Figura 1.3. Mecanismo de acción de las aldolasas clase I	16
Figura 1.4. Mecanismo de acción de las aldolasas clase II	17
Figura 1.5. Esquema de las reacciones de las DHAP aldolasas	19
Figura 1.6. Esquema de la reacción de adición aldólica catalizada por la FSA	20
Figura 1.7. Mecanismo de oxidación de la CPO	24
Figura 1.8. Esquema de la oxidación del N-Cbz-3-aminopropanol catalizada por la CPO con la adición de peróxido (H ₂ O ₂ /t-BuOOH)	25
Figura 1.9. Sistema multienzimático propuesto para la síntesis de la D-fagomina	26
Figura 3.1. Esquema del ensayo de actividad de la FSA	33
Figura 3.2. Esquema del ensayo de actividad de la CPO	34
Figura 3.3. Reactor en “batch” compuesto por un vial de 30 mL	47
Figura 3.4. Reactor de lecho fijo	48
Figura 4.1. Curso de la fermentación en Fed-batch de la cepa de <i>E. coli</i> BL21(DE3) con el plásmido pET22-fsaA129S	57
Figura 4.2. Gel de proteína de la producción de la FSA A129S	60
Figura 4.3. Cromatograma de la purificación de la FSA por afinidad	63
Figura 4.4. Cromatograma del desalting de la FSA con 20 mL de muestra	65
Figura 4.5. Cromatograma del desalting de la FSA con 30 mL de muestra	66
Figura 5.1. Esquema de la inmovilización de enzimas en glioxal-agarosa	75
Figura 5.2. Esquema de la inmovilización de enzimas en MANA-agarosa	76
Figura 5.3. Esquema de la inmovilización de enzimas con colas de histidinas en Co-IDA-sefarosa	77
Figura 5.4. Esquema de la inmovilización de enzimas en Eupergit	78
Figura 5.5. Desorción de la FSA tras lavar los derivados inmovilizados con tampón después de 3 h de incubación con distintas concentraciones de EDAC	84
Figura 5.6. Curso de la inmovilización de la FSA en Co-IDA-sefarosa	87

Figura 5.7. Curso de la inmovilización de la FSA en MANA-agarosa	89
Figura 5.8. Curso de la inmovilización de la FSA en glioxal-agarosa	91
Figura 5.9. Curso de la inmovilización de la FSA en Eupergit CM	93
Figura 5.10. Reacción de adición de la DHA al β -CHO para la producción pre-D-fagomina catalizada por FSA soluble, FSA inmovilizada en mNC-NH ₂ , en Co-IDA-sefarosa, en MANA-agarosa y en glioxal-agarosa	98
Figura 5.11. Ciclos de adición aldólica de la DHA con la β -CHO produciendo pre-D-fagomina catalizados por la FSA inmovilizada en mNC-NH ₂ , en Co-IDA-sefarosa, en MANA-agarosa y en glioxal-agarosa	100
Figura 5.12. Ciclos de adición de la DHA al β -CHO produciendo pre-D-fagomina catalizados por la FSA inmovilizada en glioxal-agarosa a carga máxima.	104
Figura 5.13. Curso de la inmovilización de la CPO en glioxal-agarosa	106
Figura 5.14. Curso de la inmovilización de la CPO en Eupergit CM	107
Figura 5.15. Curso de la inmovilización de la CPO en MANA-agarosa	109
Figura 5.16. Curso de la co-inmovilización de la FSA y la CPO en MANA-agarosa	110
Figura 6.1. Reacciones del sistema multienzimático de síntesis de la pre-D-fagomina	118
Figura 6.2. Estudio de la reacción entre distintas concentraciones de <i>t</i> -BuOOH y 5000 U de CPO	125
Figura 6.3. Reactor de lecho fijo	128
Figura 6.4. Curso de la reacción acoplada utilizando el derivado co-inmovilizado con 98 U de FSA y 2400 U de CPO mL ⁻¹ de reacción	131
Figura 6.5. Curso de la reacción acoplada utilizando el derivado co-inmovilizado con 81,6 U de FSA y 3062,5 U de CPO mL ⁻¹ de reacción	133
Figura 6.6. Curso de la reacción acoplada utilizando el derivado co-inmovilizado con 65,3 U de FSA y 3675 U de CPO mL ⁻¹ de reacción	134
Figura 6.7. Esquema del reactor de lecho fijo acoplado a la microbureta Para la adición continua de <i>t</i> -BuOOH	136
Figura 6.8. Curso de la reacción acoplada utilizando el derivado co-inmovilizado con 65,3 U de FSA y 3675 U de CPO mL ⁻¹ de reacción con una adición de 27,2 mmoles de <i>t</i> -BuOOH cada hora mediante pulsos cada 17 min	138

Figura 6.9. Curso de la reacción acoplada utilizando el derivado co-inmovilizado con 65,3 U de FSA y 3675 U de CPO mL ⁻¹ de reacción con una adición de 27,2 mmoles de <i>t</i> -BuOOH cada hora mediante pulsos cada 3 min	140
Figura 6.10. Derivado co-inmovilizado antes de la reacción y después de la reacción (27,2 mmoles h ⁻¹)	142
Figura 6.11. Curso de la reacción acoplada utilizando el derivado co-inmovilizado con 65,3 U de FSA y 3675 U de CPO mL ⁻¹ de reacción con una adición de 13,6 mmoles de <i>t</i> -BuOOH cada hora mediante pulsos cada 3 min	143
Figura 6.12. Curso de la reacción acoplada utilizando el derivado co-inmovilizado con 65,3 U de FSA y 3675 U de CPO mL ⁻¹ de reacción con una adición de 45,3 mmoles de <i>t</i> -BuOOH cada hora mediante pulsos cada 3 min	144
Figura 6.13. Derivado co-inmovilizado antes de la reacción y después de la Reacción (45,3 mmoles h ⁻¹)	146
Figura 6.14. Curso de la reacción acoplada utilizando el derivado co-inmovilizado con 65,3 U de FSA y 3675 U de CPO mL ⁻¹ de reacción con una adición de 27,2 mmoles de <i>t</i> -BuOOH cada hora mediante pulsos cada 3 min sin añadir concentración inicial de <i>t</i> -BuOOH	147

Abreviaturas

β -OH: 3-[(benciloxicarbonil)amino]-3-aminopropanol

β -CHO: 3-[(benciloxicarbonil)amino]-3-aminopropionaldehído

β -COOH: ácido 3-[(benciloxicarbonil)amino]-3-aminopropanoico

BSA: albumina sérica bovina

Cbz: carboxibencil

Co-IDA-sefarosa: sefarosa funcionalizada con iminodiacético cargada con cobalto

CPO: cloroperoxidasa

DCD: diclorodimedona

DHA: dihidroxiacetona

DHAP: dihidroxiacetona fosfato

EDAC: *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N*'-etilcarbodiimida

F6P: D-fructosa-6-fosfato

FSA: fructosa-6-fosfato aldolasa

G3P: D-gliceraldehído-3-fosfato

GPD: glicerofosfato deshidrogenasa

H₂O₂: peróxido de hidrogeno

HA: hidroxiacetona

HEPES: ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico

HLADH: alcohol deshidrogenasa hepática de caballo

IDA: ácido iminodiacético

MANA-agarosa: monoaminoetil-*N*-aminoetil agarosa

MCD: monoclorodimedona

MeCN: acetonitrilo

MES: ácido 2-morfolinetanosulfónico

mNC: nanoclústers magnéticos

pre-D-fagomina: (3*S*,4*R*)-6-[(benciloxicarbonil)amino]-5,6-dideoxihex-2-ulosa

***t*-BuOOH:** terc-butilhidroperóxido

TFA: ácido trifluoroacético

TPI: triosafosfato isomerasa

Resumen

Los procesos biocatalíticos son una potente herramienta que se ha desarrollado como una alternativa a la química tradicional en el campo de la síntesis orgánica. Las enzimas son catalizadores naturales y mucho menos estables que los catalizadores metálicos empleados en la química más tradicional. Debido a ello al intensificar estos procesos biocatalíticos es necesario abordar el estudio de la inmovilización de las enzimas con la finalidad de aumentar su estabilidad y posibilitar su reutilización.

En esta tesis se abordó el estudio de un sistema multienzimático propuesto para la síntesis de la D-fagomina. Este sistema consistía en la oxidación del 3-[(benciloxicarbonil)amino]-3-aminopropanol catalizada por la cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago* para obtener 3-[(benciloxicarbonil)amino]-3-aminopropionaldehído y la posterior adición de la dihidroxiacetona a este aldehído catalizada por la fructosa-6-fosfato aldolasa para obtener (3*S*,4*R*)-6-[(benciloxicarbonil)amino]-5,6-dideoxihex-2-ulosa, la cual se cicla mediante una reducción con el catalizado H₂/Pd para obtener la D-fagomina.

La fructosa-6-fosfato aldolasa se produjo en el laboratorio fusionada a una cola de histidinas, la cual se utilizó para purificar e inmovilizar la enzima y la cloroperoxidasa se compró directamente a un laboratorio.

Se realizó el estudio de la inmovilización de ambas enzimas y se establecieron unas condiciones de compromiso para realizar la co-inmovilización de ambas en un mismo soporte. Este derivado co-inmovilizado fue aplicado en la síntesis de pre-D-fagomina y se estudiaron las condiciones de reacción hasta conseguir un rendimiento de producto dos veces mayor que al utilizar las enzimas solubles.

1. Introducción

1.1. Biocatálisis

La biotecnología es la ciencia que utiliza los sistemas biológicos para la obtención de un producto o la modificación de un proceso. A su vez, la biotecnología blanca es la rama de esta ciencia que estudia los procesos que utilizan las células y/o derivados celulares para la obtención de un producto de interés industrial (Heux et al. 2015). La biocatálisis engloba a todos los procesos en los cuales se utilizan biocatalizadores, ya sean células enteras o enzimas aisladas, para la conversión de sustratos (Sheldon and Woodley 2018).

El estudio de la biocatálisis comenzó hace más de 100 años y su desarrollo consta de las “tres etapas de la biocatálisis”. Durante la “primera etapa” se estudiaron los diferentes componentes celulares y se determinaron sus posibles aplicaciones en los procesos químicos. A partir de la década de los 80 comenzó la “segunda etapa” en la cual se comenzaron a utilizar diversas tecnologías con la finalidad de aumentar la estabilidad y la variedad de sustratos no naturales que podían aceptar estos biocatalizadores. Actualmente la biocatálisis se encuentra dentro de su “tercera etapa”, la cual está caracterizada por los procesos de evolución dirigida que permiten realizar diversas mutaciones en los biocatalizadores con la finalidad de aumentar su estabilidad y sus propiedades catalíticas, permitiendo así producir enzimas más adecuadas para cada proceso (Bornscheuer et al. 2012). Esta “tercera etapa” comenzó a finales de la década de los 90 con el trabajo sobre evolución dirigida de Frances Arnold el cual estableció las bases del diseño racional de enzimas mediante mutaciones puntuales (Arnold 1998).

Las ventajas de los procesos biocatalíticos se deben a las propiedades de las enzimas empleadas en estos procesos. Así, la mayor parte de estas reacciones se realizan en medio acuoso, a temperatura y presión atmosférica, ya que son las condiciones en las que las enzimas suelen tener máxima estabilidad y actividad enzimática. Este hecho permite prescindir de los solventes orgánicos y disminuye los costes energéticos del proceso al trabajar en condiciones mucho más suaves. Estos biocatalizadores son muy poco contaminantes ya que tanto las enzimas y como las células son fácilmente degradables a diferencia de los

catalizadores metálicos empleados en los procesos químicos clásicos, los cuales se suelen acumular en el medio ambiente debido a su elevada vida media, contaminando los ecosistemas.

Las enzimas suelen presentar elevada especificidad por sustrato y elevada estéreo-, regio- y enantioselectividad por el producto, lo cual permite minimizar la síntesis de productos secundarios sin interés y reducir las reacciones colaterales o secundarias, aumentando así la productividad de estos procesos. Estas propiedades hacen de la biocatálisis una importante herramienta para la industria farmacéutica ya que se estima que aproximadamente el 72% de las moléculas activas procedentes de la industria farmacéutica son compuestos quirales (Wells and Meyer 2014). La importancia de la selectividad de las enzimas en la industria farmacéutica se debe a que generalmente un único isómero tiene interés terapéutico mientras que el otro puede ser perjudicial para la salud de los pacientes, como es el caso de la talidomida. La talidomida es un medicamento que se comercializó en 1957 para tratar las náuseas del primer trimestre del embarazo, pero fue retirado del mercado en 1963 ya que ocasionó miles de casos de malformaciones congénitas. Finalmente se descubrió que el enantiomero “S” es el único teratogénico, mientras que el enantiomero “R” es un sedante que no ocasiona malformaciones en los neonatos (Smith 2009).

Las ventajas de la biocatálisis contribuyen a que estos procesos sean más sostenibles ya que reducen tanto el uso de disolventes orgánicos, como el consumo de energía y los costes del proceso derivados de la operación, el mantenimiento y la eliminación de residuos. La viabilidad de una síntesis química o un proceso no depende solo del rendimiento económico, sino que también hay que tener en cuenta el impacto medio ambiental, el cual generalmente es elevado en los procesos químicos industriales. Con la finalidad de diseñar procesos más sostenibles el término “Química Verde” (del inglés “Green Chemistry”, más comúnmente denominado en Europa como Química Sostenible) fue propuesto por Warner y Anastas en el año 1998 y supone una nueva filosofía de diseño de los procesos industriales de manera que éstos procesos produzcan el menor impacto medioambiental posible (Anastas and Warner 1998). Dentro de este contexto, el campo de la biotecnología y más

concretamente el de la biocatálisis pueden ofrecer una gran variedad de herramientas y alternativas que permitan que estos procedimientos industriales se realicen de acuerdo a los 12 principios de la Química Verde propuestos por ambos autores anteriormente mencionados.

1. Es mejor prevenir la producción de residuos que tratarlos después de que ya han sido formados. La elevada selectividad de las enzimas reduce la aparición de productos secundarios que puedan contaminar el producto de interés.
2. Las síntesis deben ser diseñadas para que el aprovechamiento de sustratos sea máximo en el producto final (Eficiencia atómica) (Anastas and Eghbali 2010).
3. Las rutas sintéticas deben ser diseñadas para que se utilicen o produzcan sustancias de baja toxicidad para el ser humano y el medio ambiente.
4. Los productos químicos deben ser diseñados para que sean eficaces y posean la menor toxicidad posible.
5. Utilizar disolventes y cosolventes inocuos y reducir el uso de disolventes orgánicos con la finalidad de disminuir el impacto que tienen estos en el medio ambiente.
6. Los procesos sintéticos deben ser diseñados para trabajar en condiciones de temperatura y presión similares a las ambientales para reducir así el impacto económico y ambiental del proceso.
7. Materias primas utilizadas deben ser preferentemente renovables.
8. Las rutas de síntesis deben ser cortas y deben producir la menor cantidad posible de productos intermedios, por lo que se deben evitar las reacciones de protección y desprotección siempre que sea posible.
9. Siempre que sea posible deben utilizarse catalizadores (enzimáticos o químicos) en los procesos de síntesis con la finalidad de mejorar la eficiencia del proceso.
10. Los productos obtenidos de estos procesos deben ser fácilmente degradables para evitar que se acumulen en el medio ambiente.
11. Se deben utilizar métodos analíticos durante el proceso para detectar y controlar la producción de elementos contaminantes.

12. Las especies químicas involucradas en el proceso deben minimizar la posibilidad de aparición de accidentes químicos tales como explosiones o combustiones.

(Anastas and Eghbali 2010)

Al analizar la viabilidad de un proceso tanto desde el punto de vista de la productividad como desde el punto de vista de la sostenibilidad medioambiental, los procesos biocatalíticos son procesos eficientes en los que se cumplen la mayor parte de los principios de la “Química verde”. Debido a ello y a los avances en el campo de la genética y en la ingeniería de proteínas, la aplicación de procesos biocatalíticos ha cobrado gran importancia en los campos de la industria química, sobre todo en la industria farmacéutica y en la química fina ya que las propiedades de regio-, entantio- y estereoselectividad de las enzimas simplifican la síntesis de productos de interés evitando la adición de sucesivos pasos de protección y desprotección de grupos funcionales de los sustratos durante la reacción (Pollard and Woodley 2007).

Para escalar un proceso biocatalítico que compite con un proceso químico a nivel industrial se debe estudiar las métricas de dicho proceso, así estas reacciones deben poder producir una concentración de producto similar a la alcanzada con los procesos químicos, generalmente de 50 a 100 g L⁻¹, lo cual favorece el downstream del proceso. En los procesos enzimáticos industriales se suele trabajar a escalas 15 gramos de producto por gramo de célula entera o de 1000 gramos de producto por gramo de enzima adicionada al reactor (Rozzell 1999). Debido a ello la inmovilización de las enzimas en un soporte insoluble para su posterior recuperación y reutilización debe considerarse al momento de escalar un proceso biocatalítico. Para determinar la viabilidad económica de estos procesos debe estudiarse el precio y la eficiencia del biocatalizador ya que estas características tienen un impacto directo en el precio final del producto de interés. La viabilidad de estos procesos también depende de otros parámetros del biocatalizador como son su estabilidad en condiciones de reacción y su especificidad con respecto al sustrato de la reacción (Rozzell 1999).

Las enzimas son catalizadores de origen biológico que han evolucionado para realizar su función metabólica dentro de la célula en la que se expresan. Debido a ello las enzimas suelen catalizar reacciones a bajas concentraciones de sustrato y en medio acuoso. Este hecho es una de las principales limitaciones del escalado de los procesos biocatalíticos ya que para purificar el producto de la reacción suele ser necesario realizar extracciones con solventes orgánicos o bien eliminar el agua del medio de reacción, aumentando así los costes del proceso (Woodley 2008). La ingeniería genética y la evolución dirigida son dos herramientas muy útiles para modificar los biocatalizadores aumentando su estabilidad, ampliando el espectro de sustratos que puede admitir y mejorando sus propiedades catalíticas, adecuándolas así a la reacción diana en la que se desean aplicar (Hibbert et al. 2005).

1.1.1. Procesos biocatalíticos con células

Las células enteras son biocatalizadores mucho más baratos que las enzimas ya que en su preparación se evitan los procesos de aislamiento y purificación, los cuales son las fases de mayor costo del proceso de obtención de una enzima pura. Además de ello la maquinaria metabólica de la célula permite la regeneración de los cofactores in situ, evitando así la adición continua de cofactores o el uso de reacciones enzimáticas acopladas destinadas a la regeneración de dichos cofactores.

La principal limitación de los procesos biocatalíticos empleando células enteras es el transporte de sustratos y productos a través de la membrana celular, esta membrana semipermeable suele limitar la difusión del sustrato desde el medio extracelular hasta el citoplasma, donde generalmente se encuentra la enzima de interés y a su vez esta membrana favorece la acumulación de producto en el citoplasma ya que evita su salida hacia el medio extracelular. Esta limitación compromete la productividad del proceso al compararlo con una biotransformación utilizando enzimas libres ya que la velocidad de estos procesos suele ser de 1 o 2 órdenes de magnitud mayor al de los procesos catalizados por células enteras (Chen 2007). Además de ello, los problemas de difusión del producto hacia el medio extracelular suelen asociarse a fenómenos

de inhibición por la acumulación de producto y la aparición de reacciones secundarias ya que tanto el sustrato como el producto están expuestos a toda la maquinaria metabólica celular. Por este motivo suele ser complicado evitar estas reacciones secundarias al trabajar con este tipo de biocatalizadores y a su vez estas mismas reacciones pueden producir especies que resulten tóxicas para la célula, comprometiendo así la productividad del proceso (Lin and Tao 2017).

1.1.2. Procesos biocatalíticos con enzimas libres

A partir de la década de 1960 las enzimas libres aparecen como alternativa a los biocatalizadores celulares debido a los avances en las técnicas de purificación y caracterización de proteínas. Al trabajar con las enzimas libres se eliminan los problemas de difusión a través de la membrana y de toxicidad para la célula tanto por el sustrato como por el producto. Al aislar la enzima de interés se aumenta la productividad volumétrica del proceso y se evitan reacciones secundarias catalizadas por otros enzimas del citoplasma celular (Goldberg et al. 2007). Finalmente, las reacciones catalizadas por enzimas libres son más fáciles de controlar ya que la velocidad de reacción depende de las unidades de actividad enzimática añadidas al medio de reacción. En biocatálisis se suele trabajar con lisados celulares ya que los procesos de purificación de proteínas suelen ser complejos y aumentan el precio del biocatalizador.

La actividad de una enzima depende de su estructura terciaria y cuaternaria, por ello las enzimas solubles son biocatalizadores sensibles a las condiciones del medio de reacción. Estos biocatalizadores son relativamente inestables en las condiciones operacionales ya que los pHs extremos o la presencia de cosolventes pueden comprometer a su estructura tridimensional (Pollard and Woodley 2007). La estabilidad de las enzimas puede modificarse alterando su secuencia aminoacídica mediante procesos de ingeniería genética, modificando químicamente su estructura proteica y mediante su inmovilización en un soporte adecuado.

1.1.3. Procesos biocatalíticos con enzimas inmovilizadas

La inmovilización consiste en la unión de las enzimas solubles a una matriz sólida e insoluble que permita su recuperación física del medio de reacción y posibilite la reutilización del biocatalizador en sucesivos ciclos de reacción. La inmovilización de una enzima puede modificar su estabilidad en condiciones de reacción y su actividad (Mateo et al. 2007). La aplicación de enzimas inmovilizadas en procesos industriales facilita el downstream del proceso, abarata el coste derivado de la preparación de nuevo biocatalizador en cada reacción y permite disminuir el riesgo de contaminación del producto con el biocatalizador, importante en el campo de la industria farmacéutica y/o alimentaria (Sheldon and van Pelt 2013). Este tipo de interacción puede estabilizar el biocatalizador protegiéndolo frente a los procesos de agregación, proteólisis y desnaturalización en interfases hidrofóbicas.

Los métodos de inmovilización pueden clasificarse según el tipo de interacción que se forma entre las enzimas y el soporte como métodos físicos y métodos químicos. (Figura 1.1.) Los métodos físicos son aquellos en los que la enzima queda retenida físicamente dentro de una matriz y según el tipo de retención física pueden clasificarse como procesos de encapsulamiento o de atrapamiento. La inmovilización de enzimas por encapsulación es aquella en la que la matriz rodea y encapsula a las moléculas de enzima soluble y la inmovilización por atrapamiento es aquella en la que las moléculas de enzima quedan retenidas dentro de la estructura tridimensional de la matriz del soporte (Bezerra et al. 2015).

Los métodos químicos son aquellos en los que existe algún tipo de enlace químico que mantiene unidos el enzima y el soporte. Dentro de estos métodos se encuentran los fenómenos de adsorción, la formación de enlaces covalentes y las interacciones mediante afinidad (Sheldon and van Pelt 2013). La inmovilización por adsorción se caracteriza porque la unión entre la enzima y la superficie del soporte esta mediada por enlaces débiles y reversibles (puentes de hidrogeno, fuerzas de van der Waals, interacciones iónicas, hidrofóbicas e hidrofílicas). Sin embargo la enzima puede desorberse fácilmente del soporte en

condiciones de reacción ya que el enlace que se forma es no covalente (Spahn and Minter 2008). La inmovilización por afinidad es un subtipo de enlace por adsorción en la cual existe una biocompatibilidad entre un ligando en la superficie de la enzima y del soporte, generando entre ellos una unión específica. Existen distintos tipos de interacción por afinidad siendo los más habituales la afinidad antígeno-anticuerpo y cola de histidina-metal quelado. La cola de histidina es una secuencia de varias histidinas que se añade a proteínas recombinantes con la finalidad de facilitar sus procesos de purificación e inmovilización ya que las resinas funcionalizadas con metal quelado presentan elevada afinidad por este ligando. La inmovilización por colas de histidina tiene como principal ventaja frente a la inmovilización por adsorción que la unión entre la enzima y el soporte es muy específica, por lo que solo se unen estas proteínas a la resina de metal quelado, permitiendo así purificar el biocatalizador (Ardao et al. 2006).

Por su parte la inmovilización mediante formación de enlaces covalentes se produce tras una reacción química entre los grupos funcionales de la superficie de la enzima y los grupos químicos de la superficie del soporte, generando así una unión más fuerte que impide la desorción de la enzima durante la reacción. La enzima inmovilizada presenta una estructura más rígida que la de la enzima soluble, lo que puede impedir la desnaturalización de la proteína. Este tipo de inmovilización genera una unión más estable que en la inmovilización por afinidad, sin embargo la enzima puede perder parte de su actividad durante el proceso de inmovilización (Novick and Rozzell 2005).

Existen gran variedad de soportes destinados a la inmovilización de enzimas, dichos soportes pueden ser de distinta naturaleza química y presentar diferentes propiedades físicas. Para seleccionar un soporte adecuado para inmovilizar una enzima hay que estudiar los aminoácidos que se encuentran en la superficie de la enzima, los posibles métodos de inmovilización, la posibilidad de utilizar una molécula espaciadora entre enzima y soporte y las propiedades físicas tanto del enzima como del soporte (Sirisha, Jain, and Jain 2016). Sin embargo, no existen reglas fijas para inmovilizar enzimas y hay que probar distintos métodos para inmovilizar una enzima.

Los distintos tipos de soportes pueden ser clasificados según diversos criterios. Siguiendo el tamaño de partícula los soportes pueden ser macropartículas, generalmente de un material polimérico mesoporoso sobre el cual se inmovilizan las enzimas, o nanopartículas, las cuales debido a su tamaño presentan movimiento Browniano, lo cual permite que las enzimas inmovilizadas en este tipo de soporte tengan un comportamiento similar a las enzimas solubles. A su vez en función de la naturaleza del soporte existen soportes orgánicos e inorgánicos. Dentro de los soportes orgánicos encontramos los polímeros naturales (la agarosa, la quitina, el alginato o los carragenanos) (Bezerra et al. 2015) o los polímeros sintéticos como son los soportes de la familia Eupergit (Boller, Meier, and Menzler 2002). Los soportes inorgánicos generalmente son óxidos o minerales con distintas propiedades (sílica, zirconio, titanio, óxido de hierro) (Sigyn et al. 2018). Dentro de los soportes inorgánicos son de particular interés las nanopartículas magnéticas ya que permiten recuperar el nanobiocatalizador utilizando un campo magnético. Esta propiedad representa una ventaja frente al resto de nanopartículas, ya que requieren de largos procesos de centrifugación para recuperar el derivado inmovilizado debido a que forman suspensiones de estabilidad muy elevada (Ahmad and Sardar 2015).

Un tipo especial de inmovilización en la cual no se requiere un soporte sólido es el entrecruzamiento de enzimas (CLE). Para preparar estos CLE se utilizan reactivos bifuncionales que realizan el entrecruzamiento de las moléculas de enzima agregadas (CLEA) (Velasco-Lozano et al. 2016) o cristalizadas (CLEC) (Roy and Abraham 2004). Estos CLE son biocatalizadores más baratos ya que no requieren del empleo de soportes en su preparación, lo que aumenta la concentración volumétrica del biocatalizador. Sin embargo la principal desventaja de estos derivados es que poseen baja estabilidad mecánica (Cui and Jia 2015; Margolin and Navia 2001).

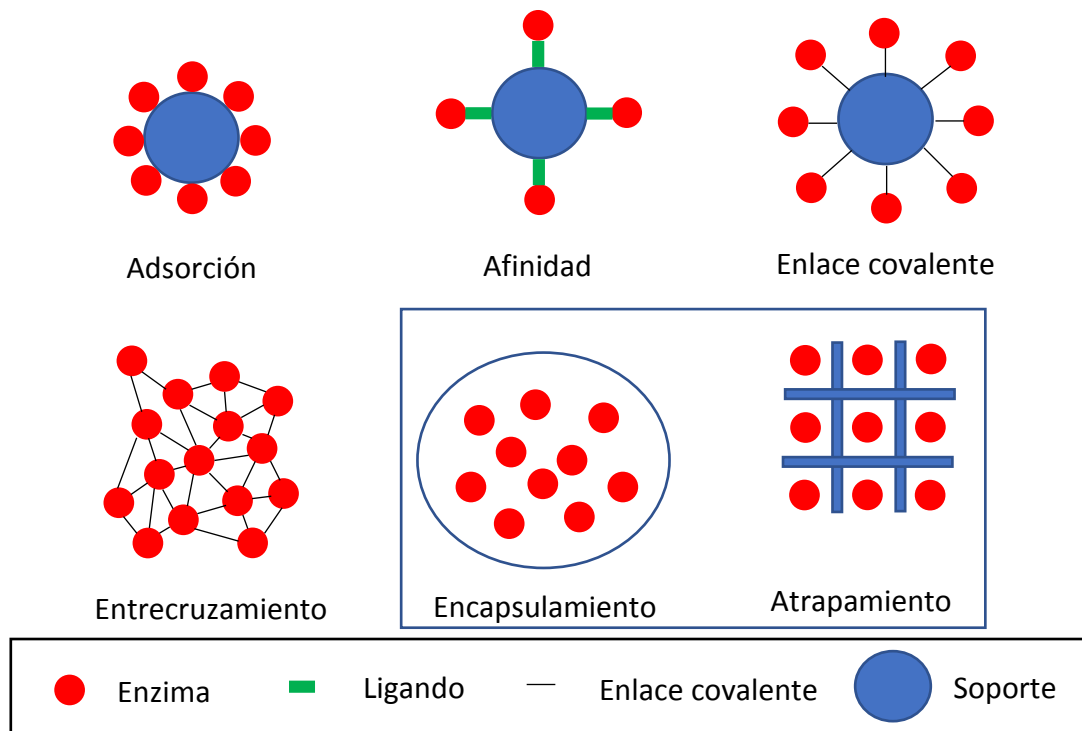


Figura 1.1. Métodos empleados en la inmovilización de enzimas.

Existen distintos métodos de inmovilización y diferentes tipos de soporte por lo que debe seleccionarse un protocolo de inmovilización adecuado para cada enzima específica. Para determinar la idoneidad el protocolo de inmovilización se deben determinar el rendimiento de inmovilización, la actividad retenida y la eficiencia de la inmovilización (Sheldon and van Pelt 2013). El rendimiento de inmovilización se define como el porcentaje de unidades de enzima inmovilizadas con respecto a las ofrecidas al soporte. Para determinar la actividad inmovilizada se debe realizar la diferencia entre la actividad ofrecida al soporte y la actividad que queda en el sobrenadante al final de la inmovilización.

$$\text{Rendimiento de inmovilización (\%)} = \frac{\text{Actividad inmovilizada}}{\text{Actividad ofrecida}} \times 100$$

La actividad retenida expresa el porcentaje de las unidades medidas en el derivado con respecto a la actividad ofrecida al soporte. La actividad del derivado puede determinarse de dos formas, la primera es realizando la diferencia entre la actividad medida en la suspensión y la actividad medida en el sobrenadante al final de la inmovilización y la segunda es lavando el derivado para eliminar

toda la enzima que no se ha inmovilizado y determinar la actividad de dicho derivado tras el lavado.

$$\text{Actividad retenida (\%)} = \frac{\text{Actividad del derivado}}{\text{Actividad ofrecida}} \times 100$$

Finalmente, la eficiencia de inmovilización expresa el porcentaje de las unidades de actividad medidas en el derivado con respecto a las unidades inmovilizadas. Por lo tanto, la eficiencia expresa la desactivación de la enzima durante la inmovilización.

$$\text{Eficiencia de inmovilización (\%)} = \frac{\text{Actividad del derivado}}{\text{Actividad inmovilizada}} \times 100$$

1.1.4. Expresión de enzimas recombinantes

Para realizar estos procesos biocatalíticos se requiere de la producción de cantidades elevadas de enzima. La biología molecular permite clonar las enzimas recombinantes en sistemas de expresión adecuados con la finalidad de sobreexpresar dicho enzima. Las enzimas recombinantes pueden expresarse tanto en células procariota como en células eucariotas y la selección del sistema de expresión adecuado depende del tamaño y complejidad de dichas enzimas.

La expresión de proteínas recombinantes en bacterias no permite la producción de proteínas de peso molecular muy elevado o que requieran de sistemas de glicosilación. Sin embargo, las bacterias son sistemas de expresión sencillos, con elevada velocidad de crecimiento y que permiten alcanzar una sobreexpresión de la enzima de interés de hasta el 50% del contenido proteico total de la célula (Liu et al. 2013). Dentro de los sistemas de expresión bacterianos *E. coli* es el más estudiado y el más utilizado en la producción de proteínas recombinantes.

1.1.5. Procesos biocatalíticos multienzimáticos

Las rutas sintéticas en el campo de la química orgánica suelen estar compuestas por sucesivos pasos de reacción caracterizados cada uno de ellos por procesos de protección, desprotección y activación de grupos funcionales según la reacción diana en cada paso. Posteriormente debe realizarse la purificación del producto para utilizarlo en cada nuevo paso sintético. Las reacciones en cascada surgen como una herramienta en el campo de la biocatálisis en la cual se acoplan sucesivas reacciones enzimáticas para producir un producto de interés (Filice and Palomo 2014). Las reacciones en cascada reducen el tiempo y el precio global del proceso, facilitan la recuperación del producto al final de la reacción y además pueden utilizarse tanto para desplazar equilibrios de reacción hacia la aparición de productos de interés como para eliminar subproductos derivados de la reacción. Estas estrategias se basan en la especificidad que tienen las diferentes enzimas por sus sustratos.

En las reacciones en cascada suelen aparecer problemas de compatibilidad entre las diferentes enzimas del sistema o de inactivación mutua entre ellas. Para solucionar este problema diversas estrategias han sido diseñadas, como pueden ser separar la reacción en cascada en reactores separados, inmovilizar los biocatalizadores (Pešić et al. 2013), crear reactores multienzimáticos encapsulados (Van Dongen et al. 2009; Tanner et al. 2011) o co-inmovilizar las enzimas en un mismo soporte (Rocha-Martín et al. 2012; Schoffelen and Van Hest 2013).

1.2. D-fagomina

Los iminociclitoles son una familia de moléculas compuestas por pirrolidinas y piperidinas polihidroxiladas, las cuales actúan como inhibidores de glicosidasas y glicosiltransferasas debido a que estructuralmente son análogos de diferentes monosacáridos, pero presentan un átomo de nitrógeno en lugar de un átomo de oxígeno en su anillo (Sugiyama et al. 2007). (Figura 1.2.) Estas características hacen de los iminociclitoles un interesante componente para alimentos funcionales y una posible molécula activa para tratar trastornos derivados de la

ingesta elevada de carbohidratos de digestión rápida tales como la obesidad o la diabetes (Amézqueta and Torres 2016). Estos compuestos también tienen posibles aplicaciones en el tratamiento de diversos tipos de cáncer, infecciones virales y desordenes lisosomales (Sugiyama et al. 2007).

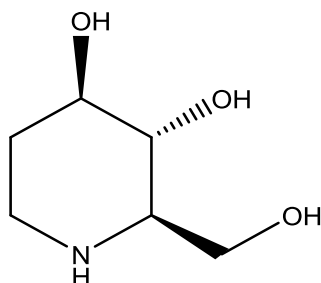


Figura 1.2. Estructura de la 1,2-dideoxinojirimicina (D-fagomina).

La D-fagomina (1,2-dideoxinojirimicina) es un compuesto de la familia de los iminociclitoles ampliamente estudiado tanto por sus posibles aplicaciones como agente antibacteriano y como agente protector frente a la ingesta elevada de carbohidratos de digestión rápida (Gómez et al. 2012). La D-fagomina se encuentra en las hojas del moral (*Morus alba*) y en las raíces de cauqui (*Lycium chinese*) pero fue aislada por primera vez en 1974 de las semillas del alforfón o trigo sarraceno (*Fagopyrum sculentum*) (Koyama, Koyama, and Sakamura 1974).

1.2.1. Síntesis de la D-fagomina

Al estar presente en las semillas del alforfón, la D-fagomina es el único de los iminociclitoles que se encuentra presente en la dieta de ciertas poblaciones humanas, pero debido a sus posibles aplicaciones terapéuticas y alimentarias se han propuesto diversas rutas sintéticas para la obtención de dicho compuesto. A partir de la retrosíntesis de la D-fagomina y otros iminociclitoles se han diseñado diferentes rutas sintéticas de estos compuestos partiendo de sustratos de distinta naturaleza. Existen trabajos publicados sobre la síntesis química de la D-fagomina partiendo de la D-serina (Banba et al. 2001; Takahata et al. 2003), de aminoalcoholes (Kim et al. 2011), del disiloxano (Kundu and Ghosh 2011), de derivados de hidratos de carbono (Kallam et al. 2016; Kumari, Reddy, and

Vankar 2009; Min et al. 2013) y de hidrocarburos de distinta naturaleza (Bartali et al. 2009; Corkran et al. 2013; Soriano et al. 2016; Takahata et al. 2004). La síntesis química clásica de la D-fagomina empleando estas estrategias se caracteriza por la necesidad de realizar sucesivos pasos de protección y desprotección de grupos funcionales, por la utilización de catalizadores metálicos, por los bajos rendimientos de producto y por la elevada cantidad de impurezas y productos secundarios que se obtienen en los procesos.

Además de estos procesos químicos se han descrito varias rutas sintéticas en las que se aplica al menos un proceso biocatalítico para la síntesis de este compuesto. Un ejemplo de estos procesos es la aplicación de la lipasa Cal B en la síntesis de D-fagomina partiendo de la δ -valerolactama (Bartali et al. 2010). Esta enzima se emplea para realizar la resolución enantiomérica de una lactona intermedia mediante la esterificación selectiva del isómero "R" con la finalidad de obtener un producto enantioméricamente puro. Otros procesos biocatalíticos empleados para la síntesis de la D-fagomina y otros iminociclitoles emplean reacciones en cascada utilizando aldolasas como biocatalizador celular (Wei et al. 2015) o enzimas libres (Babich et al. 2011). Las aldolasas son un ejemplo de enzimas que se han utilizado en la síntesis de los iminociclitoles con la finalidad de obtener un producto enantioméricamente puro y con elevada eficiencia atómica (Clapés et al. 2010).

1.2.2. Síntesis quimio-enzimática de iminociclitoles

Los iminociclitoles, entre ellos la D-fagomina, pueden obtenerse mediante la aminación reductora de aminopoliololes empleando catalizadores H_2 , Pd/C. Los distintos iminociclitoles se producen a partir de aminopoliololes con diferentes configuraciones estereogénicas, los cuales se producen mediante la adición aldólica de la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) o la dihidroxiacetona (DHA) a distintos aminoaldehídos por parte de las cuatro aldolasas dependientes de DHAP y/o la FSA (Espelt et al. 2003). El grupo amino del sustrato debe ser protegido con un grupo Cbz con la finalidad de evitar la ciclación espontánea entre el grupo amino y el grupo aldehído del aminopoliol que se forma.

1.2.2.1. Aldolasas

Las aldolasas son una familia de enzimas del grupo de las liasas que catalizan la adición de un sustrato nucleófilo o donador, el cual generalmente es una cetona, a un aldehído electrófilo denominado aceptor. Durante esta reacción generan dos nuevos centros estereogénicos, por lo que pueden producirse cuatro diestereoisómeros diferentes. Esta capacidad de las aldolasas de catalizar la formación de un enlace C-C con elevada estereoselectividad las ha convertido en una herramienta de elevado interés en el campo de la química orgánica (Dean, Greenberg, and Wong 2007). Las diferentes aldolasas se dividen en dos grupos en función de su mecanismo de acción. Las aldolasas de clase I se caracterizan por poseer un residuo conservado de lisina en el centro activo de todas ellas. Estas enzimas forman una base de Schiff entre el grupo amino de la lisina de su centro activo y el sustrato donador. Esta base de Schiff se mantiene en equilibrio con su tautómero enamina, el cual realizará con elevada selectividad el ataque nucleofílico sobre la molécula del aldehído aceptor generando así el producto de la reacción. (Figura 1.3.) Finalmente el producto se libera del centro activo de la enzima al hidrolizarse la imina formada con el residuo de lisina (Willson 1995).

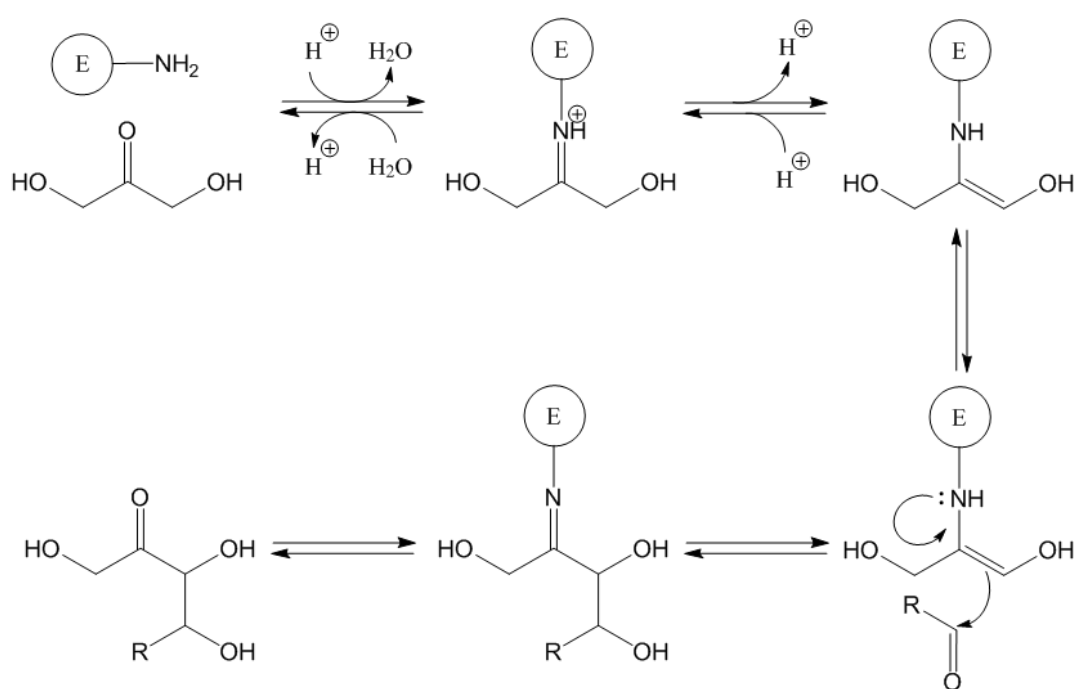


Figura 1.3. Mecanismo de acción de las aldolasas clase I. (Willson 1995)

Las aldolasas clase II poseen un mecanismo de acción mediado por un catión metálico (generalmente Zn^{2+} , Co^{2+} o Fe^{2+}) que se une al centro activo de la enzima a través de residuos de histidina. Este metal quelado actúa como un ácido de Lewis activando el compuesto donador para que pueda realizar el ataque nucleofílico sobre el aldehído (Dean et al. 2007). (Figura 1.4.)

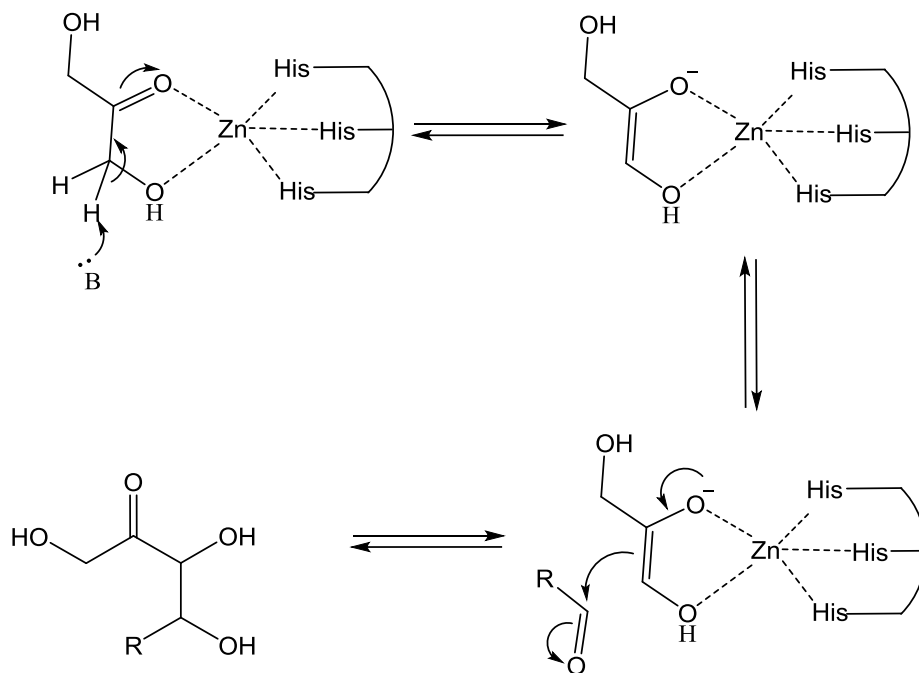


Figura 1.4. Mecanismo de acción de las aldolasas clase II. (Dean et al. 2007)

Las aldolasas son enzimas muy específicas en cuanto al sustrato nucleófilo o donador que reconocen. Siguiendo este criterio existen aldolasas dependientes de piruvato/2-oxo-butirato, dependientes de glicina/alanina, dependientes de acetaldehído y dependientes de dihidroxiacetona fosfato (DHAP).

Las aldolasas dependientes de piruvato por lo general poseen un mecanismo de acción de clase I y catalizan la adición reversible del piruvato a distintas variedades de aldehídos polihidroxiados dando como producto α -oxoácidos.

Por su parte las aldolasas dependientes de glicina poseen un mecanismo de acción diferente al de las demás aldolasas ya que son liasas dependientes de piridoxal-5'-fosfato (PLP). La 2-desoxi-D-ribosa-5-fosfato aldolasa o DERA es la

enzima que cataliza la adición reversible del acetaldehído al D-gliceraldehído-3-fosfato dando como producto la 2-desoxi-D-ribosa-5-fosfato.

Finalmente, las aldolasas dependientes de DHAP catalizan la adición del DHAP a una gran variedad de aldehídos aceptores generando 2 nuevos estereocentros. La estereoquímica del producto final puede controlarse seleccionando una de las cuatro enzimas dependientes de DHAP conocidas ya que cada una de ellas cataliza la producción de un estereoisómero diferente debido a su elevada estereoselectividad (Clapés et al. 2010).

Dentro de las aldolasas dependientes de DHAP la fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa (FruA, EC 4.1.2.13) de *E. coli* es una aldolasa en forma de dímero, forma habitual en las aldolasas de clase II, que acepta un rango de aldehídos aceptores similar a la aldolasa de músculo de conejo (RAMA), pero es más estable que esta. Por lo contrario, la FruA de *Staphylococcus carnosus* es una aldolasa de clase I en forma de monómero. Esta enzima realiza la adición aldólica dando como producto el estereoisómero con configuración 3*S*,4*R*. Las otras tres aldolasas dependientes de DHAP son la L-ramnulosa-1-fosfato aldolasa (RhuA, EC 4.1.2.19) que produce el estereoisómero 3*R*,4*S*; la L-fuculosa-1-fosfato aldolasa (FucA, EC 4.1.2.17) que produce el estereoisómero 3*R*,4*R* y la tagatosa-1,6-bisfosfato aldolasa (TagA, EC 4.1.2.2) que tiene preferencia por la configuración 3*S*,4*S* (Samland and Sprenger 2006). (Figura 1.5.)

Las aldolasas dependientes de DHAP presentan elevada especificidad por su sustrato donador, el DHAP. Este sustrato fosforilado es más caro y más inestable que la DHA sin fosforilar y al partir desde este sustrato suele ser necesario añadir un paso final de defosforilización del producto final de la reacción. Con la finalidad de sustituir el uso de la DHAP por la DHA se han realizado estudios ofreciendo la DHA como sustrato donador en las reacciones catalizadas por aldolasas dependientes de DHAP en distintas condiciones, descubriendo así que la TagA y la RhuA pueden aceptar la DHA en presencia de arseniato, ya que se forma un éster reversible que actúa como un éster mímico del DHAP en el sitio donde la enzima reconoce el grupo fosfato (Drueckhammer et al. 1989). Debido

a la elevada toxicidad del arseniato se han estudiado otros posibles compuestos que sean capaces de formar un éster mímico del fosfato que pueda ser reconocido por estas enzimas y así se observó la RhuA también acepta la DHA en presencia de borato (Sugiyama et al. 2006). Al realizar un cambio de la asparagina 29 del sitio de reconocimiento del fosfato de la RhuA por un ácido aspártico se ha observado que tanto esta variedad mutante como la enzima *wild type* son capaces de utilizar la DHA como sustrato donador sin necesidad de añadir borato al medio, aunque la velocidad inicial de reacción y el rendimiento aumentan en presencia borato (Garrabou et al. 2011).

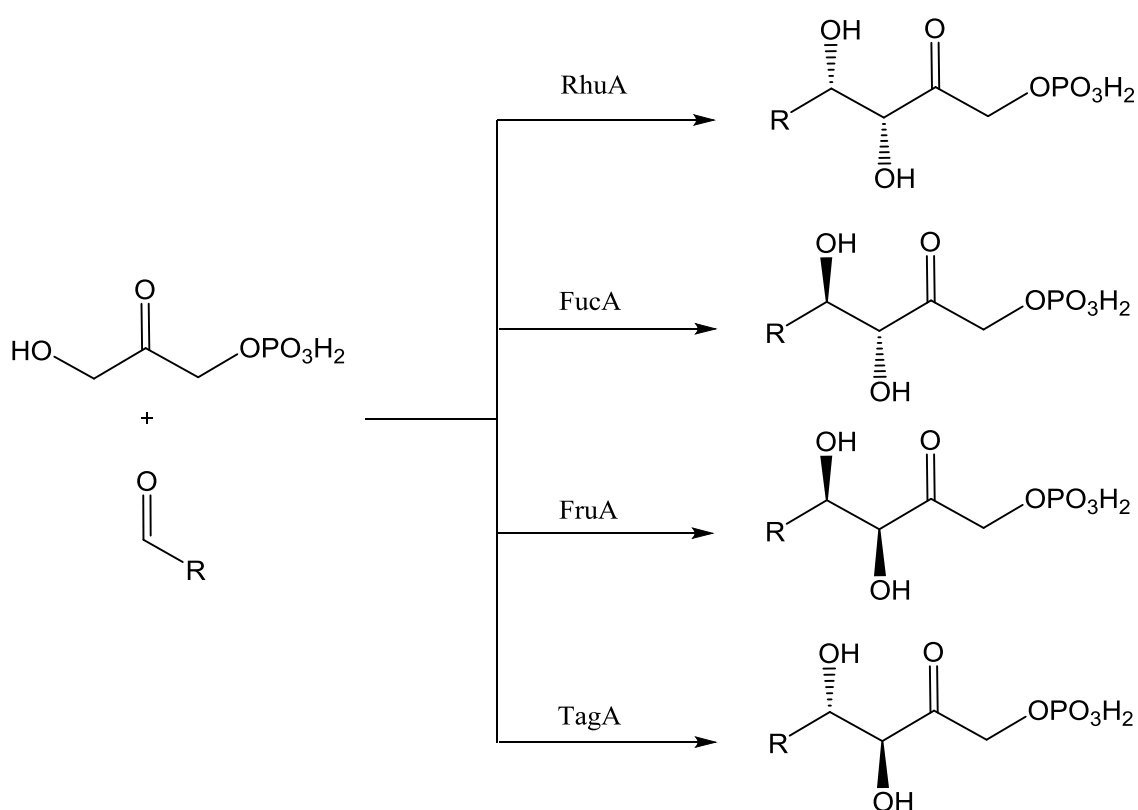


Figura 1.5. Esquema de las reacciones de las DHAP aldolasas. (Clapés et al. 2010)

En el año 2001 se descubrió una enzima dependiente de DHA que surgió como una nueva herramienta para sintetizar aminopolioles partiendo de la dihidroxiacetona sin fosforilar, esta enzima es la fructosa-6-fosfato aldolasa de *E. coli* (FSA, EC 4.1.2.-). Esta característica de aceptar a la DHA permite prescindir de los pasos finales de eliminación del fosfato del producto de la reacción (Schürmann and Sprenger 2001). Esta enzima es una aldolasa de clase

l y se presenta como un homodecámero compuesto por monómeros con una secuencia de 220 aminoácidos y con un peso molecular de 22,99 kDa por monómero (Thorell et al. 2002). La estructura y la secuencia aminoacídica de la FSA es más similar a la de las transaldolasas que a la de las aldolasas dependientes de DHAP (Sautner et al. 2015; Schneider et al. 2008). La FSA es una importante herramienta en el campo de la síntesis química para la formación de enlaces C-C, ya que esta enzima, a diferencia de las aldolasas dependientes de DHAP, puede aceptar distintos sustratos donadores como son la hidroxiacetona, la 1-hidroxi-2-butanona y el glicolaldehído (Concia et al. 2009; Garrabou et al. 2009; Schürmann, Schürmann, and Sprenger 2002). La estereoquímica de esta enzima es 3*S*,4*R* como se observa en la figura 1.6.; la misma que la de la FruA. Así, gracias a sus características únicas esta enzima ha sido empleada en la síntesis de diversos compuestos polihidroxiados entre los cuales se encuentran diversos hidratos de carbono, nitrociclitoles y los propios iminociclitoles (Camps Bres et al. 2013; Concia et al. 2009; Fessner, Heyl, and Rale 2012; Sánchez-Moreno et al. 2012).

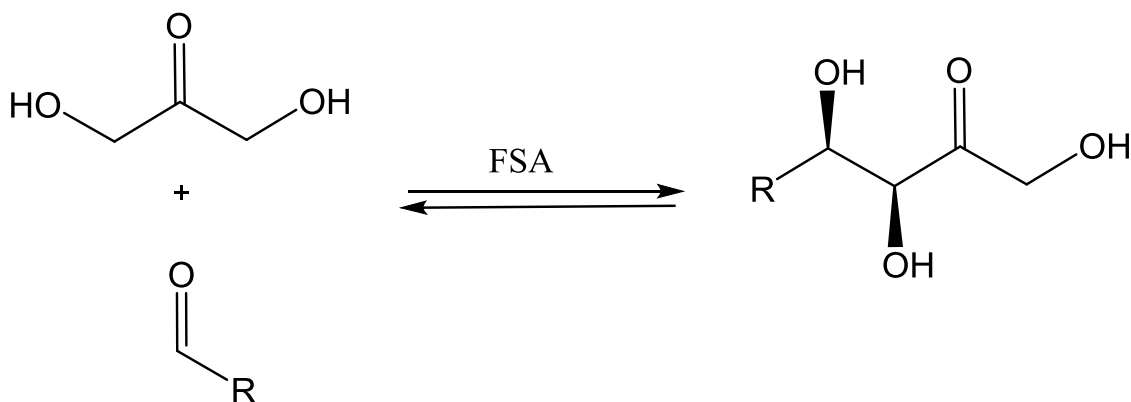


Figura 1.6. Esquema de la reacción de adición aldólica catalizada por la FSA.

Para catalizar reacciones de interés industrial la enzima no solo debe ser estereoselectiva, sino que además debe ser capaz de aceptar distintos sustratos no naturales y mantener su eficiencia catalítica. Con el objetivo de mejorar sus capacidades catalíticas y aumentar su promiscuidad de sustratos, la FSA ha sido modificada genéticamente, produciendo así diversas variedades mutantes con posibles aplicaciones industriales (Soler et al. 2015; Szekrenyi et al. 2014, 2015). Una variedad mutante de particular interés en la síntesis de compuestos

polihidroxilados es la FSA A129S, la cual resultó ser 17 veces más eficiente en la reacción que la FSA *wild type* al utilizar la DHA como sustrato donador de la adición aldólica, manteniendo la estereoselectividad 3*S*,4*R* (Castillo et al. 2010). A partir de esta mutante se desarrolló otra variante con dos mutaciones, la FSA A129S/A165G, la cual ha demostrado tener mejores propiedades catalíticas que la FSA *wild type* al trabajar con aminoaldehídos protegidos con grupos carboxibencil (Cbz) como sustratos aceptores (Gutierrez et al. 2011).

La D-fagomina se forma mediante la ciclación y reducción del (3*S*,4*R*)-6-[(benciloxicarbonil)amino]-5,6-dideoxihex-2-ulosa (pre-D-fagomina), la cual se forma a partir de la adición de la DHA al 3-[(benciloxicarbonil)amino] propionaldehído (β -CHO) catalizada por la FSA (Castillo et al. 2006). Esta reacción ha sido descrita en la literatura y se ha propuesto un modelo matemático de la misma empleando como biocatalizador la FSA A129S y la variedad con doble mutación, FSA A129S/A165G (Sudar et al. 2013b). Se estudió la síntesis de la pre-D-fagomina en reactor en “batch” y en un reactor de membrana de ultrafiltración, en el cual se trabajó en continuo. Ambas enzimas demostraron tener buena estabilidad en el reactor en “batch”, pero baja en el reactor de membrana. Al comparar la reacción de ambas enzimas en el reactor en “batch” en tampón TEA HCl 50 mM a pH 7,5, 25°C, 1000 rpm y 10% etil acetato se observó que la enzima doble mutante era más estable al tener una constante de desactivación (K_d) de 0,012 h⁻¹ frente a la K_d de 0,079 h⁻¹ de la FSA A129S. Sin embargo, se requirió de aproximadamente el doble de FSA A129S/A165G (4 mg mL⁻¹) para alcanzar conversiones similares a 2,3 mg mL⁻¹ FSA A129S en las mismas condiciones de reacción. ($C_{\beta\text{-CHO}} = 75$ mM, $C_{\text{DHA}} = 100$ mM, en un volumen de reactor de 1 mL) En esta tesis se seleccionó a la FSA A129S como el biocatalizador utilizado para la reacción de adición de la DHA al β -CHO.

1.2.3. Síntesis de aminoaldehídos

Por su parte los aldehídos son compuestos muy reactivos ya que son electrófilos fuertes, por lo que pueden reaccionar con compuestos del medio de reacción, pueden polimerizar y/o oxidarse para dar ácidos carboxílicos, los cuales no pueden actuar como aceptores en la adición aldólica. Debido a su elevada

reactividad, la presencia de elevadas concentraciones de aldehído pueden comprometer el rendimiento de la síntesis de pre-D-fagomiona, no solo por las posibles reacciones secundarias derivadas de él, sino que además este aldehído puede reaccionar con el grupo amino de la lisina del centro activo de la FSA, inhibiendo la enzima (Mifsud et al. 2012). Con objeto de evitar la presencia de una elevada concentración de aldehído una alternativa es acoplar la adición aldólica a la oxidación enzimática del *N*-Cbz-3-aminopropanol (β -OH) con la finalidad de producir in situ el β -CHO y así evitar su presencia en elevadas concentraciones en el medio de reacción.

La síntesis química del β -CHO se realiza incubando el 3-aminopropanol con *N*-(benciloxicarboniloxi)succinimida con la finalidad de realizar la protección del grupo amino y posteriormente se realiza la oxidación del alcohol mediante la oxidación de Swern o utilizando el ácido 2-iodoxibenzoico (IBX), obteniendo en ambos casos un rendimiento de aldehído mayor al 90% (Espelt et al. 2003). La oxidación enzimática de alcoholes para la obtención de aldehídos ha sido estudiada en varios trabajos publicados. Uno de ellos comparó la oxidación del alcohol furfúrico utilizando tres diferentes sistemas enzimáticos, el sistema lacasa/O₂/2,2,6,6-tetrametil piperidina-*N*-oxil (TEMPO), la alcohol oxidasa y la cloroperoxidasa (Mifsud et al. 2012). Este trabajo determinó que el mayor rendimiento se alcanzaba con el sistema lacasa/TEMPO y con la alcohol oxidasa, por lo que se acoplaron estos dos sistemas a la adición de la hidroxiacetona al furfuraldehído catalizado por la FSA A129S. También se acopló la oxidación del *N*-Cbz-2-aminoetanol catalizada por el sistema lacasa/TEMPO a la adición de la hidroxiacetona al *N*-Cbz-glicinal formado in situ catalizada por la FSA para obtener el aducto aldólico que es precursor del 1,4,5-trideoxi-1,4-imino-D-arabinitol. En este caso la FSA A129S/A165G fue seleccionado como el biocatalizador adecuado para esta reacción.

En la literatura ha sido descrito un sistema multienzimático diseñado para realizar la síntesis de pre-D-fagomina partiendo de β -OH. Este sistema está compuesto por tres enzimas, la alcohol deshidrogenasa de hígado de caballo que cataliza la oxidación del β -OH a β -CHO, la FSA A129S que cataliza la adición aldólica de la DHA al β -CHO para obtener el producto de interés y la

NADH oxidasa (NOX) que realiza la regeneración del cofactor de la ADH (Sudar et al. 2015). Este sistema consiguió un rendimiento máximo de pre-D-fagomina del 79%, detectando que un 10% del β -CHO fue nuevamente oxidado por la alcohol deshidrogenasa.

1.2.3.1. Cloroperoxidasa (CPO)

La CPO es una hemoproteína de la familia de las peroxidasas que fue aislada por primera vez en el hongo filamentoso *Caldariomyces fumago* en 1961 (Shaw and Hager 1961). Esta glicoproteína es un monómero con un peso molecular de 42 kDa y con un contenido de carbohidratos del 30%. La composición de los hidratos de carbono varía según la fuente de carbono utilizada en el crecimiento del hongo filamentoso (Pickard and Hashimoto 1988). Esta enzima posee 299 aminoácidos en su estructura y posee una elevada proporción de ácido aspártico y glutámico en su secuencia, por lo que su punto isoeléctrico es bajo, en torno a 4,0. La actividad de la CPO varía en función del pH en el que se encuentre la enzima, así en valores de pH menores a 4,0 la CPO cataliza la reacción de adición de aniones halógenos (Cl^- , Br^- e I^-) a hidrocarburos insaturados, mientras que al trabajar en valores de pH entre 4,0 y 7,0 la enzima cataliza la oxidación de los sustratos en presencia de peróxidos. Además, la CPO también puede actuar como una catalasa descomponiendo el peróxido de hidrogeno en agua y O_2 (Thomas and Morris 1970). El mecanismo de oxidación de la CPO es un mecanismo radicalario mediado por el hierro del grupo hemo de la enzima tal y como se observa en la figura 1.7. Así el peróxido llega al centro activo y activa la enzima cediendo dos electrones al átomo de hierro y liberándose una molécula de agua al medio. Una vez activada la CPO el sustrato entra al centro activo de la enzima y el hierro cede primero uno de sus electrones formando radical libre y un protón para que seguidamente el hierro ceda un segundo electrón al sustrato y se libere un hidroxilo al medio junto con el producto de la oxidación (Colonna et al. 1999).

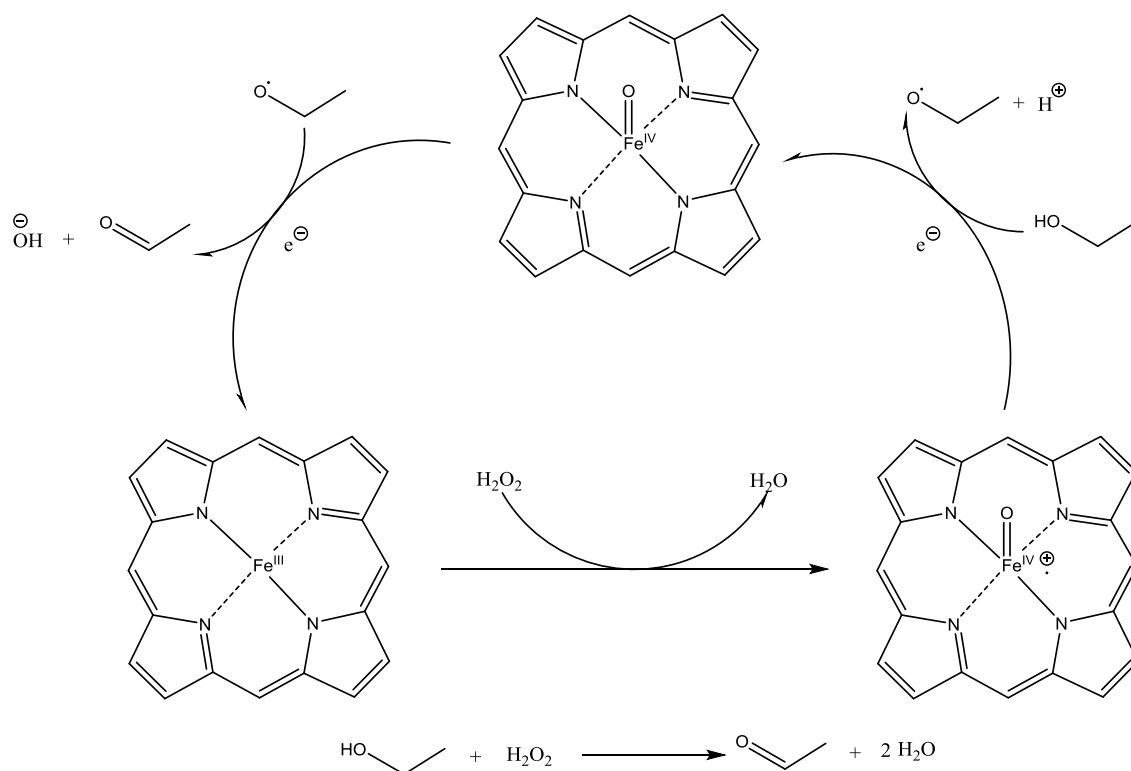


Figura 1.7. Mecanismo de oxidación de la CPO.

La CPO es una enzima muy versátil que ha sido utilizada en la oxidación y halogenación de diversas moléculas orgánicas. Entre estas moléculas destaca la aplicación de la CPO en la oxidación de aminoalcoholes para la obtención de aminoaldehídos que puedan ser utilizados como sustratos de la FSA. La oxidación de *N*-Cbz-etanolamina por parte de la CPO para obtener *N*-Cbz-glicinal alcanzó rendimientos de hasta el 45% tras probarse distintas condiciones de reacción, variando parámetros tales como adición de pulsos de CPO, implementación de sistemas bifásicos, el uso de cosolventes o la variación de temperatura (Pešić, López, and Álvaro 2012). Los principales problemas detectados para esta reacción fueron la baja estabilidad de la enzima durante la reacción y la oxidación del *N*-Cbz-glicinal a *N*-Cbz-glicina. Un estudio más amplio sobre la oxidación enzimática de aminoalcoholes catalizada por la CPO determinó que la enzima reconoce como sustratos las configuraciones de α - a ε -aminoalcoholes, pero la velocidad inicial de reacción es menor cuanto mayor es la distancia entre el grupo hidroxilo y el grupo amino de la molécula. Además de ello este trabajo determinó que al utilizar como sustratos a aminoalcoholes

que poseen grupos protectores Cbz y fluorenilmetiloxycarbonil (Fmoc) unidos a sus grupos amino tienen una velocidad inicial de oxidación menor y alcanzan menores rendimientos de reacción que cuando los aminoalcoholes se encuentran libres (Masdeu et al. 2016). Dentro de los aminoalcoholes estudiados en este trabajo se encuentra el *N*-Cbz-3-aminopropanol (β -OH) y se observó que se alcanzan mayores conversiones de aminoalcohol al utilizar como oxidante el *tert*-butilhidroperóxido (*t*-BuOOH) en vez del peróxido de hidrogeno, sin embargo, la enzima es menos estable en estas condiciones. Finalmente, este trabajo propuso un esquema de reacción para la oxidación del β -OH catalizada por la CPO, incluyendo las reacciones secundarias producidas entre el *N*-Cbz-3-aminopropanal (β -CHO) y los dos peróxidos estudiados, como se ve en la figura 1.8.

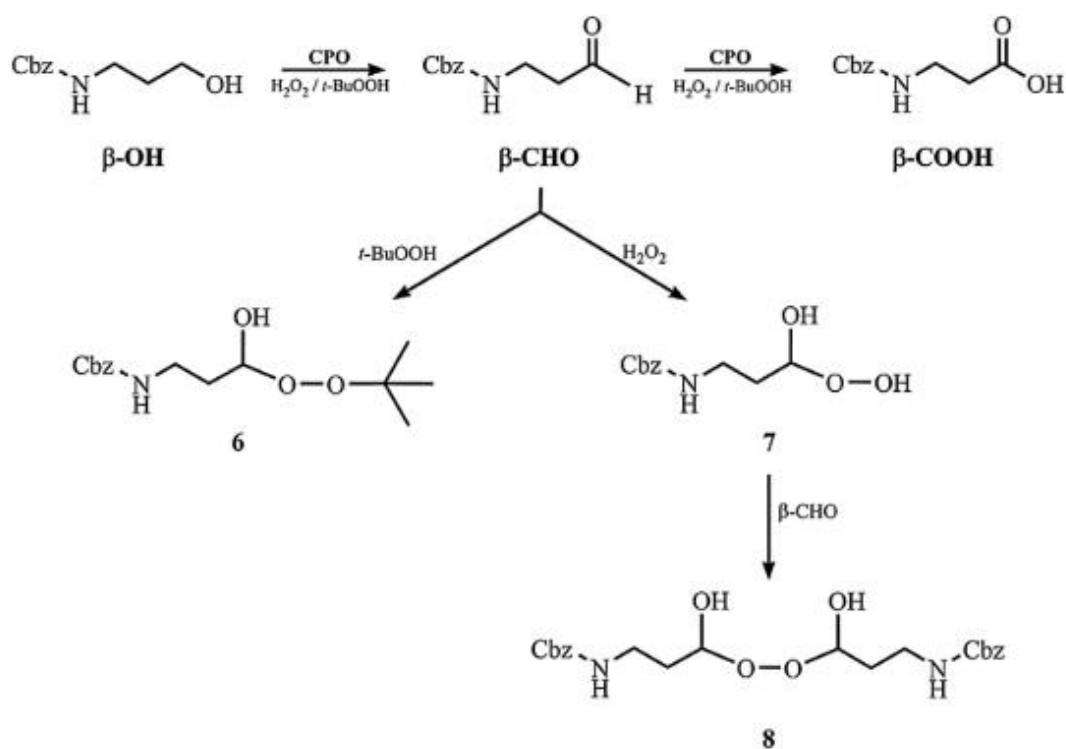


Figura 1.8. Esquema de la oxidación del *N*-Cbz-3-aminopropanol catalizada por la CPO con la adición de peróxido (H_2O_2 /*t*-BuOOH). Esta reproducido de la literatura (Masdeu et al. 2016).

1.2.4. Modelo matemático de la reacción acoplada de síntesis de pre-D-fagomina

En esta tesis se ha propuesto un sistema multienzimático análogo para la síntesis de pre-D-fagomina en el que se acopla la oxidación del β -OH por parte de la cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago* (CPO, EC 1.11.1.10) a la síntesis de pre-D-fagomina catalizada por la FSA A129S. Este sistema no requiere de enzimas auxiliares para regenerar cofactores ya que la CPO es una enzima que no requiere de ellos para realizar la reacción de oxidación del aminoalcohol. Así, al acoplar estas dos reacciones se produce el β -CHO in situ para su inmediata utilización en la síntesis de pre-D-fagomina, evitando así la acumulación de productos intermedios de la reacción. Este sistema acoplado presenta la ventaja de partir del β -OH que es un sustrato mucho más barato que el β -CHO y no requiere de la presencia de cofactores que aumenten el costo del proceso. (Figura 1.9.)

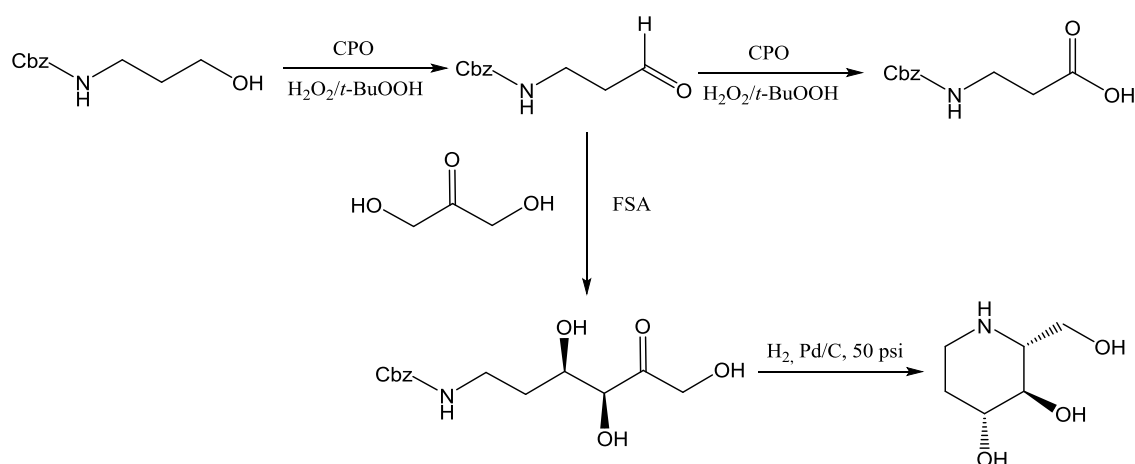


Figura 1.9. Sistema multienzimático propuesto para la síntesis de la D-fagomina.

La síntesis de pre-D-fagomina utilizando el sistema multienzimático propuesto por nuestro grupo ha sido estudiado y se ha elaborado un modelo cinético que predice con gran exactitud el curso de la reacción acoplada (Masdeu 2017). Para la elaboración de este modelo matemático se estudió primero la oxidación del β -OH catalizada por la CPO y la adición de la DHA al β -CHO catalizada por la FSA por separado, con la finalidad de seleccionar unas condiciones óptimas para cada una de las reacciones individuales. Una vez optimizadas ambas reacciones

se procedió a estudiar el acoplamiento de ambas enzimas con la finalidad de determinar todas las posibles interacciones que pudieran producir entre ambos sistemas.

Al estudiar la reacción acoplada de ambas enzimas se detectaron varios problemas en el sistema. El primer problema que se detectó fue que la CPO no solo oxidaba el β -OH a β -CHO, sino que también oxidaba el aldehído hasta dar el correspondiente ácido carboxílico, el cual se acumulaba en el medio como un producto secundario de la reacción. Además, se observó que la actividad de la FSA disminuía rápidamente al incubarla en presencia de la CPO y el *t*-BuOOH, por lo cual se postuló que la CPO y el oxidante reaccionaban produciendo una especie que desactivaba a la aldolasa. Debido a la desactivación de la FSA se detectó que el β -CHO se acumulaba en el medio de reacción.

Una vez estudiadas todas las variables del sistema acoplado se validó el modelo, comprobando así que predecía con gran exactitud los resultados experimentales de la síntesis de pre-D-fagomina. Finalmente, dicho modelo propuso unas condiciones óptimas de reacción, con las que se podía alcanzar un rendimiento máximo de pre-D-fagomina del 14,6%.

2. Objetivos

- 1. Producir y purificar la FSA A129S para realizar el estudio de su inmovilización.**
- 2. Realizar la inmovilización de la FSA en distintos soportes y seleccionar el derivado más adecuado para catalizar la adición de la dihidroxiacetona al *N*-Cbz-aminopropanal.**
- 3. Realizar la inmovilización de la CPO en distintos soportes.**
- 4. Co-inmovilización de la FSA y la CPO.**
- 5. Realizar la síntesis de la Cbz-pre-D-fagomina catalizada por los derivados co-inmovilizados de la FSA y la CPO.**

3. Materiales y métodos

3.1. Materiales

La CPO de *Caldariomyces fumago* fue comprada a Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) en forma de solución de enzima pura (>10000 U mL⁻¹) y con una actividad específica de 1400 U mg⁻¹ de enzima. La FSA A129S fue expresada en una cepa de *E. coli* BL21(DE3) que contenía el plásmido pET22-*fsaA129S* siguiendo los procedimientos previamente publicados (Calleja et al. 2015). Esta cepa fue proporcionada generosamente por el Dr. Clapés del grupo de investigación Biotransformación y moléculas bioactivas (IQAC-CSIC, Barcelona). La actividad específica de la enzima tras su purificación fue de 15,0 U mg⁻¹ FSA. *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (EDAC), α -Glicerofosfato deshidrogenasa–Triosafosfato isomerasa (GPD-TPI), fructosa-6-fosfato (F6P), Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), terc-butilhidroperóxido (*t*-BuOOH), 3-[(Bencil oxycarbonil)amino]propionaldehído (β -CHO) y 3-[(Benciloxycarbonil)amino]-3-aminopropanol (β -OH) fueron proporcionadas por Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). El Nicotin adenin dinucleótido (NADH) fue comprado a BONTAC Bio-engineering (Shenzhen, China). Los geles de agarosa entrecruzada 4 BCL, monoaminoetil-*N*-aminoetil agarosa (MANA-agarosa) y la sefarosa “high density metal free” fueron comprados a ABT-beads (Torrejón de Ardóz, España). La dihidroxiacetona (DHA) fue proporcionada por Merck (Darmstadt, Alemania). El sulfato de hierro (III), sulfato de hierro (II) heptahidratado (ACS, 99%), ácido cítrico (99%), tetraetoxisilano (TEOS, 99.9%), NH₄OH (28-30%) fueron comprados a Alfa Aesar (Lancashire, Reino Unido). Los distintos nanoclústers magnéticos (mNC) fueron sintetizados en colaboración con Dr. Stane Pajk. El resto de los reactivos se compraron a distintas casas comerciales.

3.2. Ensayos de actividad de las enzimas

3.2.1. Ensayo de actividad de la FSA

La determinación de la actividad enzimática de la FSA se realiza a través de un sistema compuesto por tres enzimas (Schürmann and Sprenger 2001). La FSA cataliza la lisis de la D-fructosa-6-fosfato (F6P) a D-gliceraldehído-3-fosfato

(G3P) y dihidroxiacetona (DHA). La triosafosfato isomerasa cataliza la transformación del G3P a dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y la α -glicerofosfato deshidrogenasa cataliza la reducción de la DHAP consumiendo NADH como describe la figura 3.1. Para determinar la actividad de la enzima soluble se añaden 50 μL de muestra a una cubeta de plástico de 1,5 mL que contiene 950 μL de una mezcla reactiva y para determinar la actividad de la enzima inmovilizada se añaden 100 μL de muestra de suspensión a una cubeta de cuarzo de 3 mL con agitación magnética que contiene 1900 μL de mezcla. Tras la adición de la muestra la mezcla final está compuesta por imidazol 50 mM, F6P 5 mM, NADH 0,1 mM y 10 U mL^{-1} de TPI/GDP en un volumen final de 1 mL para la enzima soluble y 2 mL para el derivado inmovilizado. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro UV/visible Cary 50 (Varian, Palo Alto, USA). La actividad enzimática se determinó a partir de la caída de la absorbancia a 340 nm debida a el consumo de NADH ($\epsilon_{340\text{nm}}=6,2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) por el sistema a 30 °C. Se define una unidad de actividad de FSA como la cantidad de enzima requerida para la conversión de 1 μmol de F6P por minuto a pH 8,0 y 30 °C.

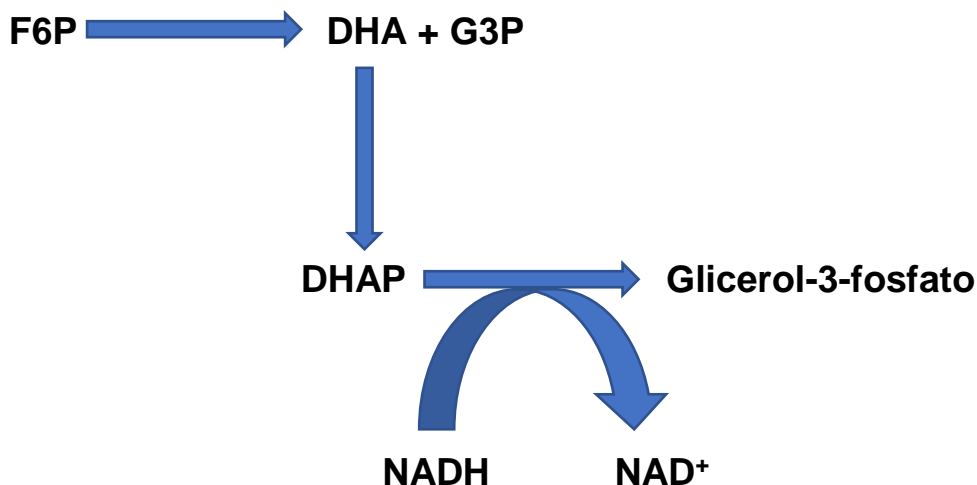


Figura 3.1. Esquema del ensayo de actividad de la FSA.

La actividad retenida de los derivados de la FSA inmovilizados en nanoclústers magnéticos se determinó utilizando un ensayo alternativo basado en el seguimiento de la adición aldólica mediante HPLC. Para realizar este ensayo se concentró el derivado inmovilizado retirando el sobrenadante con ayuda de un imán hasta alcanzar un volumen final de 50 μL . Sobre este derivado se añadió una mezcla compuesta por β -CHO 40 mM y DHA 100 mM en tampón ácido 4-

(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico (HEPES) 50 mM a pH 8,0 en un volumen final de 1 mL. La reacción se llevó a cabo a 30 °C y 1000 rpm durante 90 minutos y se detuvo acidificando el pH del medio. Para ello se mezclaron 100 μL de muestra con 150 μL de tampón fosfato de sodio 1 M a pH 2,5 durante 60 segundos y posteriormente se neutralizó la muestra añadiendo 150 μL de tampón fosfato de sodio 2 M a pH 7,0. La actividad retenida en este ensayo se calculó a partir de la comparación de la concentración de pre-D-fagomina producida utilizando el derivado inmovilizado y el stock de FSA soluble.

3.2.2. Ensayo de actividad de la CPO

La actividad enzimática de la CPO fue determinada midiendo la caída de la absorbancia a 278 nm y 25 °C, debida a que esta enzima cataliza la adición de un anión cloruro a la molécula de monoclorodimedona (MCD, $\epsilon_{278\text{nm}}=12,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), la cual es responsable del pico de absorción, tal y como describe la figura 3.2. (Morris and Hager 1966). Para realizar el ensayo se añaden 50 μL de muestra a una cubeta de plástico de 1,5 mL que contiene 950 μL de mezcla y para determinar la actividad de la enzima inmovilizada se añaden 100 μL de muestra de suspensión a una cubeta de cuarzo de 3 mL con agitación magnética que contiene 1900 μL de mezcla. La concentración final de la mezcla es de MCD 0,16 mM, KCl 20 mM y peróxido de hidrogeno 2 mM en tampón fosfato de potasio 100 mM a pH 2,75 en un volumen final de 1 mL para la enzima soluble y 2 mL para el derivado inmovilizado. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro UV/visible Cary 50 (Varian, Palo Alto, USA). Se define una unidad de actividad de CPO como la cantidad de enzima requerida para producir 1 μmol de diclorodimedona (DCD) por minuto a pH 2,75 y 25 °C.

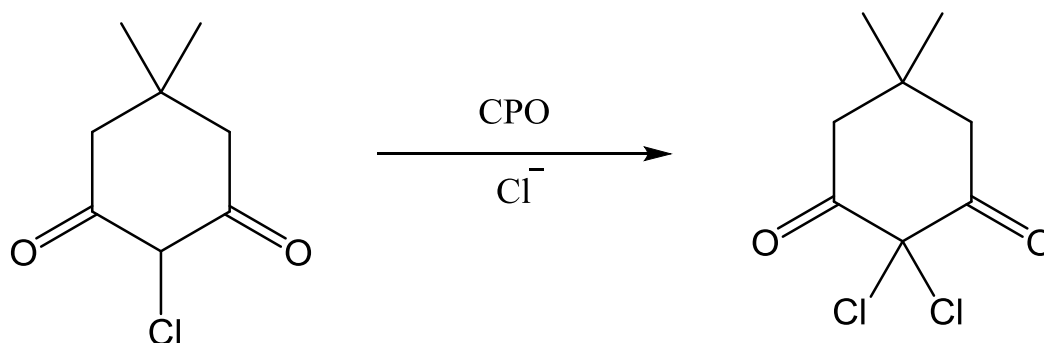


Figura 3.2. Esquema del ensayo de actividad de la CPO.

3.3. Producción de la FSA A129S

La estrategia empleada para la producción de la FSA A129S fue realizar un cultivo en discontinuo alimentado en medio definido, el cual permitiera inducir la producción de enzima en un cultivo de elevada densidad celular. Para realizar este cultivo se preparó un preinóculo en tubos de 50 mL que contenían 15 mL de medio LB (10 g peptona L⁻¹, 5 g extracto de levadura L⁻¹, 10 g NaCl L⁻¹), un medio rico en nutrientes al cual se le añadió ampicilina hasta alcanzar una concentración final de 100 mg L⁻¹. La presencia de este antibiótico en el medio permitió realizar la selección de los clones que mantenían el gen de la FSA en el cultivo, gracias a la presencia de un gen de resistencia a ampicilina en el vector. La cepa de *E. coli* BL21(DE3) con el plásmido pET22-fsaA129S se añadió al medio LB desde un stock de crioviales almacenado a -80 °C. Este cultivo se incubó durante 16 horas a 37 °C y 150 rpm. Para preparar el inóculo del biorreactor se añadieron 100 mL de medio definido (Tabla 3.1.) en un Erlenmeyer estéril de 1 L y sobre este medio se adicionó la cantidad necesaria de preinóculo para conseguir una DO_{600nm} inicial de 0,1. Este inóculo se mantuvo a 37 °C y 150 rpm durante 3-4 horas, hasta que se alcanzó una DO_{600nm} de 1,2 en el Erlenmeyer.

Tabla 3.1. Composición del medio definido utilizado para crecer el inóculo en el Erlenmeyer de 1 L. Para la elaboración de este medio se adicionaron 44 µL de una solución stock de microelementos, cuya composición se describe en la tabla 3.2.

Componente	Concentración (g/l)	
Glucosa	5	
Macros	K ₂ HPO ₄	2,973
	KH ₂ PO ₄	0,596
	NaCl	0,458
	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,75
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,025	
FeCl ₃	0,0025	
Ampicilina	0,0125	
Microelementos	-	
H ₂ O destilada	-	

Tabla 3.2. Composición de la solución stock de microelementos.

Componente	Concentración (g/l)
AlCl ₃ ·6H ₂ O	0,04
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1,74
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,16
CuSO ₄ ·H ₂ O	1,55
H ₃ BO ₃	0,01
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1,42
NiCl ₂ ·6H ₂ O	0,01
Na ₂ MoO ₄	0,02

La fermentación comenzó al añadir 80 mL de inóculo al reactor que contenía 720 mL de medio definido (Tabla 3.3.), iniciando así la fase de “batch” en la que el cultivo creció hasta agotar la glucosa del medio, momento en el cual se inició la fase “fed-batch”. Durante esta fase se adicionó una solución de alimento (Tabla 3.4.) a través de una microbureta (Crison, Barcelona, España) para que el cultivo mantuviese una tasa de crecimiento constante gracias a la adición controlada del sustrato limitante del proceso, la glucosa. La adición se realizó siguiendo la siguiente ecuación.

$$\Delta V = V - V_0 = \frac{X_0 V_0}{S_f Y_{X/Sap}} (\exp(\mu t) - 1)$$

En esta fórmula ΔV es el volumen de solución de alimento (mL) que se añade, X_0 es la concentración de la biomasa a tiempo 0 (gDCW mL⁻¹), V_0 es el volumen de líquido en el reactor a tiempo 0 (mL), t es el tiempo actual (h), t_0 es el tiempo en que comienza la alimentación (h), S_f es la concentración de glucosa en la solución de alimento (g mL⁻¹), $Y_{X/Sap}$ es el rendimiento biomasa/glucosa (gDCW g⁻¹ glucosa) y μ es la velocidad específica de crecimiento de la biomasa (h⁻¹). Esta fórmula se introdujo en un programa labview que permitía controlar la adición de alimento desde la microbureta.

Finalmente, al alcanzar un DO_{600nm} cercana a 72 se indujo la producción de la FSA A129S añadiendo un pulso de IPTG que permitiese alcanzar una concentración 100 μ M en el reactor. La fermentación finalizó al detectarse

acumulación de glucosa en el medio, indicando que tres horas después de la inducción, el cultivo no podía mantener la tasa de crecimiento establecida.

Tabla 3.3. Composición del medio definido utilizado en el biorreactor. Para la elaboración de este medio se adicionaron 720 μ L de una solución stock de microelementos, cuya composición se describe en la tabla 3.2.

Componente		Concentración (g/l)
Glucosa		20
Macros	K ₂ HPO ₄	11,9
	KH ₂ PO ₄	2,4
	NaCl	1,8
	(NH ₄) ₂ SO ₄	3
MgSO ₄ ·7H ₂ O		0,1
FeCl ₃		0,01
Ampicilina		0,05
Microelementos		-
H ₂ O destilada		-
Inóculo		80 ml

Tabla 3.4. Composición de la solución de alimento empleada en la fase discontinuo alimentado. Para la elaboración de este medio se adicionaron 31,5 mL de una solución stock de microelementos, cuya composición se describe en la tabla 3.2.

Componente	Concentración (g/l)
Glucosa	478
MgSO ₄ ·7H ₂ O	9,56
FeCl ₃	0,49
Ampicilina	0,05
Microelementos	-
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,089
H ₂ O destilada	-

3.3.1. Parámetros operacionales de la fermentación

La fermentación se realizó utilizando un biorreactor Applikon (Delft, Países bajos) en una cuba de 3 litros. Durante todo el proceso se mantuvieron en el reactor las condiciones de 37 °C, pH 7,0 y pO₂ al 60%. La temperatura se mantuvo constante al recircular agua a través de la camisa que recubre la cuba del reactor y el pH se ajustó a 7,0 mediante la adición de hidróxido de amonio, que neutralizó los ácidos producidos por las células *E. coli* durante el proceso de fermentación. Además, el hidróxido de amonio fue la fuente de nitrógeno de la fermentación. La agitación del medio aumentó progresivamente desde 450 hasta 1150 rpm en

función de la demanda de oxígeno del medio. Además, la presión parcial de oxígeno se mantuvo constante regulando la aireación del medio hasta un caudal máximo de $1,5 \text{ L min}^{-1}$. Al final de la fermentación se adicionó oxígeno puro ante la incapacidad de mantener el pO_2 al 60% con la agitación y el aporte máximo de aire.

3.3.2. Métodos analíticos

Durante el proceso de fermentación se determinó la evolución en el tiempo de la concentración de glucosa y la concentración de biomasa dentro del biorreactor. La biomasa se determinó mediante la medición de la densidad óptica a 600 nm, empleando un espectrofotómetro ATI Unicam 8625 UV/Vis. La concentración de biomasa se determina a partir de la DO_{600nm} ya que en el rango entre 0,1 y 0,8, una unidad de densidad óptica equivale a 0,3 gramos de peso seco (gDCW) L^{-1} . La concentración de glucosa en el medio se determinó enzimáticamente utilizando el equipo Biochemistry analyzer 2700 Select (YSI, Ohio, USA). Las muestras se prepararon para la determinación de glucosa centrifugándolas durante 15 minutos a 14000 rpm para precipitar la biomasa y posteriormente se filtró el sobrenadante empleando filtros con diámetro de poro de $0,45 \mu m$.

A partir de la adición del IPTG al medio, se determinó la actividad y la concentración de FSA. Para determinar la concentración de FSA en el reactor fue necesario disruptar la biomasa de las muestras ya que la expresión de esta proteína se realiza intracelularmente sin secretarse al medio extracelular. La DO_{600nm} de las muestras se ajustó a 4 en tampón de lisis (Tris-HCl 100 mM a pH 7,5) y se realizó el proceso de lisis de la biomasa mediante la sonicación de estas muestras utilizando un sonicador Vibracell CV50 (Sonics & Materials, Newton, USA). Este proceso se llevó a cabo en cuatro ciclos de 15 segundos manteniendo dos minutos de diferencia entre cada ciclo. Este proceso de lisis celular calienta las muestras por lo que fue necesario mantenerlas en hielo durante el periodo de tiempo entre cada ciclo de sonicación. Una vez finalizados los 4 ciclos, las muestras fueron centrifugadas a 14000 rpm y $4 \text{ }^{\circ}C$ durante 10 minutos para eliminar los restos celulares. El sobrenadante se empleó para determinar la actividad específica de la FSA mediante la medición de la actividad

enzimática con el ensayo de actividad y la determinación de la concentración de FSA mediante la preparación del gel de electroforesis de las proteínas del lisado y la determinación de la concentración de proteína total por el método de Bradford (Bradford 1976).

3.3.2.1. Gel de electroforesis de proteínas

Se realizó el análisis de las proteínas mediante gel de electroforesis para determinar el porcentaje que representa la FSA con respecto al contenido de proteínas totales de la cepa. El gel de electroforesis se realizó con el kit comercial de Invitrogen (Carlsbad, USA). Las muestras se prepararon añadiendo 10 μ L de muestra a una mezcla compuesta por 5 μ L de tampón de muestra 4X, 3 μ L de agua MiliQ y 2 μ L de agente reductor 10X. Estas muestras se incubaron a 70 °C y 300 rpm durante 10 minutos. La cuba de electroforesis se preparó colocando dentro de ella el gel NuPAGE® 12% Bis Tris y se añadió dentro de ella el “running buffer” (MES-SDS). Posteriormente se añadieron 15 μ L de muestra en cada uno de los pocillos del gel y se conectó la cuba a la fuente de alimentación durante 40 minutos a 200 V. Una vez finalizada la electroforesis se lavó el gel con agua destilada y se sumergió durante 1 hora en la solución fijadora (metanol 40%, ácido acético 10% en agua). Pasada la hora de fijación se lavó el gel y se sumergió durante otra hora en Bio-Safe™ Comassie para teñir las bandas de proteína del gel. El porcentaje de FSA se determinó por densitometría del gel empleando el software ImageLab® de Biorad®.

3.4. Purificación de la FSA A129S

La FSA se produce intracelularmente sin mecanismos de secreción extracelular por lo que al final de la fermentación hay que realizar la disrupción de la biomasa para purificar la enzima. La biomasa se recuperó del reactor centrifugando el medio de cultivo a 1000 rpm durante 45 minutos y se disrumpió en un dispositivo mecánico (Constant Cell Disruption Systems, Northamptonshire, Reino Unido). La disrupción se realizó sometiendo a 8 mL de suspensión de biomasa con una DO_{600nm} de 100 a una presión de 2,76 kBar. La biomasa se resuspendió en tampón de purificación de la FSA (fosfato de sodio 50 mM en presencia de NaCl

300 mM e imidazol 20 mM a pH 8,0) para realizar la posterior purificación de la enzima utilizando el lisado celular. Finalmente, el lisado se centrifugó a 1000 rpm durante 45 minutos para eliminar los restos celulares.

Se realizaron pruebas preliminares de purificación de la enzima en discontinuo con la finalidad de estudiar la idoneidad del método de purificación. Estas pruebas se realizaron en un vial de 30 mL incubando 9 mL de lisado con 1 mL de resina en agitación orbital a 25 °C. A continuación, se recuperó la resina por filtración a vacío y se resuspendió en 9 mL de buffer de elución (fosfato de sodio 50 mM en presencia de NaCl 300 mM e imidazol 300 mM a pH 8,0). Esta mezcla se mantuvo en agitación orbital a 25 °C durante una hora y se procedió a determinar la cantidad de FSA en mg y unidades de actividad que se recuperaba en el sobrenadante al final del proceso.

La FSA recombinante se purificó en dos etapas utilizando un AKTA pure 150 (GE Healthcare Lifescience, Chicago, USA). La primera etapa consistió en una purificación por afinidad aprovechando que la enzima se produce fusionada a una cola de histidinas y la segunda etapa fue un proceso desalting con la finalidad de eliminar la elevada concentración de sales del tampón en el que se recuperó la enzima pura.

3.4.1. Preparación de las columnas del AKTA pure

La purificación de la FSA por afinidad se realizó en una columna empaquetada con el soporte de sefarosa “High density metal free” cargado con cationes divalentes de níquel. Para ello se incubó la sefarosa con sulfato de níquel 0,2 M durante 12 horas y se recuperó el soporte por filtración a vacío. Para empaquetar la columna se añadió el soporte a la columna vacía y se conectó un caudal 2 mL min⁻¹ de etanol 20% hasta que la altura del lecho permaneció constante, momento en el cual se desplazó el adaptador de la columna hasta la altura del lecho para finalizar el empaquetado. Para preparar la columna de desalting se hidrató el soporte Sephadex G-10 con agua Mili-Q a 4 °C durante 12 horas y se añadió el soporte hidratado a la columna vacía para empaquetarlo con un caudal 5 mL min⁻¹ de etanol 20% hasta que la altura del lecho permaneció constante y

nuevamente se desplazó el adaptador hasta la altura del lecho para finalizar el proceso de empaquetado de la columna.

3.4.2. Purificación por afinidad

La purificación de la FSA A129S utilizando el AKTA pure 150 se realizó siguiendo un protocolo compuesto por cinco etapas. En la primera etapa se circularon 5 volúmenes de columna (VC) del tampón de purificación (fosfato de sodio 50 mM en presencia de NaCl 300 mM e imidazol 20 mM a pH 8,0) con un caudal de 2 mL min⁻¹, con la finalidad de equilibrar la columna. La segunda etapa consistió en la inyección de la muestra en la columna con un caudal 0,25 mL min⁻¹ utilizando un “superloop” de 50 mL para que posteriormente se lleve a cabo el lavado de la columna con 10 VC del mismo tampón a un caudal de 2 mL min⁻¹. La fase de elución se realizó circulando 10 VC de tampón de elución (fosfato de sodio 50 mM en presencia de NaCl 300 mM e imidazol 300 mM a pH 8,0) a un caudal de 2 mL min⁻¹ y el proceso finalizó con una etapa de reequilibrado de la columna. Las muestras del proceso se recuperaron utilizando un colector de fracciones acoplado al AKTA y se caracterizaron realizando el ensayo de actividad de la FSA y la determinación de la concentración de proteínas mediante el método de Bradford. El cromatograma siguió la evolución de la conductimetría y la absorbancia a 280 nm de las muestras al salir de la columna.

3.4.3. Desalting de la FSA

El proceso de desalting se llevó a cabo en el AKTA pure 150 utilizando una columna cargada con Sephadex G-10 siguiendo un protocolo compuesto por 4 etapas. El protocolo comenzó con una fase de equilibrado de la columna en la que se circularon 5 VC de tampón fosfato de sodio 50 mM a pH 8,0 a través del sistema. Tras el equilibrado se inyectó la muestra a la columna desde un “superloop” de 50 mL, para posteriormente llevar a cabo la fase de elución de la enzima con 1 VC del mismo tampón. Finalmente se llevó a cabo un reequilibrado de la columna con 5 VC. Todo este proceso se realizó a un caudal constante de 5 mL min⁻¹. El cromatograma siguió la evolución de la conductimetría y la absorbancia a 280 nm de las muestras al salir de la columna. Las muestras del

proceso se recuperaron utilizando un colector de fracciones acoplado al AKTA y se caracterizaron realizando el ensayo de actividad de la FSA y la determinación de la concentración de proteínas mediante el método de Bradford.

3.5. Inmovilización de las enzimas

3.5.1. Nanoclústers magnéticos (mNC)

Los nanoclústers magnéticos (mNC) fueron preparados mediante el ensamblaje de nanopartículas primarias de maghemita y su posterior recubrimiento con sílica. Con la finalidad de realizar la inmovilización de las enzimas, estos mNC fueron funcionalizados mediante la unión de diversas moléculas orgánicas a su superficie. Los mNC se almacenan en forma de suspensión acuosa y fueron producidos por la compañía Nanos SCI siguiendo el protocolo descrito en la bibliografía (Kralj and Makovec 2014).

Se realizó el estudio de la inmovilización de la FSA en mNC a pH 5,0 y a pH 8,0 añadiendo una mezcla de 0,02 U mL⁻¹ de FSA en tampón fosfato de sodio 10 mM con 0,5 g de mNC en un volumen final de 1 mL. El estudio de inmovilización se realizó con mNC sin funcionalizar (mNC-Si) y funcionalizados con polietilenglicol (mNC-PEG), grupos amino (mNC-NH₂), grupos carboxilo (mNC-COOH), grupos aldehído (mNC-CHO), grupos tiol (mNC-SH), grupos alquino (mNC-C≡CH), grupos azida (mNC-N₃) y etilendiaminotetraacetato (mNC-EDTA). Las mNC-N₃ se incubaron durante la inmovilización con concentraciones de 0 a 0,1 mg CuBr mL⁻¹. Las mezclas de inmovilización se incubaron durante 1 hora a 25 °C y 1000 rpm en un termoblock y se recuperaron los derivados inmovilizados sedimentando los mNC utilizando un imán.

Para realizar el enlace covalente entre la FSA y los mNC-NH₂ se añadieron concentraciones de 0 a 25 mM de EDAC al final de la inmovilización y se mantuvieron a 25 °C y 1000 rpm en el termoblock durante 3 horas. Una vez finalizada la inmovilización se lavaron los derivados dos veces con tampón de inmovilización para eliminar los restos de reactivos y la proporción de enzima que no se había inmovilizado covalentemente. Con la finalidad de seleccionar la

concentración óptima de EDAC se midió la actividad del derivado antes y después del lavado para determinar la cantidad de enzima que se eluye en cada caso.

Debido a que la carga enzimática empleada en la inmovilización en mNC es muy baja no se pudo determinar el rendimiento de inmovilización ni la actividad retenida mediante la medición de la actividad enzimática del derivado utilizando el ensayo de actividad de la FSA. Para determinar el rendimiento de inmovilización se tomaron muestras del sobrenadante y se analizaron por el método de Bradford. 150 μ L de muestra se mezclaron con 150 μ L reactivo Coomassie durante 10 minutos. Estas muestras se analizaron midiendo la absorbancia a 595 nm y se realizó un calibrado con BSA de 0 a 4 μ g mL⁻¹. El rendimiento de inmovilización se determinó a partir de la diferencia entre la cantidad de proteína en el stock antes de la inmovilización y la concentración de proteína en el sobrenadante después de la inmovilización. En cambio, la actividad retenida de los derivados mNC-FSA se determinó a través del test alternativo descrito en el apartado 3.2.2.

3.5.2. Glioxal-agarosa

El soporte glioxal-agarosa se preparó mediante la eterificación de la agarosa 4 BCL con glicidol y su posterior reducción con borohidruro siguiendo el protocolo propuesto en la literatura (Guisán 1988). Para ello se pesaron 15 mL de agarosa y se mezclaron con una solución de NaOH 140 mM y NaBH₄ 65 mM. Sobre esta mezcla se añadieron 1,635 mL de glicidol hasta alcanzar una concentración final de 6,15% v/v y se mantuvo la mezcla en agitación orbital durante 19 horas. Tras 19 horas de incubación se recuperó y se lavó el soporte para añadirlo a una solución de NaIO₄ 30 mM en un volumen final de 180 mL, con la finalidad de oxidar los grupos alcohol de la superficie de soporte a grupos aldehído. Finalmente se lavó el soporte con agua destilada para eliminar los reactivos y se almacenó en etanol 20% v/v a 4 °C.

La inmovilización de enzimas utilizando el soporte de glioxal-agarosa puede realizarse por dos métodos distintos. La inmovilización de la FSA se realizó

mezclando de 1 a 380 U de enzima con 1 mL de glioxal-agarosa en tampón bicarbonato de sodio 50 mM a pH 10,0 en un volumen final de 10 mL. Esta mezcla se mantuvo en agitación orbital a 25 °C durante tres horas en las cuales los grupos aldehído del soporte reaccionaron con los grupos amino de las lisinas y asparaginas de la superficie de la enzima formando bases de Schiff. Posteriormente se añadió borohidruro sódico sólido hasta alcanzar una concentración final de 1 mg mL⁻¹. Esta mezcla se mantuvo en las mismas condiciones durante 30 minutos, en los cuales el borohidruro redujo las bases de Schiff para formar enlaces C-N irreversibles y redujo los grupos aldehídos libres a grupos hidroxilo. Finalmente se lavó el derivado con tampón de inmovilización y se procedió a medir su actividad antes de recuperarlo por filtración a vacío.

La inmovilización de la CPO en glioxal-agarosa requirió de un protocolo de inmovilización distinto ya que la CPO no es estable por encima de pH 6,0 y el borohidruro es muy inestable en pH ácidos. Debido a ello se decidió recurrir al cianoborohidruro como agente reductor. Para realizar la inmovilización se mezcló 1 mL de glioxal-agarosa con 40 unidades de CPO en tampón fosfato de sodio 25 mM a pH 5,0 y a pH 6,0, con un exceso molar de cianoborohidruro 1:100. La inmovilización se mantuvo en agitación orbital a 25 °C durante 78 horas. Finalmente se lavó el derivado con tampón de inmovilización y se procedió a medir su actividad antes de recuperarlo por filtración a vacío.

3.5.3. MANA-agarosa

La MANA-agarosa es un soporte comercial preparado a partir de la agarosa en la empresa ABT beads, por lo que posee carácter hidrofílico, y esta funcionalizada con grupos amino en su superficie. La inmovilización en este soporte se realiza en dos fases. En la primera fase se realiza la adsorción iónica de la enzima en la superficie del soporte. Ambas enzimas se inmovilizaron mezclando 1 mL de soporte con 9 mL de solución enzimática en tampón fosfato de sodio 10 mM. La inmovilización de la FSA se realizó ofreciendo de 0,5 a 380 U de enzima mL⁻¹ de soporte a pH 6,0. Y para la CPO se ofrecieron de 10 a 10000 U mL⁻¹ de soporte a pH 5,0.

La etapa de inmovilización por adsorción finalizó cuando no se detectó actividad enzimática en el sobrenadante, momento en el cual se inició la formación de enlaces covalentes. Con la finalidad de estudiar la formación de los enlaces covalentes entre la enzima y el soporte, se añadieron distintas concentraciones de EDAC al medio, entre 5 y 25 mM, y se mantuvo nuevamente la mezcla en agitación suave durante 3 horas. Tras la incubación con EDAC la inmovilización finalizó incubando la enzima en NaCl 1 M durante una hora para determinar la cantidad de enzima que no se inmovilizó mediante enlace covalente con el soporte. Al finalizar la inmovilización se procedió a lavar el derivado con tampón de inmovilización y medir su actividad enzimática para posteriormente recuperarlo por filtración a vacío.

3.5.4. Soportes IDA-sefarosa

Los soportes IDA-sefarosa se prepararon a partir de la sefarosa “High density metal free” producida por ABT beads. Esta sefarosa está funcionalizada con grupos iminodiacético (IDA) en su superficie, los cuales permiten la unión mediante enlaces de coordinación de 20 a 40 μmol de metal divalente ml^{-1} de resina. Para cargar el soporte con el metal, se incubaron 100 ml de sefarosa con 300 ml de CoCl_2 0,2 M o 300 mL de NiSO_4 0,2M durante 12 h con agitación suave en el rotavapor. Tras la incubación se lavó el soporte con agua destilada para eliminar el exceso de metal y se almacenó la resina en etanol al 20% a 4 °C (Ardao et al. 2006).

La inmovilización en Co-IDA-sefarosa se basa en la afinidad que tiene el soporte por la cola de histidinas de la FSA recombinante. Para realizar esta inmovilización se ofrecieron de 0,8 a 500 U de enzima a 1 mL de soporte en tampón fosfato de sodio 50 mM a pH 8,0 en presencia de NaCl 300 mM e imidazol 20 mM. Esta mezcla se mantuvo en agitación orbital a 25 °C durante 30 minutos. Pasado este tiempo se procedió a lavar el derivado con tampón de inmovilización, a medir su actividad enzimática y a recuperarlo por filtración a vacío.

3.5.5. Eupergit CM

El Eupergit CM es un soporte sintético fabricado a partir de la acrilamida, por lo que a diferencia de los soportes derivados de la agarosa su matriz tiene carácter hidrofóbico, por lo que la inmovilización en este soporte se produjo en dos fases, una primera fase de adsorción hidrofóbica y la formación de enlaces covalentes.

Para realizar la inmovilización en Eupergit CM se procedió a hidratar 1 mL de soporte en agua MiliQ durante 12 horas a 4 °C. El mililitro de soporte se recuperó mediante filtración a vacío y sobre él se añadieron 9 mL de una mezcla que contenía 4 U de FSA o 50 U de CPO en tampón fosfato de sodio 100 mM a pH 6,0 en presencia de NaCl 250 mM. La inmovilización se mantuvo en agitación orbital a 25 °C hasta que la actividad del sobrenadante permaneció constante en el tiempo. En este momento se lavó el derivado con tampón de inmovilización, se determinó su actividad y se recuperó por filtración a vacío.

3.6. Oxidación del β -OH catalizado por la CPO

La reacción de oxidación del β -OH en reactor en “batch” fue catalizada por la enzima soluble y por el derivado inmovilizado, mientras que en reactor de lecho fijo solo se utilizó el biocatalizador inmovilizado. La reacción en “batch” se preparó disolviendo el β -OH en tampón ácido 2-(*N*-morfolino)etanosulfónico (MES) 100 mM a pH 6,5 y añadiéndolo a un vial de 30 mL en el que se encontraba 2500 U de enzima soluble o enzima inmovilizada (Figura 3.3.). La composición del medio al inicio de la reacción fue de β -OH 16 mM y *t*-BuOOH 40 mM en un volumen final de 5 mL, por lo que se ofreció 500 U CPO mL⁻¹ de reacción. La reacción de oxidación comenzó al añadir el *t*-BuOOH al medio y se mantuvo a 25 °C con agitación orbital (700 rpm, MHR 13, HLC BioTech, Bovenden, Germany). Durante la reacción se tomaron muestras para realizar el seguimiento de la concentración de sustratos y productos mediante HPLC.



Figura 3.3. Reactor en “batch” compuesto por un vial de 30 mL.

El reactor de lecho fijo estaba compuesto por un reactor de vidrio con una placa porosa en su extremo inferior (Alco, Terrassa, España) que se colocaba sobre un tubo de vidrio conectado a una bomba peristáltica Masterflex (Gelsenkirchen, Alemania) que hacía recircular el medio de reacción desde el tubo hacia el reactor de vidrio con un caudal de $1,3 \text{ mL min}^{-1}$ (caudal mínimo que permite la bomba). La reacción en reactor de lecho fijo se preparó empaquetando 4 mL del derivado inmovilizado en el reactor de vidrio con placa porosa. La reacción se llevó a cabo recirculando 4 mL de medio de reacción compuesto por β -OH 16 mM y *t*-BuOOH 40 mM en tampón ácido 2-morfolinetanosulfónico (MES) 100 mM a pH 6,5 con un caudal de $1,3 \text{ mL min}^{-1}$ utilizando la bomba periestáltica (Figura 3.4.). La actividad de la CPO en el reactor fue de 2500 U mL^{-1} de reacción y se realizó en paralelo la reacción en un reactor en “batch” con enzima soluble en las mismas condiciones. El seguimiento de la reacción se realizó mediante HPLC.

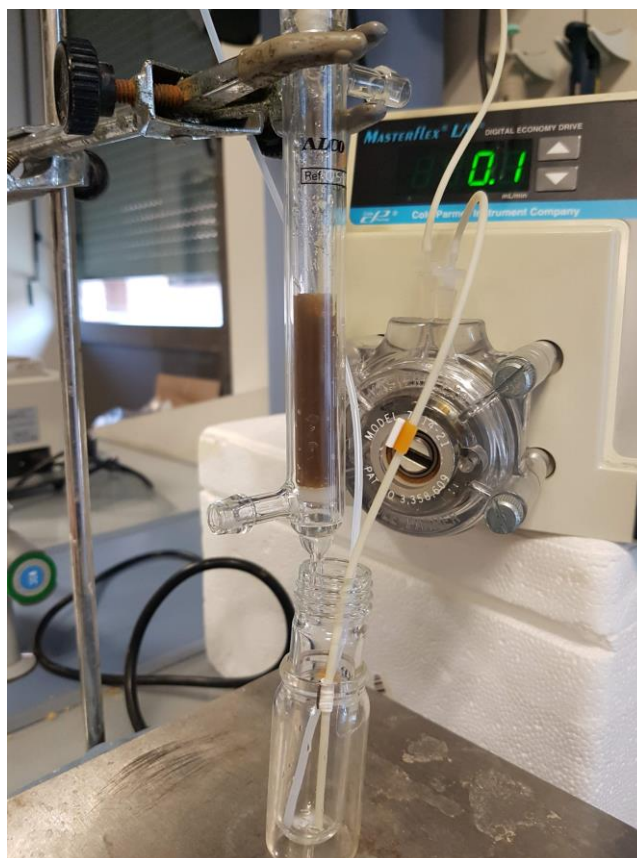


Figura 3.4. Reactor de lecho fijo.

3.7. Adición aldólica catalizada por la FSA

La síntesis de pre-D-fagomina fue catalizada por los derivados inmovilizados de la FSA en MANA-agarosa, glioxal-agarosa, Co-IDA-sefarosa y mNC-NH₂. Todas las reacciones se realizaron ofreciendo 1 U mL⁻¹ de reacción con la finalidad de comparar los distintos derivados inmovilizados con la reacción catalizada por la enzima soluble a la misma carga enzimática. El medio de estas reacciones estaba compuesto por DHA 45 mM y β-CHO 30 mM en tampón ácido 4-(2-hydroxietil)-1-piperazinetanosulfónico (HEPES) 50 mM a pH 8,0 en un volumen final de 10 mL. Las reacciones se llevaron a cabo en un vial de 30 mL a 25 °C con agitación orbital. El seguimiento de la reacción se realizó determinando la concentración de β-CHO y pre-D-fagomina mediante HPLC.

3.8. Reacción acoplada de la FSA y la CPO

La adición de la DHA al β -CHO fue catalizada por el derivado co-inmovilizado de la FSA y la CPO en un reactor de lecho fijo con la finalidad de evaluar si la velocidad de esta reacción limitaría la velocidad de la reacción acoplada. Para realizar esta reacción se empaquetó en el reactor 4 mL de un derivado co-inmovilizado con 196 U de FSA y 4900 U de CPO mL⁻¹ de inmovilizado y se recircularon 4 mL de un medio compuesto por DHA 72,6 mM, β -CHO 16 mM y *t*-BuOOH 40 mM en tampón MES 100 mM a pH 6,5 con un caudal de recirculación de 1,3 mL min⁻¹. La concentración de FSA en el reactor fue de 98 U mL⁻¹ de reacción. La reacción se siguió determinando la concentración de β -CHO y pre-D-fagomina utilizando el HPLC.

La reacción acoplada de síntesis de pre-D-fagomina fue catalizada por el derivado co-inmovilizado de la FSA y la CPO en reactor en “batch” y en reactor de lecho fijo. Para la reacción en reactor en “batch” se utilizó un derivado con 196 U de FSA y 4900 U de CPO mL⁻¹ de inmovilizado. El medio de reacción estaba compuesto por DHA 72,6 mM y β -OH 16 mM en tampón MES 100 mM a pH 6,5 en un volumen total de 10 mL. En este reactor se estudió el efecto de la adición de peróxido mediante la adición inicial de una concentración 40 mM de oxidante y mediante la restitución de una concentración 3 mM de oxidante cada hora. Los agentes peróxidos estudiados fueron el *t*-BuOOH y el H₂O₂. Los resultados de estas reacciones se compararon con los obtenidos en las mismas condiciones utilizando las enzimas solubles.

Para abordar el estudio de las condiciones de reacción en el reactor de lecho fijo se procedió a empaquetar 4 mL de derivados co-inmovilizados en los que se varió la relación FSA/CPO. La reacción se llevó a cabo recirculando 4 mL de medio compuesto por DHA 72,6 mM y β -OH 16 mM en tampón MES 100 mM a pH 6,5 con un caudal de 1,3 mL min⁻¹. Nuevamente se estudió el efecto de la adición de peróxido en la reacción, por lo que se realizó la adición continua de *t*-BuOOH al medio con una microbureta (Crison, Barcelona, España). Se estudiaron las configuraciones de adición de 13,6; 27,2 y 45,3 mmoles de *t*-BuOOH cada hora. El seguimiento de la reacción se realizó mediante HPLC.

3.9. Cuantificación de la concentración de β -OH, β -CHO y pre-D-fagomina

Las concentraciones de β -OH, β -CHO, β -COOH y pre-D-fagomina fueron determinadas mediante el análisis de las muestras por HPLC utilizando un Dionex UltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) con detector de longitud de onda variable. Para realizar este análisis se empleó la columna de fase reversa CORTECS C18+ 2.7 μ m 4.6 \times 150 mm de Waters (Milford, USA). Las muestras de la reacción se disolvieron en acetonitrilo en una proporción 1:40 para detener la reacción. El análisis de estas muestras se llevó a cabo inyectando 15 μ L de muestra con un caudal de 0,7 mL min⁻¹ a 30 °C. Para este análisis se emplearon dos solventes, el solvente A -0,1% (v/v) ácido trifluoroacético (ATF) en H₂O- y el solvente B -0,095% (v/v) ATF en acetonitrilo/H₂O 4:1 (v/v)-. Las muestras se eluyeron utilizando un gradiente de 5 a 28,5% de B en 30 segundos y con una elución isocrática al 28,5% de B durante 15 minutos. La detección se realizó a una longitud de onda de 254 nm (Masdeu et al. 2018).

Se realizó una recta de calibrado utilizando estándares de concentración conocida para realizar el análisis cuantitativo de el β -OH, el β -CHO y el β -COOH. La desviación estándar se calculó a partir de las medidas realizadas por duplicado de cada muestra.

4. Producción y purificación de la FSA

4.1. Introducción

Como se ha explicado anteriormente se ha propuesto un sistema multienzimático para la síntesis de pre-D-fagomina en el cual se empleaba la CPO para realizar la oxidación del 3-[(Benciloxicarbonil)amino]-3-aminopropanol (β -OH) y la FSA para catalizar la adición aldólica de la DHA al 3-[(Bencil oxicarbonil)amino] propionaldehído (β -CHO) obteniendo como producto la pre-D-fagomina. La disponibilidad de las enzimas requeridas fue una de las principales consideraciones al plantear este sistema multienzimático. La CPO es una peroxidasa que se produce en el hongo filamentoso *Caldaromyces fumago* y en esta tesis se trabajó con la CPO comercial comprada a Sigma Aldrich (St. Louis, USA). Por su parte la FSA es una enzima no comercial, por lo que en este capítulo se abordaron los procesos de producción y purificación de la FSA.

La FSA fue descubierta en *Escherichia coli* en 2001 por Schürmann y Sprenger (Schürmann and Sprenger 2001). Estos autores descubrieron que esta nueva aldolasa no era una aldolasa dependiente de metales (aldolasa clase II) ya que no se inhibía al incubarla en presencia de EDTA, por lo que esta nueva aldolasa se clasificó como una aldolasa de clase I. Posteriormente se realizó el estudio de la estructura cristalina de la FSA y se descubrió que esta enzima poseía un residuo de lisina, la Lys85, en su centro activo que participaba en el mecanismo de acción de la enzima formando una base de Schiff con el sustrato donador de la reacción, comprobando así que la FSA seguía el mismo mecanismo de acción que las aldolasas de clase I (Thorell et al. 2002).

Diversas variedades mutantes de la FSA han sido desarrolladas en los últimos años con la intención de mejorar sus capacidades catalíticas, entre ellas cabe destacar la FSA A129S, la cual es mucho más eficiente que la FSA *wt* en la condensación aldólica utilizando como compuesto donador la DHA, ya que su ratio k_{cat}/K_M era 17 veces mayor (Castillo et al. 2010). Por ello en esta tesis se utilizó la FSA A129S para realizar la adición de la DHA al β -CHO en la síntesis de la pre-D-fagomina.

El gen de la FSA A129S fue clonado en el plásmido pET22 y se expresó en una cepa de *E. coli* BL21(DE3). Los vectores de clonación pET son un conjunto de plásmidos desarrollados por Invitrogen, que se caracterizan por poseer la secuencia del promotor del bacteriófago T7. La secuencia del promotor del bacteriófago T7 no es reconocida por la ARN polimerasa de *E. coli*, por lo que en el vector se encuentra codificada la secuencia del gen de la polimerasa del fago T7. Esta polimerasa es mucho más activa que la de la célula huésped y reconoce fuertemente a su secuencia promotor, por lo que se produce un elevado número de copias de ARNm del gen de la proteína recombinante (Studier and Moffatt 1986). La expresión de la polimerasa del bacteriófago T7 esta modulada por el operon lac, por lo que se induce la expresión de esta proteína al añadir IPTG al medio de cultivo. El ligando natural de la proteína represora del operon lac es la alolactosa pero se induce la expresión con IPTG ya que esta molécula es un análogo estructural de la alolactosa no hidrolizable por la β -galactosidasa. Al añadir el IPTG al medio, esta molécula atraviesa la membrana celular y se une a la proteína represora del operon lac permitiendo así que la ARN polimerasa se una al promotor y realice la transcripción del gen de la polimerasa del fago T7.

El vector pET22 posee como sistema de selección de clones un gen de resistencia a ampicilina, por lo que al cultivar las cepas que contienen este plásmido en presencia de ampicilina se produce una presión selectiva que impide la pérdida del gen de la enzima recombinante. Finalmente, este vector posee una secuencia que añade una cola de histidinas en el extremo C-terminal de la proteína recombinante, la cual se utilizará para los procesos de purificación e inmovilización de la enzima.

E. coli es el organismo procariota que más ha sido estudiado y debido a ello es uno de los principales organismos empleados en la producción de proteínas recombinantes. Las principales ventajas de la producción de proteínas recombinantes en este organismo son el bajo precio de los medios empleados para crecer la biomasa, la ausencia de una membrana nuclear, la posibilidad de coexistir varias copias del gen en la misma célula, la rápida expresión génica, el sencillo control de la expresión, la rápida velocidad de crecimiento de la biomasa

y la capacidad de acumular elevadas cantidades de la proteína recombinante, pudiendo alcanzar hasta un 50% del contenido proteico celular (Yin et al. 2007). Otra ventaja de realizar la producción de proteínas recombinantes en *E. coli* es la posibilidad de trabajar en cultivos de elevada densidad celular, permitiendo así aumentar el rendimiento volumétrico del proceso. Los cultivos de elevada densidad se realizan en biorreactores y permiten reducir el volumen del medio de cultivo, reducen los costes de la producción de enzima y aumentan la productividad del proceso (Lee 1996).

El cultivo discontinuo alimentado es una estrategia utilizada para trabajar con cultivos celulares mediante la adición controlada al reactor de los nutrientes requeridos para el crecimiento de la biomasa. Controlar la adición del alimento permite regular la velocidad de crecimiento de la biomasa con la finalidad de optimizar el proceso de producción de la proteína de interés (Ruiz et al. 2009). Esta estrategia ha sido utilizada para la producción de aldolasas dependientes de DHAP en distintas cepas de *E. coli* similares a la BL21(D3), en la que se clonó la FSA A129S (Durany, De Mas, and López-Santín 2005; Garcia-Junceda et al. 1995). La inducción de la expresión de una proteína mediante la adición de IPTG en un cultivo en discontinuo alimentado debe realizarse al final de la fase de crecimiento exponencial con la finalidad de obtener una elevada productividad en el proceso (Pinsach, de Mas, and López-Santín 2008). Esto es debido a que la inducción de la expresión de la proteína recombinante compromete el metabolismo y la capacidad de las células para mantener su velocidad específica de crecimiento, por lo que al inducir la expresión de la proteína recombinante con IPTG no se alcanza el mismo nivel de biomasa que al realizar la fermentación sin inducción.

La ecuación para la adición continua de la solución de alimento se obtiene de igualar el balance de materia de la glucosa y de la biomasa en el biorreactor e integrarlo entre t_0 y t :

$$F = \frac{\mu X_0 V_0 \exp(\mu t)}{S_f Y_{X/Sap}}$$

En esta fórmula F es el caudal de adición de alimento (mL h^{-1}), μ es velocidad específica de crecimiento de la biomasa (h^{-1}), X_0 es la concentración de la biomasa a tiempo 0 (gDCW mL^{-1}), V_0 es el volumen de líquido en el reactor a tiempo 0 (mL), t es el tiempo actual (h), S_f es la concentración de glucosa en la solución de alimento (g mL^{-1}), $Y_{X/S_{ap}}$ es el rendimiento biomasa/glucosa (gDCW g^{-1} de glucosa) y t_0 es el momento de inicio de la alimentación del reactor (h). La fórmula se discretizó expresando el volumen de solución de alimento que hay que añadir para mantener la velocidad específica de crecimiento establecida. Para ello se asumió que las variaciones de volumen entre t_0 y t son debidas a la adición de la solución de alimento desde la microbureta.

$$\Delta V = V - V_0 = \frac{X_0 V_0}{S_f Y_{X/S_{ap}}} (\exp(\mu t) - 1)$$

En esta fórmula ΔV es el volumen de solución de alimento que se añade a tiempo t . Esta es la fórmula que se introdujo en un programa labview que permite controlar la adición de alimento desde la microbureta (Durany et al. 2005).

La FSA A129S fue expresada como una proteína de fusión con una cola de histidinas con la finalidad de facilitar los procesos de purificación e inmovilización de la enzima. Añadir una cola de histidinas a una proteína permite realizar los procesos de purificación e inmovilización en resinas con cationes metálicos divalentes quelados, como lo son el cobalto o el níquel, ya que estas resinas presentan una elevada afinidad por las colas de histidina. Este tipo de purificación ha sido empleada en la obtención de otras aldolasas consiguiendo altos rendimientos de purificación (Garcia-Junceda et al. 1995). En nuestro grupo se reportó la purificación mediante afinidad de la fuculose-1-phosphate aldolasa (FucA). Para la purificación de esta enzima se quelaron distintos metales en soportes de sefarosa y se observó que se alcanzaban distintos rendimientos de purificación según el metal que se empleara en el proceso, así tras la purificación se recuperaba toda la actividad enzimática al trabajar con la resina con cobalto y solo un 45% al emplear la resina con níquel (Ardao et al. 2006). Otros ejemplos de purificación de proteínas con colas de histidina utilizando métodos de afinidad

con metal quelado son la purificación de kinesina con un rendimiento del 100% utilizando sefarosa cargada con níquel (Gibert, Bakalara, and Santarelli 2000) y la purificación de la piroglutamil aminopeptidasa utilizando un soporte de agarosa funcionalizado con ácido nitriloacético (NTA) cargado con níquel con un rendimiento del 96% (Arnau et al. 2006).

4.2. Objetivos

El objetivo principal de este capítulo es la producción de la FSA para realizar el estudio de su inmovilización y utilizar la enzima en la síntesis de pre-D-fagomina.

Los objetivos parciales son:

- Producción de la FSA A129S en cultivos de alta densidad celular para realizar el estudio de su inmovilización.
- Purificar la FSA mediante cromatografía de afinidad y realizar el desalting de la muestra.

4.3. Resultados y discusión

4.3.1. Producción de la FSA A129S

La producción de la FSA A129S se realizó en un cultivo celular en biorreactor con la finalidad de producir elevadas cantidades de enzima para utilizarla en la síntesis multienzimática de la pre-D-fagomina. El biorreactor se inoculó a una DO_{600nm} de 0,1 con la finalidad de que el crecimiento de la biomasa al inicio de la fase de “batch” fuese lo suficientemente lento como para que el cultivo no agotase la glucosa del medio durante 10-12 horas. La fermentación comenzó con una fase de “batch” en la que se observó el crecimiento de la biomasa bajo unas condiciones preestablecidas hasta que el cultivo agotó la fuente de carbono del medio, la glucosa. Durante las primeras cuatro horas de la fase “batch” se observó una fase de latencia en la que no se detectó consumo de la glucosa del medio ni aumento de la concentración de biomasa. A partir de las 6 horas del “batch” se comenzó a observar el aumento en la concentración de biomasa y la disminución de la concentración de glucosa, para que finalmente a partir de las

8 horas de “batch” comenzara a apreciarse el aumento de la concentración de biomasa en el reactor. Debido a este aumento de la concentración de biomasa se produjo un aumento demanda de oxígeno por parte del cultivo, así a las 8 horas de fermentación, la agitación había subido de 450 a 780 rpm y la aireación aumentó de 0,625 a 0,875 vvm. A las 10 horas de cultivo en “batch”, como se observa en la figura 4.1., se había agotado la glucosa en el medio y se midió una cantidad de biomasa en el biorreactor de 6,3 gDCW. Al final de esta fase, la agitación se encontraba a 830 rpm, la aireación a 1,25 vvm y se había añadido al medio 74 mL de NH₄OH para neutralizar los ácidos producidos durante la fermentación ,manteniendo el pH en 7,0, lo cual es suficiente para que el aporte de nitrógeno no sea limitante en el proceso.

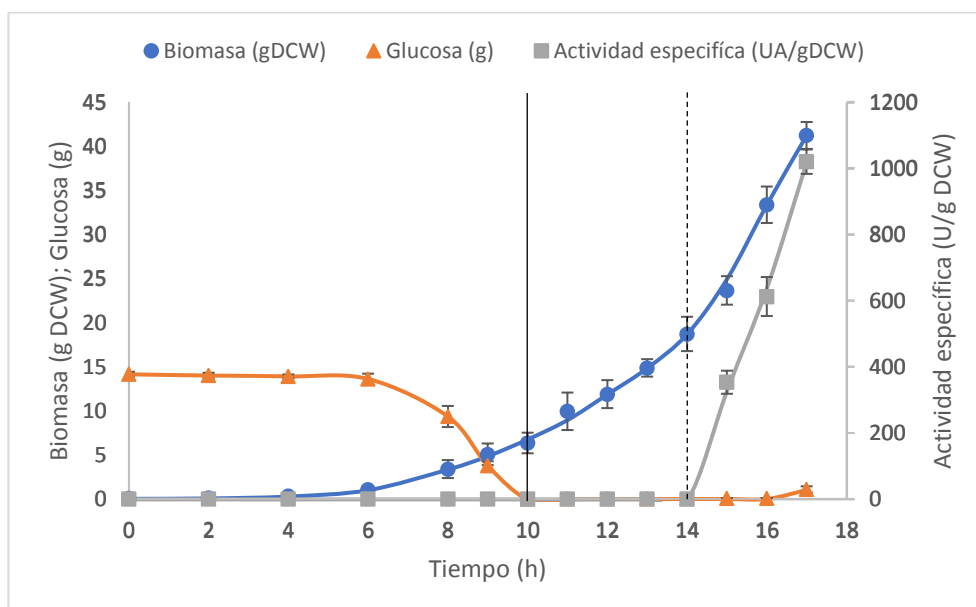


Figura 4.1. Curso de la fermentación en discontinuo alimentado de la cepa *E. coli* BL21(DE3) con el plásmido pET22-fsaA129S. La fase en discontinuo duró desde la inoculación del reactor hasta que se agotó la glucosa del medio, momento en el cual se inició la fase discontinuo alimentado al comenzar la adición de una solución de alimento al medio (línea sólida) manteniendo así una velocidad específica de crecimiento constante ($\mu=0,22 \text{ h}^{-1}$). A las 14 horas, tras alcanzar una concentración de biomasa de 20 g DCW se añadió un pulso de IPTG para conseguir una concentración final de 100 μM en el medio (línea discontinua) para inducir la producción de la enzima. Todo el proceso se realizó a 37 °C. La desviación estándar se calculó a partir de la media de tres fermentaciones.

La adición exponencial de glucosa permite mantener constante la velocidad específica de crecimiento de la biomasa, debido a ello la transición de la fase de

“batch” a la fase de “fed-batch” se realizó cuando la biomasa había agotado toda la glucosa del medio. En trabajos anteriores del grupo en la producción de aldolasas en cepas similares de *E. coli* se estudió que al establecer tasas de crecimiento específico superiores a $0,25 \text{ h}^{-1}$ se observaba acumulación específica de acetato en el medio durante la fermentación (Pinsach et al. 2008). La tasa de crecimiento a partir de la cual se comienza a detectar acumulación de acetato depende de la cepa y el vector de clonación empleados en cada proceso. En base a la experiencia del grupo se estableció una velocidad específica de crecimiento de $0,22 \text{ h}^{-1}$ para evitar la acumulación de acetato en el medio, ya que este actúa como un inhibidor del crecimiento celular. Durante esta fase se observó un crecimiento de la biomasa en el reactor a una μ de $0,22 \text{ h}^{-1}$ (Figura 4.1.), pasando de $6,3 \text{ gDCW}$ al inicio de la fase de cultivo discontinuo alimentado a $18,7 \text{ gDCW}$ pasadas cuatro horas. A las 4 horas de “Fed-batch” se observó que la pO_2 no se podía mantener al 60% con la agitación máxima (1150 rpm), por lo que se procedió a añadir oxígeno puro con un caudal de $0,69 \text{ vvm}$.

La inducción de la expresión de la FSA se realizó al alcanzar una $DO_{600\text{nm}}$ cercana a 72, añadiendo un pulso de $923 \mu\text{L}$ de una solución stock de IPTG 100 mM , con la finalidad de obtener una concentración final de IPTG en el reactor de $100 \mu\text{M}$. Tres horas después de la inducción se detectó acumulación de glucosa en el medio ($0,4 \text{ g L}^{-1}$), por lo que se decidió finalizar el proceso de fermentación ya que el cultivo no podía mantener la velocidad específica de crecimiento establecida.

Al analizar la evolución de la biomasa en el proceso (Figura 4.1.) se comprobó que durante la última hora de la fermentación la velocidad de producción de biomasa disminuyó ya que la pendiente de la recta en este período fue menor que en el trazado de la hora anterior, alcanzando un nivel final de biomasa de $41,3 \text{ g DCW}$.

Durante la fase de inducción, tras la adición del pulso de IPTG, se tomaron muestras del reactor y se determinó la evolución en el tiempo de la actividad específica de la FSA. Mientras que en la muestra preinducción no se detectó actividad de FSA, durante las tres horas siguientes se observó un aumento lineal

de la actividad específica de la FSA (Figura 4.1.). A la hora postinducción se detectaron 353 U gDCW⁻¹, a las dos horas 613,2 U gDCW⁻¹ y al final del proceso se midió una actividad específica máxima de 1021,7 U gDCW⁻¹. Con la finalidad de comprobar la producción de la FSA se realizó el gel de proteínas de las muestras tomadas durante la fase de inducción (Figura 4.2.) y se observó la aparición de una banda a partir de la media hora postinducción a 22,9 kDa, que se corresponde con el peso molecular del monómero de la FSA, indicando así la producción de la enzima recombinante en el reactor. Posteriormente se determinó el porcentaje de proteína total que representaba la FSA en el lisado mediante densitometría del gel y se determinó que al final del proceso la FSA representaba el 29,5% del contenido de proteína total. Al final de la fermentación se determinó una concentración de proteína total de 244 mg gDCW⁻¹, por lo que se produjeron cerca de 72 mg de FSA gDCW⁻¹ (Tabla 4.1.).

Tabla 4.1. Resultados de la producción de la FSA. En la tabla se expresan los resultados de cantidad de biomasa, actividad específica, proteína total, porcentaje de FSA con respecto a la proteína total y las unidades totales de FSA producidas al final del proceso.

Resultados de la producción de FSA A129S	
Biomasa (gDCW)	41,3
Actividad específica (U gDCW⁻¹)	1021,7
FSA con respecto a la proteína total (%)	29,5
FSA (mg gDCW⁻¹)	72,0
FSA (U mg⁻¹ de FSA)	14,2
FSA producida (U)	42196,2
FSA producida (g)	2,98

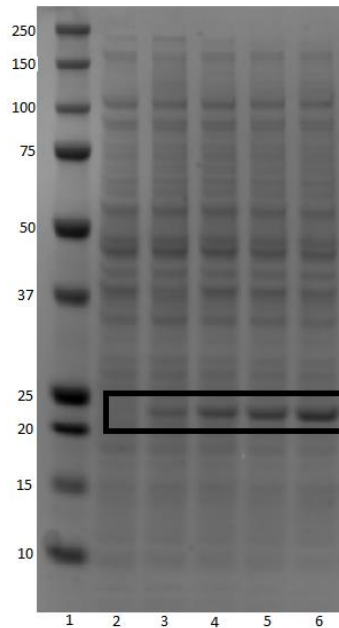


Figura 4.2. Gel de proteína de la producción de la FSA A129S. Los carriles se corresponden de izquierda a derecha al (1) Marker molecular, (2) muestra preinducción, (3) 0,5 horas postinducción, (4) 1 hora postinducción, (5) 2 horas postinducción y (6) 3 horas postinducción. Se ve la aparición de la FSA a 22,9 kDa a partir de la media hora postinducción.

4.3.2. Purificación de la FSA A129S

El lisado celular obtenido tras la disrupción mecánica de la biomasa se centrifugó a 1000 rpm durante 45 minutos para descartar los restos celulares. El sobrenadante recuperado tras la centrifugación fue caracterizado y se determinó una actividad específica de $1,9 \text{ U FSA mg}^{-1}$ de proteína, este dato fue calculado a partir de la actividad medida en el lisado que fue de $33,6 \text{ U de FSA mL}^{-1}$ y la concentración de proteína total determinada por el método de Bradford, $16,9 \text{ mg de proteína mL}^{-1}$ de lisado.

4.3.2.1. Purificación por afinidad

4.3.2.1.1. Estudio de la resina

Con la finalidad de estudiar la purificación por afinidad a través de las colas de histidina se cargó el soporte de sefrosa funcionalizada con grupos iminodiacético con cationes divalentes de níquel (Tabla 4.2.).

Tabla 4.2. Estudio de la purificación de la FSA A129S. Se cargo la sefarosa con níquel y se determinó la actividad retenida en el soporte tras realizar la unión por afinidad y el rendimiento de purificación tras realizar la elución de la enzima con tampón fosfato 50 mM, NaCl 300 mM e imidazol 300 mM a 25 °C y pH 8,0. El lisado celular contenía 4,2 mg FSA mL⁻¹, por lo que se ofrecieron 37,8 U mL⁻¹ de resina.

Actividad retenida en la resina (%)	95,1
Rendimiento de purificación (%)	89,1

Tras una hora de incubación se observó que el 95% de la FSA se unía a la resina en las condiciones establecidas. Tras recuperar el soporte e incubarlo con imidazol 300 mM se observó que finalmente se recuperaba el 89% de la enzima como enzima pura. Antes de empaquetar la columna del FPLC con la resina se comprobó la carga máxima de FSA que puede unirse a este soporte (Tabla 4.3.).

Tabla 4.3. Determinación de la carga máxima de FSA que admite el soporte. Se determinó la cantidad máxima de FSA que se puede purificar por mililitro de resina al medir la actividad enzimática y la concentración de proteína en el sobrenadante tras 1 h de incubación de diferentes concentraciones de FSA pura con 1 mL de resina en tampón de purificación durante una hora a 25 °C y agitación orbital. La desviación estándar se calculó a través de dos réplicas de cada media.

FSA añadida (mg)	FSA en el sobrenadante (mg)
4,9 ± 0,4	0,2 ± 0,1
11,2 ± 0,3	0,6 ± 0,1
20,1 ± 0,7	0,9 ± 0,1
29,2 ± 1,1	1,5 ± 0,3
38,6 ± 0,9	8,3 ± 0,7
50,7 ± 1,2	19,2 ± 0,6

Así se observó que al ofrecer cantidades menores de 30 mg de FSA por mL de resina, se retiene en el soporte prácticamente toda la enzima ofrecida tras una hora de incubación a 25 °C y agitación orbital. Sin embargo, al ofrecer mayores cantidades de enzima se observó que parte de la FSA quedó en el sobrenadante tras una hora de incubación, por lo que se determinó que la carga máxima de FSA que admite esta resina es de aproximadamente 30 mg mL⁻¹ de soporte.

4.3.2.1.2. Selección de la concentración de imidazol para la elución

Con la finalidad de determinar la concentración de imidazol necesaria para realizar la elución de la enzima desde el soporte, se realizó la purificación de la FSA A129S por triplicado mezclando 30 mL de soporte y 300 mL de lisado en una botella de 500 mL y se mantuvo en agitación suave en el roller durante una hora a 25 °C. Estos derivados se incubaron con tampón fosfato de sodio 50 mM en presencia de NaCl 300 mM a pH 8,0 y tres concentraciones distintas de imidazol a 25 °C durante una hora (Tabla 4.4.).

Tabla 4.4. Estudio del efecto de la concentración de imidazol en el proceso de elución. Se midió la actividad de FSA retenida en 30 mL de soporte y se determinó el rendimiento de elución a partir de la actividad medida en el sobrenadante al final del proceso. La elución se realizó a 25 °C en un volumen final de 300 mL.

Concentración de imidazol en el tampón	300 mM	400 mM	500 mM
Unidades retenidas en la resina	8630	8573	8617
Rendimiento de elución en actividad (%)	93,8	91,8	90,2
Rendimiento de elución en mg de FSA (%)	94,1	94,4	93,8

Tras realizar el estudio del efecto de la concentración de imidazol en el proceso de elución (Tabla 4.4.) se estableció como tampón de elución al tampón fosfato de sodio 50 mM en presencia de NaCl 300 mM e imidazol 300 mM a pH 8,0. En este estudio se observó que al aumentar la concentración de imidazol no se recuperaban mayores cantidades de proteína, pero disminuían las unidades de actividad recuperada debido a su desactivación de la enzima en presencia de imidazol. No se estudiaron concentraciones de imidazol por debajo de 300 mM ya que en trabajos similares del grupo de purificación de aldolasas se observó que esta era la concentración mínima de imidazol para realizar la elución con elevados rendimientos de purificación (Ardao et al. 2006).

4.3.2.1.3. Purificación en el AKTA pure 150

La purificación de la FSA recombinante se realizó siguiendo el protocolo descrito en materiales y métodos. En el cromatograma (Figura 4.3.) se observan dos picos en la señal de ultravioleta, uno a 0,5 mL que se corresponde con los componentes del lisado celular que no quedan retenidos en la columna (proteína inespecífica, ácidos nucleicos, compuestos orgánicos...) y otro a los 16 mL que se corresponde con la FSA pura que sale de la columna. La señal de conductimetría se mantiene estable a 39,8 mS/m durante el equilibrado y cae hasta prácticamente 0 mS/m durante la inyección de la muestra, para volver a 39,8 durante el lavado de la columna con el tampón con imidazol 20 mM. A los 15 mL se produce el cambio del tampón con imidazol 20 mM por el tampón con imidazol 300 mM, por lo que a los 16 mL se observa un aumento de la señal de conductimetría hasta alcanzar los 54 mS/m debido al aumento de la concentración de imidazol en el sistema. Este aumento de la conductimetría coincide con la aparición del pico de la FSA pura ya que la elevada concentración de imidazol compete con la enzima por unirse a la resina y la desplaza de la columna. Finalmente, con el reequilibrado la conductimetría regresa a su valor inicial de 39,8 mS/m.

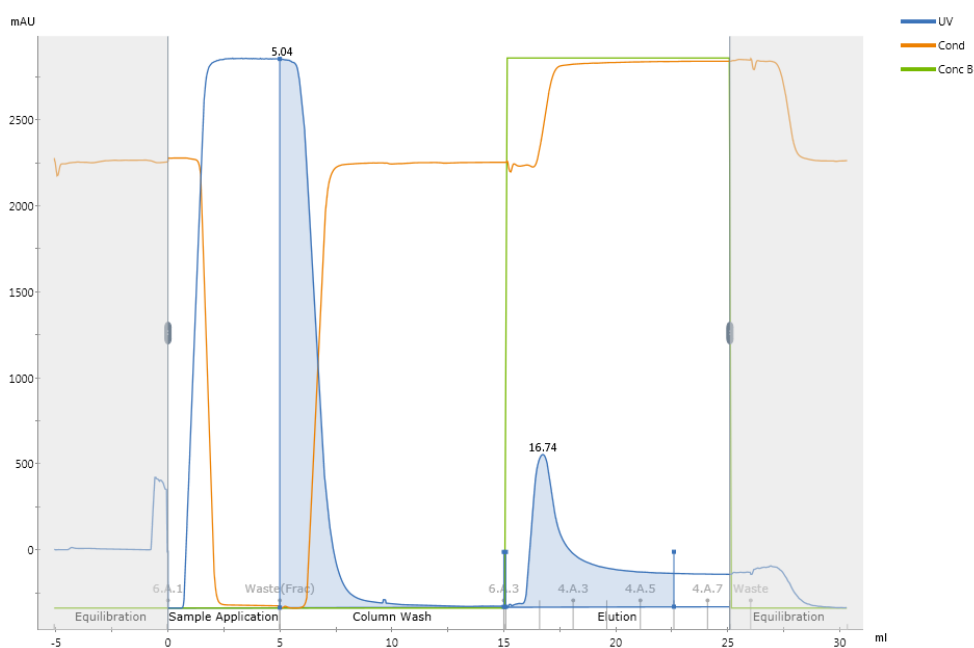


Figura 4.3. Cromatograma de la purificación de la FSA por afinidad. El pico 1 de la señal de ultravioleta (línea azul) se observa de 0,5 a 7,5 mL y se corresponde con la proteína inespecífica

que no queda retenida en la columna. El pico 2 se observa a los 16 mL y se corresponde con la FSA pura eluida de la columna. La línea amarilla se corresponde con la señal de conductimetría. El caudal de la fase móvil es de 2 mL min⁻¹ en todo el proceso excepto durante la inyección de la muestra que se realiza con un caudal de 0,25 mL min⁻¹. El proceso se llevó a temperatura ambiente (25 °C) en tampón fosfato 50 mM a pH 8,0 con NaCl 300 mM e imidazol 20 mM. La elución se realizó con imidazol 300 mM.

Al realizar el balance de la purificación en unidades de actividad se observó que tras la elución se recuperó en el colector de muestras el 93% de la actividad de FSA. En cambio, al realizar el balance en miligramos de proteína se observó que solo se recuperó un 29,5% de la proteína total como FSA pura, concordando con la cantidad de FSA en el lisado calculada mediante la densitometría del gel. Finalmente, como se observa en la tabla 4.5., la actividad específica determinada para la FSA pura fue de 14,7 U mg⁻¹ de proteína frente a las 1,9 U mg⁻¹ de proteína que poseía el lisado. Así la actividad específica de la enzima purificada concuerda con la actividad específica predicha a partir de los valores de actividad enzimática del lisado y de la densitometría del gel de proteínas.

Tabla 4.5. Resultados de la purificación de la FSA A129S. Los resultados se expresan como el rendimiento en unidades de actividad y en mg de proteína. Además, se expresa la actividad específica de la FSA tras la purificación.

Rendimiento en actividad (%)	Rendimiento proteína (%)	Actividad específica (U mg ⁻¹)
92,7	29,5	14,7

4.3.2.1.4. Desalting utilizando el AKTA pure 150

La FSA purificada por afinidad requirió de un tratamiento posterior de desalting con la finalidad de eliminar la elevada concentración de imidazol del tampón en el que se recupera la enzima pura ya que en el apartado 4.3.2.1.2. se comprobó que la enzima se desactiva en presencia de elevadas concentraciones de imidazol. Se realizó el protocolo de desalting propuesto en materiales y métodos inyectando diferentes volúmenes de muestra con la finalidad de seleccionar el volumen máximo que se puede añadir a la columna de 127 mL de sephadex para realizar el proceso de desalting con un rendimiento elevado.

En el cromatograma del desalting (Figura 4.4.) se observó que al inyectar 20 mL de muestra se separan completamente los picos que se corresponde con la FSA pura y con el buffer con elevada concentración de NaCl e imidazol.

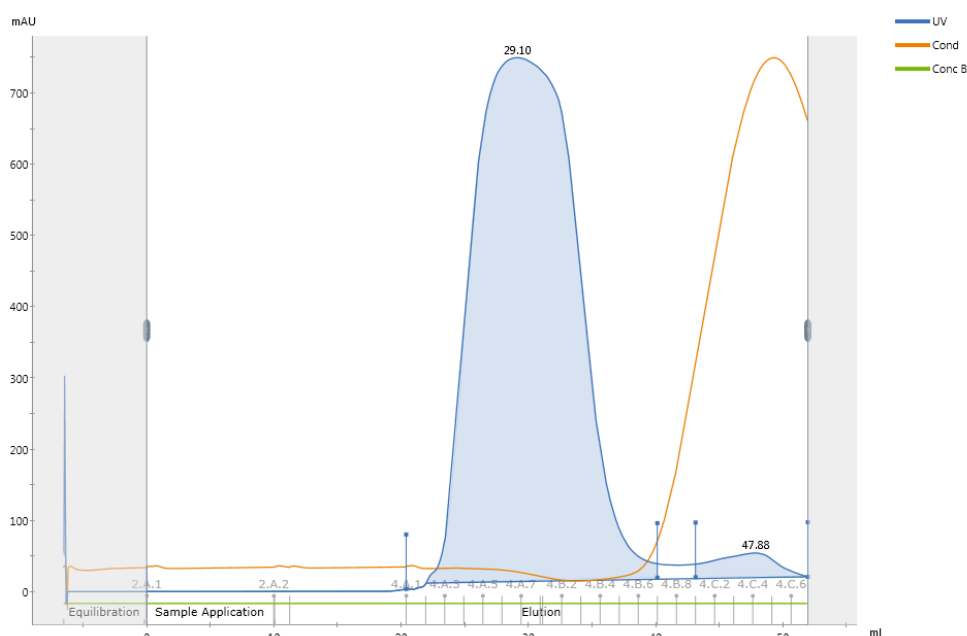


Figura 4.4. Cromatograma del desalting de la FSA con 20 mL de muestra. Se observa la aparición de un pico de señal de ultravioleta a los 21 mL que se corresponde con la FSA que sale de la columna y un segundo pico en la señal de conductividad que aparece a partir de los 40 mL y se corresponde con el tampón con elevada concentración de imidazol. El proceso se realizó con un caudal de 5 mL min^{-1} de tampón fosfato 50 mM a pH 8,0 y $25 \text{ }^\circ\text{C}$ en una columna de 127 mL.

Tras realizar varias pruebas de desalting variando el volumen de muestra añadido se determinó que 20 mL de muestra era el volumen máximo que se podía añadir para conseguir un rendimiento mayor al 99% en el proceso de desalting (Tabla 4.6.). Los 20 mL de muestra se corresponden aproximadamente con el 16% de volumen total de la columna y se observó que al aumentar el volumen de muestra que se añade a la columna, el pico de señal ultravioleta se solapa con el pico de señal de conductimetría (Figura 4.5.). Así al añadir 30 mL de muestra, que se corresponden con el 24% del volumen de la columna, se alcanzó un rendimiento en la purificación del 85% y al inyectar 40 mL, aproximadamente el 31% del volumen de la columna, se obtuvo un rendimiento del desalting del 65%. Por lo que si se quiere realizar un escalado del proceso

utilizando la misma resina se debe de mantener la proporción entre el volumen de muestra y volumen de la columna por debajo del 16% con la finalidad eliminar todo el imidazol de la muestra.

Tabla 4.6. Desalting utilizando una columna XK 16/20 empaquetada con 127 mL de sephadex G-10. Para realizar el desalting se hizo pasar tampón fosfato de sodio 50 mM a pH 8,0 con un caudal de 5 mL min⁻¹ a través de la columna.

Volumen de muestra (mL)	Unidades añadidas	Unidades recuperadas	Rendimiento del desalting (%)
40 mL	1204,0	780,2	64,8%
30 mL	903,0	764,8	84,7%
20 mL	602,0	596,6	99,1%

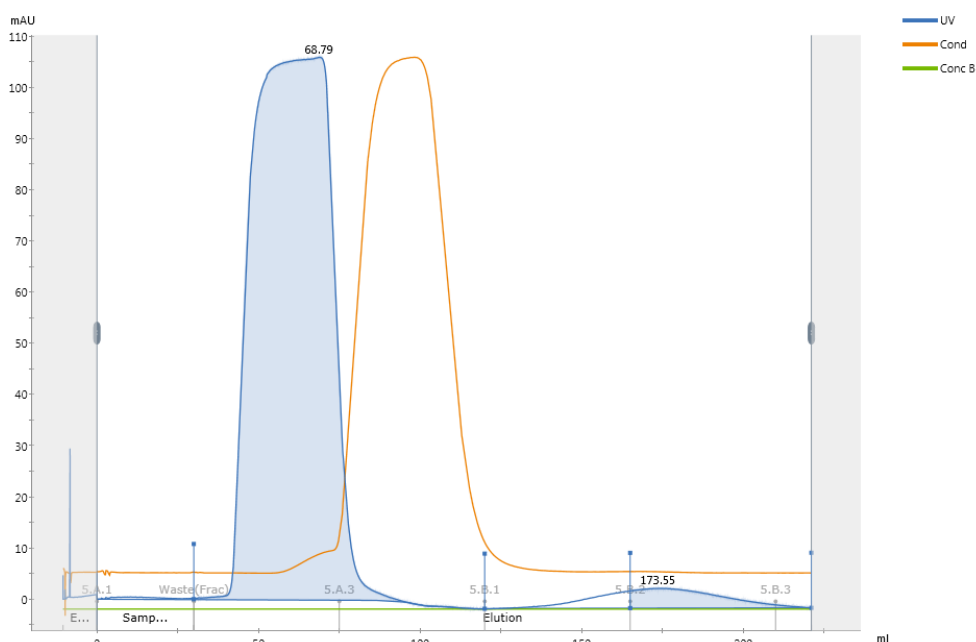


Figura 4.5. Cromatograma del desalting de la FSA con 30 mL de muestra. Se observa la aparición de un pico de señal de ultravioleta a los 42 mL que se corresponde con la FSA que sale de la columna y un segundo pico en la señal de conductividad que aparece a partir de los 74 mL y se corresponde con el tampón con elevada concentración de imidazol. El proceso se realizó con un caudal de 5 mL min⁻¹ de tampón fosfato 50 mM a pH 8,0 y 25 °C en una columna de 127 mL.

4.4. Consideraciones globales

El protocolo propuesto en este capítulo permitió producir más de 40000 unidades de FSA en el laboratorio en 17 horas de fermentación y se propuso una

purificación compuesta por una etapa de purificación por afinidad a través de las colas de histidina de la enzima y una etapa de desalting que permite eliminar el imidazol de los stocks de enzima pura. De esta forma en este capítulo se consiguió proponer un protocolo de producción y purificación de la FSA A129S que permitió obtener más de 38000 unidades de enzima pura, equivalentes a 2,6 g de FSA, para realizar el estudio de la inmovilización de esta enzima (Tabla 4.7.).

Al realizar el balance de la fermentación se determinó que la enzima tenía una actividad específica de 1021,7 U gDCW⁻¹ y un contenido de FSA de 72 mg gDCW⁻¹ como se puede ver en la tabla 4.1. A partir de estos datos se determinó una actividad específica de la enzima producida de 14,2 U mg⁻¹ de FSA, mientras que la actividad específica del lisado era de 1,9 U mg⁻¹ de proteína. Tras el proceso de purificación se determinó una actividad específica de 14,6 U de FSA mg⁻¹ en el stock de enzima pura, que coincide con la actividad específica deducida a partir de los datos obtenidos de la fermentación, por lo que se determinó numéricamente que la FSA había sido purificada con un elevado grado de pureza.

Tabla 4.7. Balance final teórico de la producción y purificación la FSA A129S. Para determinar el grado de pureza de la enzima se realizó el balance de la purificación tanto en actividad como en concentración de proteína y se determinó la actividad específica en cada caso.

	Actividad (U)	Rendimiento actividad (%)	Proteína (mg)	Rendimiento proteína (%)	Actividad específica (U mg ⁻¹)
Producción	42196,2	100	10077,2	100	4,2
Purificación por afinidad	39115,9	92,7	2660,9	26,4	14,7
Desalting	38778,3	91,9	2657,7	26,4	14,6

4.5. Conclusiones

Realizar la producción de la FSA A129S siguiendo una estrategia de un cultivo en discontinuo alimentado permitió conseguir con elevada densidad celular en el reactor al momento de realizar la inducción de la expresión de la enzima. El protocolo propuesto en este capítulo permitió producir más de 40000 unidades

de FSA en el laboratorio en 17 horas de fermentación. Sin embargo, este protocolo no ha sido optimizado ya que en esta fermentación solo se alcanzó una DO_{600nm} cercana a 137 cuando podría haberse alcanzado una DO_{600nm} de 250, pudiendo alcanzar una producción de aproximadamente 77000 U de FSA, equivalentes a 5,13 g de enzima. Sin embargo, en este capítulo no se optimizó la producción ya que el objetivo era producir enzima para estudiar el sistema multienzimático.

Esta metodología permitió producir un biocatalizador muy económico ya que se produjeron 42000 unidades de enzima y el costo global del proceso fue de 23,04 € (20,14 € de reactivos y 2,9 € de luz), por lo que el costo global del biocatalizador fue de 5,5 € por 10000 unidades de enzima (Tabla 4.8.). De esta forma la producción de la FSA en el laboratorio permitió reducir de forma indirecta los costes de la síntesis de pre-D-fagomina. Sin embargo, el proceso de purificación de la enzima aumento los costos del proceso, obteniendo 39000 unidades de enzima pura por 370,14 € al reutilizar la Ni-IDA-sefarosa 4 veces, lo que equivale a 95,5 € por 10000 unidades de FSA (Tabla 4.8.). Este valor puede disminuir al utilizar menos resina y reutilizarla más veces, ya que la Ni-IDA-sefarosa puede reutilizarse hasta en 10 purificaciones sin tener que regenerarla y volver a cargarla con níquel.

Esta misma metodología se puede aplicar para la producción de la CPO, pero no se abordó en esta tesis por falta de tiempo. Asumiendo que la CPO se clonase en el mismo sistema de expresión y se produjeran los mismos 2,6 g de enzima que se obtienen al producir la FSA, se puede estimar el valor del biocatalizador utilizando la actividad específica de la CPO comercial de Sigma-Aldrich (1400 U mg^{-1}). Siguiendo el mismo protocolo se producirían aproximadamente 4 millones de unidades de CPO por los mismos 23,04 €, lo que equivale a 0,06 € por 10000 unidades. Si incluimos en el precio el mismo protocolo de purificación se recuperarían en torno a 3600000 unidades de CPO por 370,14 €, por lo que 10000 unidades de enzima pura costarían 1,02 € (Tabla 4.8.). Así comparando la estimación del costo de producción de la CPO en el laboratorio con el costo de la CPO comercial se observa que la enzima comercial es 360 veces más cara, ya que por el mismo precio se venden únicamente 10000 U de CPO pura.

Tabla 4.8. Balance económico de la producción y purificación de la FSA. Balance económico de la producción y purificación de la FSA.

		Actividad (U)	Precio (€)	Precio biocatalizador (€ 10000 U ⁻¹)
FSA	Producción	42196,2	23,04	5,5
	Purificación	38778,3	370,14	95,5
CPO	Producción	3938312	23,04	0,06
	Purificación	3619308	370,14	1,02

La cola de histidinas de la FSA producida en el laboratorio permitió diseñar un proceso de purificación e inmovilización mediante interacciones de afinidad en resinas de metal quelado que aislaba rápidamente la enzima del lisado con un elevado grado de pureza. Este proceso presentó una doble funcionalidad ya que posibilitaba la aplicación directa de la enzima inmovilizada en la reacción y permitía recuperar la enzima purificada desde el soporte mediante la adición de imidazol al medio. Debido a ello se procedió a empaquetar una columna de FPLC con resina de metal quelado y se propuso un protocolo de purificación de la FSA que permitió recuperar el 93% de la enzima con elevado grado de pureza.

5. Inmovilización de la CPO y la FSA

5.1. Introducción

La inmovilización de las enzimas ya sea por métodos físico o métodos químicos, posibilita la recuperación y reutilización de los biocatalizadores, además de que puede modificar tanto a su estabilidad como a su actividad (Mateo et al. 2007). Las inmovilizaciones se caracterizan mediante tres parámetros que determinan la viabilidad del proceso. El rendimiento de inmovilización es el porcentaje de enzima ofrecida que se inmoviliza en el soporte. La actividad retenida es el porcentaje de actividad ofrecida que se mide en el derivado inmovilizado. Y la eficiencia de inmovilización es el porcentaje enzima inmovilizada que permanece activa tras la inmovilización y expresa como afecta el proceso de inmovilización a la actividad de la enzima.

Las características físicas y químicas del soporte también condicionan el proceso de inmovilización y por ello antes de inmovilizar una enzima hay que determinar la naturaleza química del soporte, los grupos funcionales que posee en su superficie, el tamaño de poro de la partícula, la carga máxima de proteína que acepta, el pKa de los grupos funcionales del soporte, entre otros parámetros (Sirisha et al. 2016).

5.1.1. Nanopartículas

Las principales ventajas de realizar la inmovilización de una enzima en nanopartículas son la elevada superficie específica del soporte, que poseen bajos problemas de transferencia de materia, tienen buena resistencia mecánica, presentan menores problemas difusionales que las macropartículas y al dispersarlas en medios acuosos presentan un movimiento Browniano, lo que le aporta al derivado inmovilizado un comportamiento similar al de la enzima soluble (Ahmad and Sardar 2015). Un caso especial de nanopartículas son las nanopartículas magnéticas ya que posibilitan que el biocatalizador se recupere mediante la aplicación de un campo magnético, evitando así los procesos de centrifugación necesarios para separar las nanopartículas del medio de reacción. Existen varios ejemplos de enzimas que se han inmovilizado en nanopartículas magnéticas para obtener diferentes biocatalizadores utilizados en reacciones de

síntesis (Huang, Liao, and Chen 2003; Jia, Zhu, and Wang 2003; Johnson et al. 2008; Prakasham et al. 2007).

La fuerza magnética que actúa sobre las nanopartículas en un gradiente de campo magnético generalmente es demasiado débil como para separar las nanopartículas del medio de reacción debido al pequeño tamaño de estas. Con el objetivo de lograr una separación magnética efectiva del derivado inmovilizado, las nanopartículas magnéticas se pueden ensamblar en nanoclústers magnéticos de mayor tamaño (Kralj and Makovec 2015). Los nanoclústers magnéticos (mNC) se obtienen mediante el autoensamblaje de las nanopartículas de maghemita primarias, seguido por el recubrimiento del clúster magnético con una capa de silica (mNC-Si). Para permitir la inmovilización de las enzimas, los mNC-Si se funcionalizan con diferentes grupos químicos en su superficie.

5.1.2. Macropartículas

Un soporte es por definición un sólido insoluble sobre el cual se puede inmovilizar una enzima. Existen soportes de distinta naturaleza, desde polímeros orgánicos naturales como el Agar (Kikani, Pandey, and Singh 2013), el quitosano (Urrutia et al. 2014) o el alginato (Yao et al. 2014), hasta polímeros sintéticos como el Eupergit (Boller et al. 2002). La naturaleza de la matriz del soporte juega un papel muy importante en el proceso de inmovilización, así matrices hidrofóbicas como el Eupergit resultan ser buenos soportes para lipasas u otras enzimas estables en medios orgánicos (Knezevic et al. 2006). Por otro lado los soportes hidrófilos como los derivados de la agarosa suelen ser buenos soportes para la mayor parte de las enzimas (Guisán 1988).

La selección del soporte adecuado también debe enfocarse en los grupos funcionales presentes en la superficie del soporte ya que estos grupos serán los que condicionen el tipo de interacción que se establezca entre la enzima y el soporte. Así, dentro de los soportes derivados de la agarosa encontramos la MANA-agarosa que posee grupos amino en la superficie, la glioxal-agarosa que

posee grupos aldehído o la Co-IDA-sefarosa que tiene grupos iminodiacéticos unidos a un átomo divalente de cobalto.

5.1.2.1. Soportes derivados de la agarosa

La mayor parte de las enzimas suelen ser inestables en medios hidrofóbicos ya que en la naturaleza se encuentran en los medios acuosos del interior de las células. Estos medios acuosos favorecen las interacciones débiles que mantienen estable la estructura terciaria y/o cuaternaria de las enzimas, las cuales son esenciales para que la enzima mantenga su actividad catalítica.

La agarosa es una matriz polisacáridica inerte de naturaleza hidrófila que presenta elevada porosidad en su estructura, lo cual le aporta grandes propiedades como soporte para la inmovilización de enzimas. Los derivados de la agarosa son soportes muy versátiles y ampliamente utilizados en la inmovilización de enzimas (Zucca, Fernandez-Lafuente, and Sanjust 2016). Así, según el tamaño y las características de la enzima se puede elegir entre distintas variedades de agarosa con varios grados de entrecruzamiento, lo cual condiciona el tamaño de poro de la partícula. Además de ello existen protocolos estandarizados para la modificación de la agarosa añadiéndole distintos grupos funcionales en la superficie. Los derivados de la agarosa empleados en esta tesis son:

- Glioxal-agarosa

La glioxal-agarosa es un derivado obtenido tras la adición del glicidol en la superficie del soporte y su posterior oxidación con periodato sódico, tal y como se explica en materiales y métodos (Guisán 1988). La inmovilización en este soporte ocurre al formarse bases de Schiff entre el aldehído de la superficie del soporte y los grupos amino de la superficie de la enzima. Las bases de Schiff son inestables por lo que es necesario reducirlas para formar enlaces C-N mucho más estables como se ve en la figura 5.1. Esta reducción puede realizarse con un agente reductor fuerte como el borohidruro sódico que reduce las bases de Schiff y los grupos aldehído libres del soporte o con un agente reductor suave

como cianoborohidruro sódico que reduce las bases de Schiff a medida que se van formando, pero no a los grupos aldehído libres del soporte.

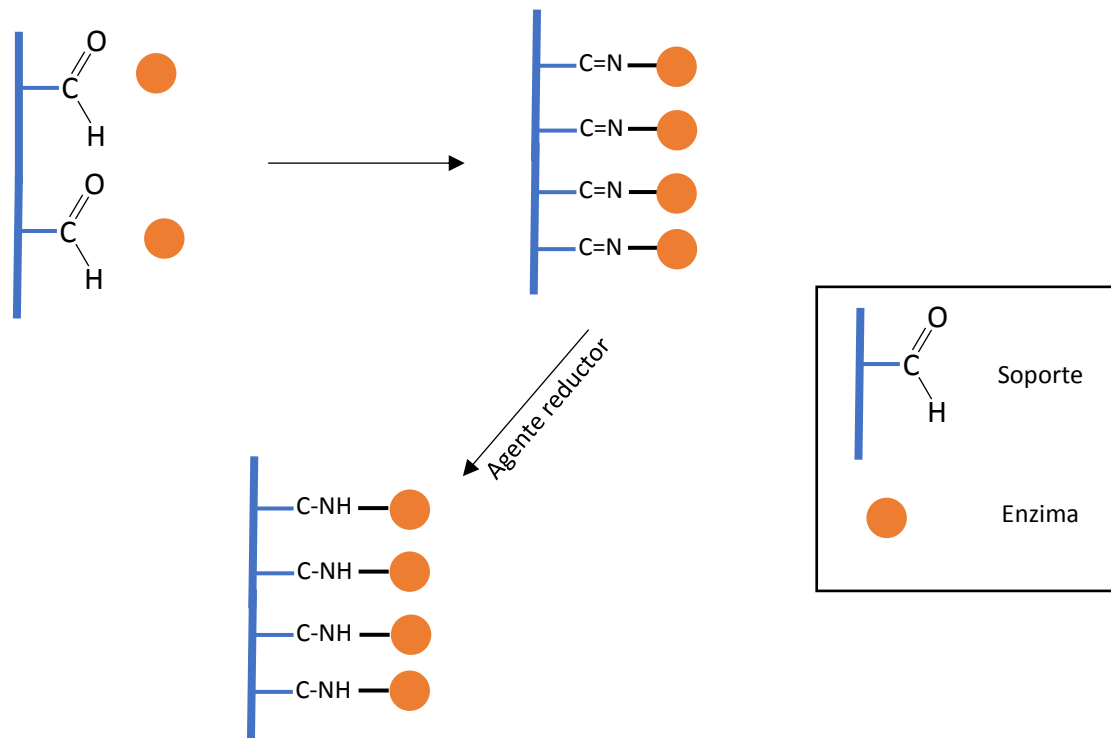


Figura 5.1. Esquema de la inmovilización de enzimas en glioxal-agarosa. En una primera fase reaccionan los grupos aldehído del soporte con grupos amino de la enzima formando bases de Schiff, posteriormente se añadió un agente reductor con la finalidad de transformar la base de Schiff en una amina secundaria mucho más estable.

- MANA-agarosa

La MANA-agarosa es agarosa funcionalizada mediante la aminación reductora de la glioxal-agarosa con etilendiamina y borohidruro sódico. La inmovilización en MANA-agarosa se realiza mediante la adsorción iónica la enzima en la superficie del soporte. Adicionalmente se pueden formar enlaces covalentes entre los grupos amino del soporte y los grupos carboxilo de la superficie de la enzima mediante la adición de carbodiimida (EDAC) al medio (Figura 5.2.).

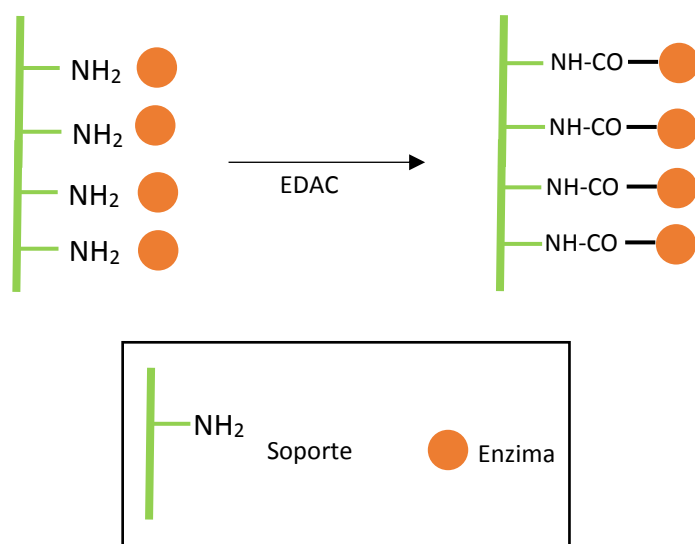


Figura 5.2. Esquema de la inmovilización de enzimas en MANA-agarosa. En una primera fase se produce la inmovilización por adsorción iónica y posteriormente se añade EDAC para formar enlaces covalentes entre los grupos amino del soporte y los grupos carboxilo de la enzima.

La carbodiimida es un compuesto que se une a los grupos carboxílicos activándolos y haciéndolos más susceptibles al ataque nucleofílico por parte de los grupos amino del soporte. En el grupo existe experiencia inmovilizando enzimas en este soporte y entre estos trabajos ya se ha descrito la inmovilización de la CPO en MANA-agarosa (Pešić, et al. 2012). Este soporte ha sido empleado en la inmovilización de gran variedad de enzimas, entre ellas podemos encontrar a la ciclohexanona monooxigenasa (Valencia et al. 2018), algunas lipasas (Ferreira et al. 2018; Pereira et al. 2017), la β -galactosidasa (Zaak et al. 2017), β -xilosidasas (Terrasan et al. 2017) y alguna proteasa (Bavaro et al. 2016).

- Co-IDA-sefarosa

La Co-IDA-sefarosa es un soporte, como se describe en materiales y métodos, obtenido al cargar la sefarosa funcionalizada con grupos iminodiacético (IDA) con cationes divalentes de cobalto. Este soporte permite la inmovilización de enzimas que posean colas de histidina en su estructura debido a que estas poseen elevada afinidad por este tipo de soportes ya que forman un compuesto de coordinación con el catión divalente de la resina (Figura 5.3.). Esta interacción no es una unión covalente, pero este derivado puede ser reutilizado

en ciclos de reacción ya que la enzima no se separa del derivado mientras no se añadan elevadas concentraciones de imidazol al medio.

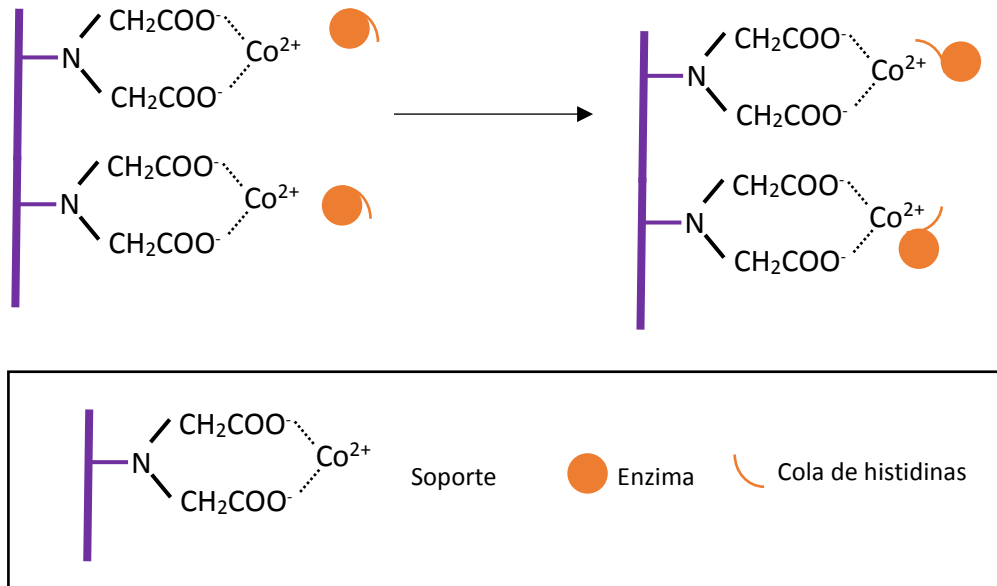


Figura 5.3. Esquema de la inmovilización de enzimas con cola de histidinas en Co-IDA-sefarosa. La inmovilización se realiza debido a la elevada afinidad que tiene la cola de histidinas por el catión divalente de la resina.

Existen diversos artículos publicados sobre la purificación e inmovilización de enzimas en este soporte (Ardao et al. 2006; Valencia et al. 2018). La principal ventaja de este soporte es que, debido a la elevada especificidad de la unión entre la resina de metal quelado y la cola de histidinas, este método permite realizar simultáneamente la purificación e inmovilización de la enzima desde un lisado celular, lo cual mejora las métricas del proceso y la calidad del biocatalizador obtenido.

5.1.2.2. Eupergit CM

El Eupergit CM es un soporte comercial de carácter hidrofóbico fabricado sintéticamente a partir de la acrilamida que se comercializó hasta 2017 (Boller et al. 2002). Este soporte posee como grupo funcional en su superficie un anillo de oxirano, el cual puede formar un enlace covalente al reaccionar con los grupos amino, sulfidriilo e hidroxilo de la superficie de la enzima (Figura 5.4.). La

inmovilización en Eupergit CM consta de dos fases, una primera de adsorción hidrofóbica, por lo que se requiere una elevada fuerza iónica en el medio, y la apertura del anillo oxirano por los grupos nucleófilos de la enzima. La apertura de este anillo puede ocurrir tanto en pH básico, preferentemente por grupos amino, como en pH ácido, por grupos tiol e hidroxilo.

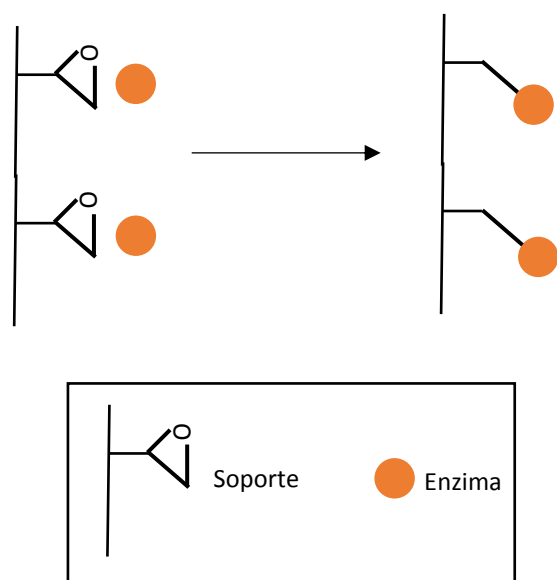


Figura 5.4. Esquema de la inmovilización de enzimas en Eupergit. La inmovilización se realiza en dos fases primero se realiza la adsorción de la enzima en la superficie del soporte por interacciones hidrófobas y posteriormente se forma el enlace covalente mediante el ataque nucleofílico de los grupos reactivos de la enzima a los grupos epóxido del soporte.

Finalmente, es necesario bloquear los grupos oxirano que no hayan reaccionado con la enzima, para ello se incubaba el derivado con compuestos aminados como la metilamina o la glicina o con tioles como el β -mercaptoetanol (Mateo et al. 2000). Este soporte ha sido utilizado para aumentar la estabilidad de la ureasa (Bortone, Fidaleo, and Moresi 2012), la lacasa (Lloret et al. 2012), la lipasa de *Candida rugosa* (Knezevic et al. 2006), la treonina aldolasa (Tibhe et al. 2013), la β -galactosidasa (Tibhe et al. 2013) y la fenilalanina deshidrogenasa entre otras (Ahmad, Low, and Abd Shukor 2013).

5.1.3. Inmovilización de la CPO y la FSA

El sistema multienzimático propuesto para la síntesis de pre-D-fagomina está compuesto por la oxidación del β -OH a β -CHO por parte de la CPO y la adición de la DHA al β -CHO previamente formado, catalizada por la FSA. Este sistema ha sido estudiado previamente en el grupo y presenta diversos problemas, entre ellos la acumulación de productos intermedios, la presencia de reacción secundarias y la desactivación de las enzimas durante la reacción (Masdeu 2017).

La inmovilización de la CPO y la FSA se presenta como una alternativa para solventar los problemas de este sistema. Por un lado, la inmovilización de las enzimas puede mejorar la estabilidad de los biocatalizadores en condiciones de reacción y por otro lado la posibilidad de co-inmovilizar ambas enzimas en un mismo soporte podría reducir la acumulación de productos intermedios y la presencia de reacciones secundarias ya que la cercanía en el espacio físico del centro activo de ambas enzimas disminuiría los problemas de difusión del sustrato a través del soporte. Además de ello la inmovilización de las enzimas permite trabajar con distintas configuraciones de reactor.

5.1.3.1. Inmovilización de la FSA

El estudio de la inmovilización de la FSA ha sido abordado únicamente en dos trabajos publicados en la literatura. Un trabajo abordó la inmovilización de la FSA mediante su encapsulación en un soporte de doble capa de hidróxido Mg_2Al-NO_3 (LDH), alcanzando un rendimiento de inmovilización del 90%. Este derivado inmovilizado se reutilizó en ciclos de condensación de la hidroxiacetona y el formaldehído y tras cuatro ciclos de reacción mantuvo el 87% de su actividad inicial. Por su parte la conversión de sustrato en la primera reacción fue de un 70% y en el último ciclo alcanzó una conversión de un 61% (Guérard-Hélaine et al. 2011).

La otra inmovilización publicada es una modificación de este método por encapsulación de la FSA inmovilizada en LDH en diferentes polisacáridos,

alcanzando una actividad retenida máxima del 40% en el derivado encapsulado en carragenanos. Este biocatalizador se reutilizó en ciclos de adición de la hidroxiacetona al formaldehído, manteniendo un 80% de la actividad inicial tras el cuarto ciclo de reacción. La conversión de sustrato en el primer ciclo fue de un 60% y bajó hasta un 50% en el segundo, tercer y cuarto ciclo de reacción (Mahdi et al. 2015). Además la FSA ha sido purificada por afinidad utilizando resinas de metal quelado por lo que este es otro posible método a estudiar para realizar la inmovilización de la FSA, gracias a que la enzima recombinante se expresa con una cola de histidinas en su extremo C-terminal.

5.1.3.2. Inmovilización de la CPO

La inmovilización de la CPO ha sido ampliamente estudiada en la bibliografía con la finalidad de utilizar los derivados en reacciones de halogenación de sustratos o en reacciones de oxidación en presencia de peróxidos. La CPO se ha inmovilizado por atrapamiento en matrices de distintos polisacáridos en presencia de nanopartículas magnéticas mediante la preparación de una nanoemulsión compuesta por enzima, núcleos magnéticos y polisacáridos. Este derivado pudo reutilizarse en hasta 25 ciclos de reacción (García-Embid et al. 2018). A su vez la CPO también pudo inmovilizarse en soportes poliméricos derivados del hidroxipropilmetacrilato (HPMA) mediante unión covalente. La inmovilización se realizó mediante la adición de una solución de CPO a un caudal de 20 mL h⁻¹ sobre una solución del soporte polimérico a 15 °C y pH 7,5 y la mezcla se mantuvo en agitación durante 18 h. Varios derivados inmovilizados se obtuvieron en este proceso según el polímero empleado en el proceso, alcanzando una actividad retenida máxima del 83% al utilizar un copolímero con polietilenglicol (Bayramoglu et al. 2011). Finalmente la CPO también ha sido inmovilizada en diferentes nanoclústers magnéticos (Masdeu et al. 2018). En nuestro grupo se publicó la inmovilización covalente de la CPO en el soporte MANA-agarosa en tapón fosfato de sodio 10 mM a pH 5,0. Para esta inmovilización se utilizó una concentración de EDAC 25 mM y se alcanzó una actividad retenida del 50% al inmovilizar mediante los grupos carboxilo de la superficie de la enzima (Pešić et al. 2012).

5.1.3.3. Co-inmovilización de la CPO y la FSA

El sistema multienzimático propuesto para realizar la síntesis de la pre-D-fagomina presenta varias limitaciones al operar con las enzimas solubles. La FSA se desactiva rápidamente en presencia de *t*-BuOOH y CPO por lo que el β -CHO se acumula en el medio al desactivarse la aldolasa. Además de ello la CPO oxida nuevamente el β -CHO formando como producto secundario β -COOH. Para solventar estos problemas se propuso co-inmovilizar ambas enzimas en un mismo soporte con la finalidad de aumentar la eficiencia del sistema ya que el sustrato de la segunda reacción se produce in situ, reduciendo así los problemas difusionales del sustrato a través del derivado y reduciendo la aparición de productos secundarios de la reacción (Betancor and Luckarift 2013). Además, la co-inmovilización de las enzimas puede aumentar la estabilidad del biocatalizador en condiciones de reacción. Este trabajo abordó el estudio de la co-inmovilización de la FSA y la CPO debido a que no existe un derivado co-inmovilizado de estas enzimas descrito en la literatura.

5.2. Objetivos

El objetivo del capítulo es encontrar las condiciones de inmovilización de compromiso de ambas enzimas que permitan realizar la co-inmovilización en un mismo soporte.

5.3. Resultados y discusión

5.3.1. Inmovilización de la FSA

5.3.1.1. Inmovilización en nanopartículas

El compañero de laboratorio Gerard Masdeu realizó el estudio del rendimiento de inmovilización de la FSA en distintos nanoclústers magnéticos (mNC) preparados por el Dr. Stane Pajk en la compañía Nanos SCI (Tabla 5.1.). Los mNC funcionalizados con polietilenglicol (mNC-PEG) y con grupos alquinos (mNC-C \equiv CH) pueden formar puentes de hidrogeno con los grupos hidroxilo de

la superficie de la enzima. Los mNC que poseen grupos tiol en su superficie (mNC-SH) pueden reaccionar con los grupos tiol de las cisteínas de la enzima formando puentes disulfuro. Los mNC funcionalizados con grupos amino (mNC-NH₂) fueron diseñados para reaccionar con los grupos carboxilo de los ácidos aspártico y glutámico de la superficie de la enzima y los funcionalizados con grupos carboxilo (mNC-COOH) y aldehído (mNC-CHO) para reaccionar con los grupos amino de las lisinas y las argininas en la superficie de la enzima.

Los nanoclústers funcionalizados con EDTA (mNC-EDTA) se prepararon para realizar la inmovilización de la FSA a través de la cola de histidina que posee en su extremo C-terminal, sin conseguir buenos rendimientos.

En el caso de los mNC-N₃, no se determinó cuál era el grupo funcional de la FSA que reaccionaba con los mNC, pero la enzima se desorbía al añadir NaCl al medio, por lo que se supuso que la unión era una interacción electrostática impulsada por la carga positiva de la azida. El CuBr se agregó a la inmovilización en mNC-N₃ con el objetivo de inmovilizar la FSA mediante la reacción de "adición de Huisgen", utilizada con frecuencia para la bioconjugación de moléculas. Esta reacción se basa en la adición de azidas a cadenas insaturadas de hidrocarburos catalizada por sales de cobre (I) (Tron et al. 2008).

El rendimiento de inmovilización de estos derivados fue calculado mediante la determinación de la concentración de proteína en el sobrenadante tras la inmovilización utilizando el método de Bradford ya que la cantidad de FSA añadida a la inmovilización (0,02 U mL⁻¹) era demasiado baja como para medirla mediante el ensayo de actividad. El estudio (Tabla 5.1.) demostró que la FSA se inmovilizaba con altos rendimientos de inmovilización por adsorción en superficie en los mNC-Si, mNC-COOH y mNC-N₃ a pH 5,0, pero al realizar estas mismas inmovilizaciones a pH 8,0 los rendimientos cayeron por debajo del 20%. Por otro lado, la FSA se inmovilizó en mNC-NH₂, mNC-CHO y mNC-N₃ (+ CuBr) con elevados rendimientos de inmovilización tanto a pH 5,0 como a pH 8,0. Y finalmente se observó que la FSA se inmovilizaba con muy bajos rendimientos en los mNC-PEG, mNC-SH y mNC-C≡CH, por lo que se descartaron estos clústers para realizar la inmovilización. Los distintos derivados inmovilizados se

incubaron con NaCl 1 M para comprobar que todas la inmobilizaciones se realizaron mediante adsorción de la FSA en la superficie de los mNC.

Tabla 5.1. Estudio de la inmobilización de la FSA en mNC funcionalizados con diferentes grupos en su superficie. Condiciones de inmobilización: 0,5 mg mNC y 0,02 U FSA en tampón fosfato 10 mM en un volumen total de 1 mL a 25 °C. La actividad retenida se determinó mediante Bradford. La desviación estándar se calculó a partir de 4 réplicas en cada caso para el rendimiento de inmobilización. La actividad retenida se calculó para los derivados que tenían un rendimiento de inmobilización mayor al 50% utilizando test de actividad en HPLC puesto a punto en esta tesis. A los derivados N₃ (+CuBr) no se midió su actividad ya que el CuBr interfiere en el test. La desviación estándar de la actividad retenida se calculó a partir de 2 réplicas en cada caso. n.d. no fueron determinadas. El rendimiento de inmobilización (en gris) fue determinado por Gerard Masdeu y la actividad retenida (en blanco) fue determinada en esta tesis.

Grupo funcional	Rendimiento de inmobilización ± D.E (%)		Actividad retenida ± D.E. (%)	
	pH 5,0	pH 8,0	pH 5,0	pH 8,0
mNC				
Si	77,5 ± 7,6	20,5 ± 14,6	59,5 ± 5,6	n.d.
PEG	15,8 ± 19,3	6,1 ± 10,0	n.d.	n.d.
NH ₂	>99 ± 19,5	>99 ± 15,8	61,9 ± 12,8	21,9 ± 3,9
COOH	>99 ± 11,3	9,8 ± 15,1	2,1 ± 2,4	n.d.
CHO	>99 ± 17,1	67,2 ± 5,6	60,0 ± 14,3	9,8 ± 2,8
N ₃	88,8 ± 11,4	6,5 ± 8,3	94,0 ± 20,8	n.d.
N ₃ (+CuBr)	97,3 ± 13,1	90,8 ± 9,2	n.d.	n.d.
SH	<1 ± 5,2	<1 ± 2,8	n.d.	n.d.
C≡CH	26,1 ± 5,9	<1 ± 6,1	n.d.	n.d.

La actividad de los nueve derivados con rendimientos de inmobilización superiores al 50% se analizó utilizando el test de formación de pre-D-fagomina medido por HPLC propuesto para este trabajo (Tabla 5.1.). La actividad de los derivados mNC-N₃ (+ CuBr) inmobilizados a pH 5,0 y pH 8,0 no se pudo determinar, ya que el CuBr interfiere en el análisis de HPLC, incluso después de lavar el derivado con tampón. El estudio de la actividad retenida demostró que los derivados inmobilizados en mNC-Si, mNC-NH₂, mNC-CHO y mNC-N₃ a pH 5,0 poseían una actividad retenida por encima del 50%, reduciendo así los candidatos a cuatro derivados.

Tras realizar el estudio de la inmobilización por afinidad de la FSA en mNC se procedió a seleccionar uno de los cuatro derivados con actividad retenida por encima del 50% para realizar la inmobilización por enlaces covalentes. De los

cuatro candidatos seleccionados solo los mNC-CHO y mNC-NH₂ eran suficientemente reactivos como para formar enlaces covalentes con la enzima. Finalmente se seleccionó el mNC-NH₂ para realizar la unión covalente ya que los mNC-CHO poseían muy baja estabilidad y se agregaban durante su almacenaje. Para realizar la unión covalente entre los grupos amino de los mNC y los grupos carboxilo de la superficie de la FSA, se incubaron los derivados con diferentes concentraciones de EDAC durante 3 h a pH 5,0 (Figura 5.5.). La actividad de los derivados se midió antes y después de realizar el lavado de los mNC con tampón de inmovilización para seleccionar la concentración óptima de EDAC. La diferencia entre la actividad de los derivados antes de realizar el lavado y después del lavado permite estimar la cantidad de enzima que se desorbe del soporte al incubar los derivados con distintas concentraciones de EDAC y por lo tanto estimar la cantidad de enzima que se une covalentemente.

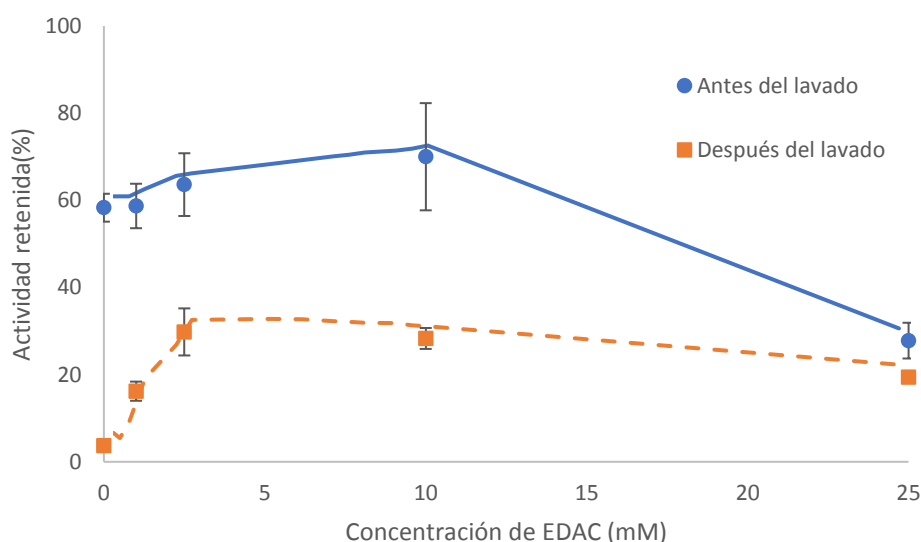


Figura 5.5. Desorción de la FSA tras lavar los derivados inmovilizados con tampón después de 3 h de incubación con distintas concentraciones de EDAC. La actividad de la FSA se calculó mediante el test de producción de pre-D-fagomina propuesto para este estudio. La actividad se determinó antes y después del lavado de las nanopartículas con la finalidad de observar la desorción de la FSA que no se ha unido covalentemente al soporte. No se añadió NaCl. La desviación estándar se calculó a partir de 2 réplicas en cada caso.

Se observó que el valor máximo de actividad retenida después del lavado de las nanopartículas se alcanzaba al utilizar una concentración de EDAC entre 2,5 y 10 mM. Una concentración de EDAC menor no fue suficiente para lograr la formación del enlace covalente y por ello al lavar con tampón se midió menos

actividad. Al trabajar con mayores concentraciones de EDAC los valores de actividad retenida tras el lavado son similares a los del intervalo óptimo, pero se observa en las muestras prelavado que la enzima soluble se desactiva en estas condiciones. Finalmente se seleccionó la concentración de EDAC 5 mM como la concentración óptima para trabajar en esta inmovilización.

El derivado inmovilizado final obtenido mediante la unión covalente con los mNC-NH₂ presentó una actividad retenida superior al 29%, la cual fue menor a la de los cuatro derivados obtenidos mediante la inmovilización por interacciones electrostáticas, pero la unión covalente permite la recuperación de la enzima mediante campos magnéticos, evitando así la pérdida de enzima que ocurre con los otros derivados en condiciones de reacción (datos no mostrados). Esta ventaja permite que este biocatalizador sea el único candidato inmovilizado en nanopartículas capaz de reutilizarse en los ciclos de adición aldólica.

5.3.1.2. Inmovilización en macropartículas

Tras el estudio de la inmovilización de la FSA en mNC se procedió a realizar el estudio de la inmovilización en macropartículas. Para este estudio se utilizaron la agarosa funcionalizada con diferentes grupos en su superficie y el Eupergit CM, por lo que se pudieron estudiar diferentes métodos de inmovilización (Tabla 5.2.).

Tabla 5.2. Métodos de inmovilización que se estudiarán para realizar la inmovilización de la FSA en distintos soportes de macropartículas. Se ofrecieron 8 unidades de FSA para la inmovilización en Co-IDA-sefarosa y 4 U de FSA para el resto de los derivados ya que a esta carga no se observaron limitaciones difusionales.

Soporte	Medio de inmovilización	Método	
Co-IDA-sefarosa	Fosfato sódico 50 mM pH 8,0, NaCl 0,3 M, imidazol 20 mM	Afinidad	
MANA-agarosa	Fosfato sódico 10 mM pH 6,0	EDAC 5 mM	Covalente
		EDAC 15 mM	Covalente
		EDAC 25 mM	Covalente
Glioxal-agarosa	Bicarbonato 50 mM pH 10, 0, 1 mg mL ⁻¹ NaBH ₄	Covalente	
Eupergit CM	Fosfato sódico 0,1 M pH 6,0, NaCl 0,25 mM	Covalente	

La inmovilización de la FSA en macropartículas se realizó mediante la incubación de la enzima y el soporte en unas condiciones adecuadas para cada uno de métodos de inmovilización. Finalmente se caracterizó la inmovilización representando la evolución de la actividad de la FSA en el sobrenadante, en la suspensión y en el blanco durante el proceso y se determinaron el rendimiento de inmovilización y la actividad retenida para cada derivado (Valencia et al. 2018).

5.3.1.2.1. Inmovilización en Co-IDA-sefarosa

La FSAA129S se expresó como una proteína de fusión con una cola de histidina con el objetivo de purificar e inmovilizar esta enzima mediante métodos de afinidad. El soporte de Co-IDA-sefarosa es una resina que presenta alta afinidad por las proteínas fusionadas con colas de histidina, por lo que este soporte es un excelente candidato para realizar la inmovilización de este biocatalizador.

Para abordar el estudio de la inmovilización se procedió a realizar varias pruebas en las que se fue aumentando la cantidad de unidades ofrecidas a un mililitro de soporte. Así se observó que al ofrecer al mililitro de soporte cantidades menores a 10 unidades de FSA, la actividad retenida del derivado final era directamente proporcional a las unidades ofrecidas en la inmovilización. Sin embargo, al ofrecer mayor cantidad de enzima esta relación no se conserva por la presencia de limitaciones difusionales en el derivado. En base a ello se decidió caracterizar la inmovilización ofreciendo 8 U de FSA mL⁻¹ de soporte. La FSA se unió a la resina con un rendimiento de inmovilización mayor al 99% y con una actividad retenida del 94% en un tiempo de inmovilización de treinta minutos como se ve en la figura 5.6.

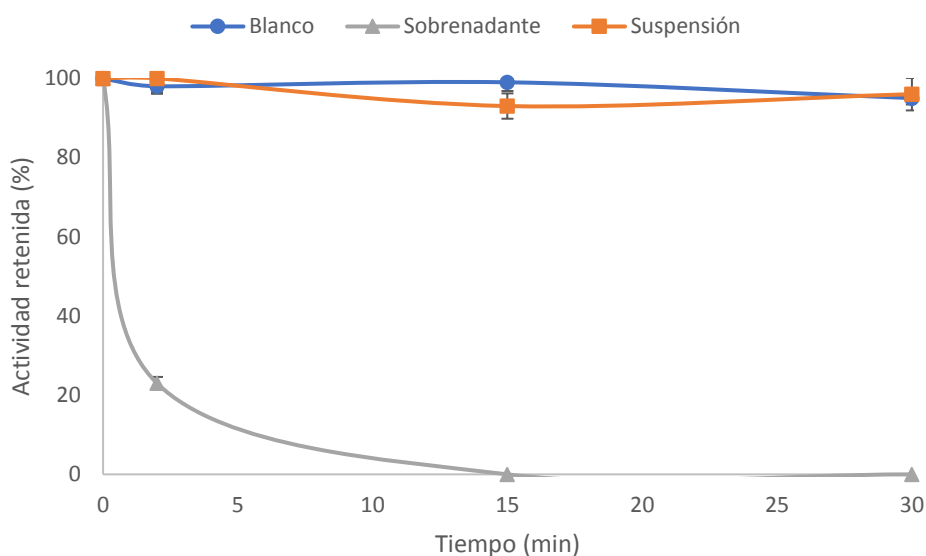


Figura 5.6. Curso de la inmovilización de la FSA en Co-IDA-sefarosa. La inmovilización se llevó a cabo en tampón fosfato de sodio 50 mM a pH 8,0 en presencia de NaCl 300 mM e imidazol 20 mM a 25 °C ofreciendo 8 U mL⁻¹ de soporte. La desviación estándar se calculó a partir de 2 réplicas en cada caso.

La concentración de enzima ofrecida fue aumentando hasta que se detectó la presencia de enzima en el sobrenadante tras la inmovilización, ya que el soporte no podía asimilar más mg de FSA. La carga máxima se determinó mediante la diferencia entre la concentración de FSA ofrecida al soporte y la concentración de FSA que se midió en el sobrenadante tras la inmovilización y la actividad retenida determinada a baja carga. Así la carga máxima determinada para la Co-IDA-sefarosa fue de 466,7 U mL⁻¹ de soporte. La actividad de este derivado determinada con el ensayo de actividad de la FSA fue de 7,4 U mL⁻¹ debido a las limitaciones difusionales.

El biocatalizador obtenido tras la inmovilización de la FSA en el soporte Co-IDA-sefarosa demostró ser un excelente candidato para catalizar los ciclos de reacción aldólica debido a su elevado rendimiento de la inmovilización y a su elevada actividad retenida tras la inmovilización. En este proceso no se formó un enlace covalente entre la enzima y el soporte, pero la interacción resultó ser lo suficientemente fuerte ya que solo se liberó al medio en presencia de concentraciones de imidazol superiores a 300 mM.

5.3.1.2.2. Inmovilización en MANA-agarosa

La inmovilización en MANA-agarosa se realiza en dos fases, una primera de adsorción iónica y una segunda en la cual se promueve la formación de enlaces covalentes entre la FSA y la resina mediante la adición de EDAC al medio. La adsorción iónica de la enzima requiere de dos condiciones, baja fuerza iónica en el medio y trabajar en un intervalo de pH entre el punto isoeléctrico de la enzima y el pKa del grupo amino del soporte que es 6,8 (Fernandez-Lafuente et al. 1993). Al trabajar en este intervalo de pH se produce la adsorción iónica ya que la enzima tiene carga neta negativa y el soporte carga positiva. La FSA tiene un punto isoeléctrico de 5,9 por lo que la inmovilización se realizó en tampón fosfato de sodio 10 mM a pH 6,0. De la misma manera que en el soporte Co-IDA-sefarosa, se procedió a realizar varias inmovilizaciones aumentando la cantidad de unidades ofrecidas a un mililitro de soporte y se observó que a partir de 6 U mL⁻¹ se detectaron limitaciones difusionales al medir la actividad del derivado ya que al aumentar la actividad ofrecida al soporte la actividad retenida no aumentaba de forma proporcional. Debido a ello la inmovilización se caracterizó ofreciendo 4 U de FSA por mL de soporte. La adsorción iónica de la FSA en MANA-agarosa se produjo rápidamente ya que tras 15 minutos de inmovilización no se detectó actividad en el sobrenadante y al finalizar esta etapa la actividad retenida medida en el derivado fue de más del 98% (Tabla 5.3.).

El EDAC es un compuesto que presenta en su estructura un grupo carbodiimida (R-N=C=N-R), el cual interactúa con los grupos carboxilo de la enzima activándolos y haciéndolos sensibles al ataque nucleofílico de los grupos aminos del soporte, formando así el enlace covalente entre enzima y soporte (Gilles, Hudson, and Borders 1990). Tras realizar la incubación con el EDAC se procede a realizar la incubación en NaCl 1 M durante una hora con la finalidad de evaluar la cantidad de enzima que se ha unido mediante enlace covalente al soporte, ya que al aumentar la fuerza iónica del medio la enzima unida mediante adsorción se eluye del soporte y solo queda retenida la FSA unida covalentemente.

Tras la caracterización de la inmovilización de la enzima por adsorción se procedió a incubar el derivado con distintas concentraciones de EDAC con la

finalidad de seleccionar la concentración de carbodiimida con la cual se obtiene una mayor actividad retenida tras realizar la inmovilización mediante formación de enlaces covalentes. Para este estudio se incubaron los derivados con concentraciones de EDAC entre 5 mM y 25 mM durante tres horas. Al añadir una concentración de EDAC 5 mM se midió una actividad retenida del 53% después de incubarlo 1 hora en NaCl 1 M. Seguidamente se aumentó la concentración a 15 mM y se determinó una actividad retenida 88% al final del proceso. Finalmente, al incubar el derivado con EDAC 25 mM se determinó una actividad retenida del 89%.

Tras estudiar la adición de distintas concentraciones de EDAC a la inmovilización se determinó que la concentración óptima de EDAC para este proceso era 25 mM ya que con esta concentración se observaba mayor actividad retenida tras la fase de desorción (Tabla 5.3). Así tras la incubación del derivado con NaCl 1 M durante 1 hora se determinó un rendimiento de inmovilización del 93% y una actividad retenida superior al 89% (Figura 5.7.).

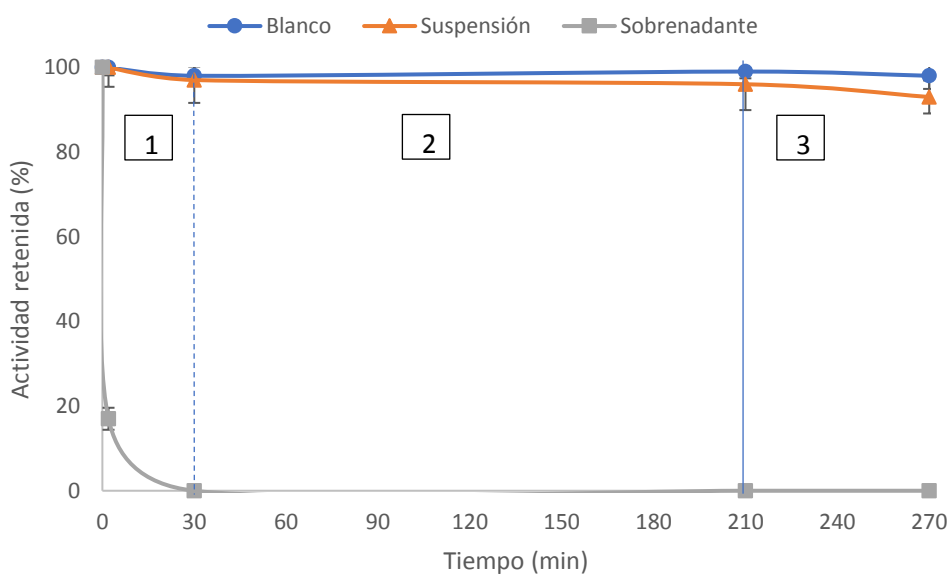


Figura 5.7. Curso de la inmovilización de la FSA en MANA-agarosa. La primera fase es la inmovilización de la enzima por absorción iónica. En la segunda fase se adiciona una concentración de EDAC 25 mM (línea punteada) y se incuba durante 3 h para la formación de los enlaces covalentes entre enzima y soporte. La tercera fase consiste en la desorción de la enzima no unida covalentemente tras la adición de NaCl 1 M (línea sólida). La inmovilización se

llevó a cabo en tampón fosfato de sodio 10 mM a pH 6,0 y 25 °C ofreciendo 4 U mL⁻¹ de soporte. La desviación estándar se calculó a partir de 2 réplicas en cada caso.

Con la finalidad de determinar la carga máxima de FSA que se puede inmovilizar mediante este método se realizaron varias inmovilizaciones ofreciendo concentraciones crecientes de FSA al medio. Así al ofrecer 400 U mL⁻¹ de soporte se observó que la carga máxima de FSA era 347 U mL⁻¹ de soporte y la carga máxima de enzima activa fue activa de 336 U mL⁻¹ de resina ya que la eficiencia de esta inmovilización es del 97,8%. Sin embargo, al medir la actividad del derivado utilizando el test de actividad se midió una actividad de 4,7 U mL⁻¹ debido a las limitaciones difusionales del derivado.

La inmovilización covalente a través de los grupos carboxilo de la superficie de la enzima permitió obtener un biocatalizador que mantiene un elevado porcentaje de la actividad enzimática ofrecida y permite recuperar la FSA del medio de reacción para reutilizarlo en sucesivos ciclos de reacción aldólica.

5.3.1.2.3. Inmovilización en glioxal-agarosa

El soporte glioxal-agarosa se preparó mediante eterificación de la agarosa 4 BCL con glicidol y su posterior oxidación con periodato sódico (Guisán 1988). La inmovilización de la FSA en este soporte se realizó mediante una aminación reductora, en la que los grupos amino de la superficie de la enzima reaccionaron con los de los aldehídos del soporte formando una base de Schiff que posteriormente fue reducida a una amina secundaria utilizando como agente reductor el borohidruro sódico. La FSA es estable en valores de pH básicos por lo que se seleccionó el borohidruro sódico como agente reductor ya que esta especie es estable en valores de pH superiores a 10,0. Así se realizó la inmovilización en tampón bicarbonato 50 mM a pH 10,0 y una vez formadas las bases de Schiff entre enzima y soporte se añadió el borohidruro para reducir las a enlaces C-N y reducir los grupos aldehído libres en alcoholes menos reactivos (Tabla 5.3.).

Las limitaciones difusionales se estudiaron siguiendo la metodología empleada en los anteriores soportes y se observaron a partir de 5 U mL⁻¹ de resina, por lo que para realizar la caracterización de esta inmovilización se ofrecieron 4 U por mL de soporte. Durante tres horas los grupos amino de la enzima reaccionaron con los aldehídos del soporte formando bases de Schiff lo que se tradujo en una caída de la actividad del sobrenadante, mientras que el blanco se mantenía al 100%. Además, se observa que la FSA se desactiva durante el proceso de inmovilización ya que la actividad de la suspensión también cae durante las 3 h.

Tras tres horas de inmovilización no se detectó actividad de FSA en el sobrenadante por lo que se procedió a añadir NaBH₄ para reducir las bases de Schiff a enlaces -C-N- formando así una unión más estable entre enzima y soporte. Tras media hora de incubación con borohidruro la actividad en el blanco, el sobrenadante y la suspensión apenas se han modificado, por lo que se procedió a lavar el derivado con tampón de inmovilización para eliminar el exceso de agente reductor y enzima no unida covalentemente al soporte. Se determinó un rendimiento de inmovilización superior al 99% con una actividad retenida superior al 53% para esta inmovilización (Figura 5.8.).

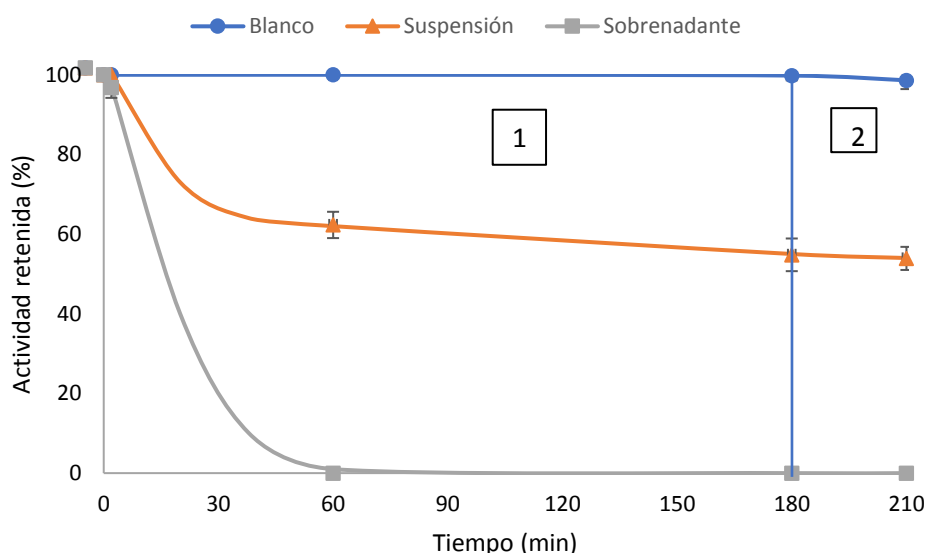


Figura 5.8. Curso de la inmovilización de la FSA en glioxal-agarosa. La inmovilización se llevó a cabo en tampón bicarbonato 50 mM a pH 10,0 y 25 °C. La primera fase consiste en la formación de las bases de Schiff entre enzima y soporte y tras la adición del borohidruro sódico (la línea vertical) se redujeron las bases de Schiff a un enlace sencillo entre carbono y nitrógeno. La desviación estándar se calculó a partir de 2 réplicas en cada caso.

La inmovilización covalente de la FSA en glicoxal-agarosa a través de los grupos aminos de la superficie de la enzima resultó en la pérdida aproximada de la mitad de la actividad enzimática ofrecida al soporte por lo cual este no es un método tan eficiente como la inmovilización en Co-IDA-sefarosa o MANA-agarosa, aun así, este derivado fue seleccionado como un posible candidato para catalizar los ciclos de reacción aldólica para disponer de la máxima información posible sobre las propiedades catalíticas de este derivado inmovilizado. Con la finalidad de determinar la carga máxima de FSA activa que puede asumir este soporte se ofrecieron cantidades cada vez mayores de la enzima a la inmovilización y se determinó que la carga máxima de enzima activa en este soporte es de 174,1 U mL⁻¹ y la medida en el test de actividad fue de 5,1 U mL⁻¹ debido a las limitaciones difusionales.

5.3.1.2.4. Inmovilización en Eupergit CM

El Eupergit CM es un soporte sintético fabricado a partir de la acrilamida, por lo que a diferencia de los soportes derivados de la agarosa su matriz tiene carácter hidrofóbico. Este soporte está funcionalizado con grupos oxirano, por lo que la inmovilización en este soporte se produjo en dos fases, una primera de adsorción mediante interacciones hidrofóbicas y la segunda en la cual los grupos nucleofílicos de la superficie de la enzima (-NH₂, -OH, -SH) atacaron al epóxido formando el enlace covalente entre enzima y soporte (Tabla 5.3.).

Para realizar la inmovilización se ofrecieron 4 U de FSA a 1 mL de soporte hidratado en tampón fosfato de sodio 100 mM a pH 6,0 en presencia de NaCl 250 mM. Al inicio de la inmovilización se observó una rápida caída en la actividad tanto del sobrenadante como el blanco, por debajo del 40%, mientras que la suspensión se mantuvo por encima del 80% (Figura 5.9.). Se siguió el curso de la inmovilización durante 48 horas y se observó que el proceso de inmovilización era muy lento. A las 48 horas la actividad en el sobrenadante era de aproximadamente el 20% de la ofrecida y la de la suspensión un 70%, mientras que el blanco se mantuvo en el 40% del inicio del proceso. La inmovilización se mantuvo en agitación orbital a 20 °C hasta las 48 horas, momento en que la

actividad en el sobrenadante se mantuvo estable en el tiempo, por lo que se dedujo que el proceso de inmovilización había finalizado. Se recuperó el derivado por filtración a vacío y se lavó con tampón fosfato 50 mM a pH 8,0, el tampón de almacenamiento de la FSA. Al medir la actividad en el derivado se determinó un rendimiento de inmovilización del 81,4% y una actividad retenida del 39,7%.

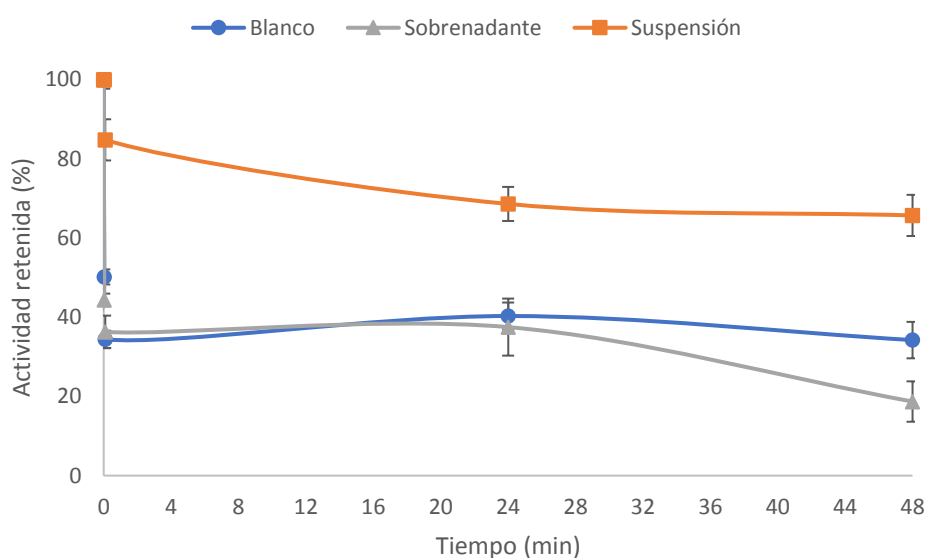


Figura 5.9. Curso de la inmovilización de la FSA en Eupergit CM. La inmovilización se llevó a cabo en fosfato de sodio 100 mM a pH 6,0 en presencia de NaCl 250 mM y 25 °C durante 48 h ofreciendo 4 U mL⁻¹ de soporte. La desviación estándar se calculó a partir de 2 réplicas en cada caso.

Los grupos epóxido de la superficie del soporte son grupos muy reactivos por lo que es necesario realizar el bloqueo de los grupos que permanecen libres tras la inmovilización. Con la intención proponer un protocolo de bloqueo adecuado se estudiaron dos agentes bloqueantes diferentes: el β-mercaptoetanol y la glicina. Para estudiar el bloqueo del soporte se incubaron los derivados inmovilizados caracterizados anteriormente con β-mercaptoetanol 0,1 M y con glicina 0,1 M en tampón fosfato de sodio 0,1 M a pH 6,0 durante 24 horas. El β-mercaptoetanol resultó ser un agente demasiado reactivo ya que tras cinco minutos no se detectó actividad FSA en el derivado. La glicina en cambio resultó ser un agente mucho menos agresivo, pero tras 24 horas de incubación la actividad del derivado bajó de 39,7% antes del bloqueo a un 6,5% tras el tratamiento con glicina.

La inmovilización en Eupergit CM resultó no ser un buen método para la inmovilización de la FSA ya que la elevada fuerza iónica en el medio requerida para esta inmovilización desactiva la enzima. Al observar el perfil de la inmovilización se vio que a los dos minutos de incubación la actividad del blanco y del sobrenadante caen por debajo del 40% de la actividad ofrecida mientras que la de la suspensión se mantiene por encima del 80%, indicando un aumento de la estabilidad en el medio de la enzima inmovilizada con respecto a la FSA soluble. La inmovilización se mantuvo durante 48 horas, momento en el cual apenas se observaban cambios en la actividad de la suspensión y del sobrenadante, por lo que el proceso había finalizado sin inmovilizarse toda la FSA ofrecida al soporte. Además, tras realizar el bloqueo con glicina la actividad del derivado disminuye hasta un 6,5%. Esta incompatibilidad entre la enzima y las condiciones de inmovilización descartó este método como una alternativa para preparar un biocatalizador capaz de ser utilizado en los ciclos de reacción de adición aldólica.

Tabla 5.3. Resumen de la inmovilización de la FSA en distintos soportes de macropartículas. Se ofrecieron 8 unidades de FSA para la inmovilización en Co-IDA-sefarosa y 4 U de FSA para el resto de los derivados ya que a esta carga no se observaron limitaciones difusionales. La desviación estándar se determinó mediante dos réplicas de la medida de actividad de la FSA en cada caso.

Soporte	Rendimiento inmovilización \pm D.E. (%)	Actividad retenida \pm D.E. (%)
Co-IDA-sefarosa	>99 \pm 2,1	93,8 \pm 3,2
MANA-agarosa	93,4 \pm 1,6	89,7 \pm 6,1
Glioxal-agarosa	>99 \pm 0,9	53,9 \pm 1,1
Eupergit CM	81,4 \pm 2,7	39,7 \pm 1,2

Se realizó el estudio de la inmovilización de la FSA en distintos soportes y se obtuvieron dos derivados con una actividad retenida muy alta. El derivado inmovilizado en Co-IDA-sefarosa a través de sus colas de histidina se inmovilizó con un rendimiento superior al 99% y con una actividad retenida por encima del 93%, mientras que el derivado inmovilizado en MANA-agarosa se inmovilizó con un rendimiento de inmovilización por encima del 93% y con una actividad retenida mayor al 89%. Estos dos derivados demostraron ser grandes

candidatos para reutilizarse en ciclos de adición aldólica debido a su elevada actividad retenida. El derivado inmovilizado en glioxal-agarosa se inmovilizó con un rendimiento superior al 99% pero con una actividad retenida del 54%, lo que se traduce en la pérdida de prácticamente la mitad de la enzima ofrecida al soporte, pero se seleccionó para realizar la adición aldólica con la finalidad de estudiar sus propiedades catalíticas. Finalmente, el derivado inmovilizado en Eupergit CM demostró no ser un método adecuado para inmovilizar la FSA ya que se inmovilizó con un rendimiento del 81% a las 48 de inmovilización y con una actividad retenida de solo el 39,7% (Tabla 5.3.).

5.3.1.3. Estudio de la reutilización del biocatalizador inmovilizado

Se seleccionaron los derivados inmovilizados en Co-IDA-sefarosa, MANA-agarosa, glioxal-agarosa y mNC-NH₂ como candidatos para catalizar la reacción de adición de la DHA al β -CHO. Se utilizaron estos biocatalizadores en la reacción con la finalidad de evaluar su capacidad para reutilizarse en sucesivos ciclos de condensación aldólica. Para realizar esta reacción de adición se establecieron las condiciones de reacción expuestas en la tabla 5.4. Se seleccionó el buffer HEPES 50 mM a pH 8,0 como el buffer de reacción ya que permite trabajar en el pH óptimo de la FSA. La concentración de β -CHO se estableció en 30 mM ya que es la solubilidad máxima del aldehído en el buffer de reacción y se propuso un exceso de la concentración de DHA de 1,5 para desplazar el equilibrio de la reacción hacia la producción de pre-D-fagomina. Finalmente se estableció una concentración de 1 U de FSA mL⁻¹ de reacción, carga máxima del derivado inmovilizado de la FSA en mNC-NH₂, para poder comparar todos los biocatalizadores mediante la determinación de diferentes parámetros cinéticos y catalíticos de estos.

Tabla 5.4. Condiciones para la reacción aldólica catalizada por los derivados inmovilizados de la FSA. La reacción se llevó a cabo en tampón HEPES 50 mM a pH 8,0 y 25 °C bajo agitación orbital en un volumen total de 10 mL.

Variable	Valor	Unidades
β -CHO	30,0	mM
DHA	45,0	mM
FSA	1,0	U mL ⁻¹
pH	8,0	
Temperatura	25	°C

Se prepararon 5 reacciones bajo las mismas condiciones para utilizar los derivados inmovilizados de la FSA en mNC-NH₂, en Co-IDA-sefarosa, en MANA-agarosa y en glioxal-agarosa y para la FSA soluble, con el objetivo de poder comparar los parámetros cinéticos de cada uno de los biocatalizadores en esta reacción (Tabla 5.5.).

Tabla 5.5. Rendimiento de reacción, conversión y velocidad inicial de la reacción de adición aldólica catalizada por FSA inmovilizada en mNC-NH₂, en Co-IDA-sefarosa, en glioxal-agarosa y en MANA-agarosa y enzima soluble con 1 U FSA mL⁻¹ de reacción.

Biocatalizador	Rendimiento (%)	Conversión (%)	Velocidad inicial (μM/min)
Soluble	>99	>99	800
mNC-NH ₂	91,6	86,5	480
Co-IDA-sefarosa	95,5	96,5	780
MANA-agarosa	67,6	95,1	730
Glioxal-agarosa	>99	98,4	1050

La reacción catalizada por 1 U de FSA soluble mL⁻¹ logró la conversión completa del β -CHO a las 5 horas de reacción (Figura 5.10.). Esta reacción fue

seleccionada como la referencia para comparar todos los derivados inmovilizados, por lo que todas las reacciones tuvieron una duración de 5 horas. Tras 5 horas de reacción, los resultados mostraron que las inmovilizaciones en Co-IDA-sefarosa (Figura 5.10.B.) y en glicoxal-agarosa (Figura 5.10.D.) no afectaron a la capacidad de la enzima para realizar la adición aldólica. Estos derivados catalizaron la síntesis de pre-D-fagomina con una velocidad inicial de reacción y una conversión final de sustrato similar a la reacción catalizada por la enzima soluble (Tabla 5.5.).

El derivado inmovilizado en MANA-agarosa (Figura 5.10.C.) alcanzó una conversión teórica del 95,2% del sustrato, pero el rendimiento aparente de producto fue solo del 67,7% con una velocidad inicial de reacción similar a la de la enzima soluble. La desaparición de sustrato y la aparición de producto no concuerdan en esta reacción, esto podría explicarse porque el β -CHO podría reaccionar con los grupos amino del soporte formando una base de Schiff. Este efecto se observa en la figura 5.11.C. cuando se observa que a los 2 minutos aproximadamente un 30% del aldehído ha desaparecido con respecto al curso de la reacción soluble a los dos minutos. Finalmente, el rendimiento de pre-D-fagomina es cercano al 70% ya que se ha visto que un 30% del sustrato ha reaccionado con el soporte y no está disponible en el medio de reacción.

La desaparición del β -CHO del medio pone en manifiesto esta reacción secundaria entre el sustrato y el soporte, la cual impide alcanzar un rendimiento de reacción del 100% al utilizar el derivado de la MANA-agarosa ya que aproximadamente un 30% del aldehído no está disponible en el medio para reaccionar con la DHA. Por lo tanto, podemos concluir que la inmovilización a través de los grupos carboxilo de la superficie de la enzima no afecta a las propiedades catalíticas de la FSA, pero no es un método adecuado para esta reacción ya que parte del β -CHO puede reaccionar espontáneamente con el soporte (Figura 5.10.).

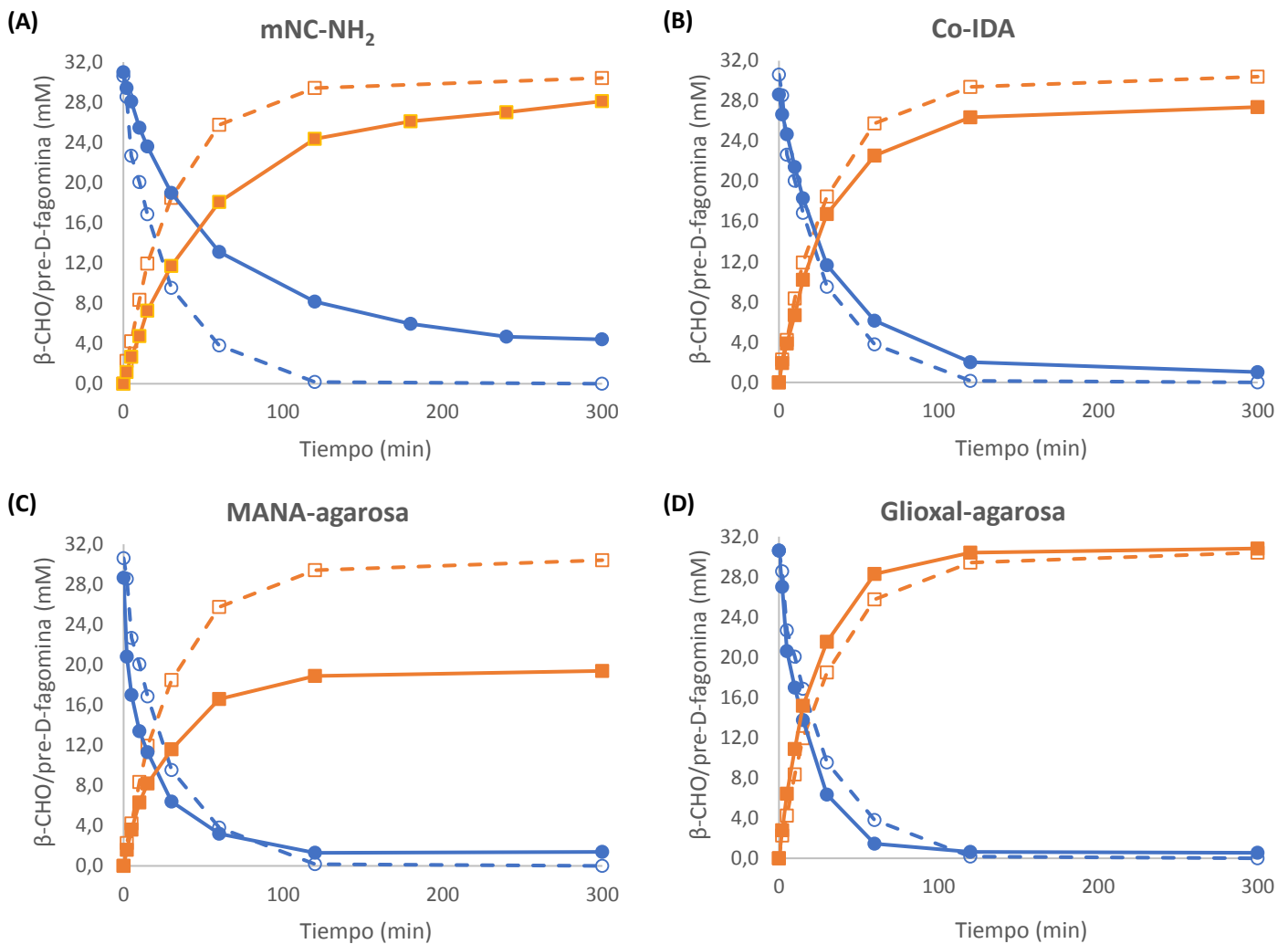


Figura 5.10. Reacción de adición de la DHA al β -CHO (●) para la producción pre-D-fagomina (■) catalizada por FSA soluble, FSA inmovilizada en mNC-NH₂ (A), en Co-IDA-sefarosa (B), en MANA-agarosa (C) y en glioxal-agarosa (D). La reacción catalizada por la enzima soluble se representó con una línea discontinua en todos los perfiles de la reacción. El medio de reacción contenía DHA 45 mM, β -CHO 30 mM y 1 U de FSA ml⁻¹ de reacción. La adición aldólica se realizó a 25 °C y pH 8,0 bajo agitación suave en el roller durante 5 horas.

Por su parte la FSA inmovilizada en mNC-NH₂ (Figura 5.10.A.) catalizó la misma reacción con una velocidad inicial de reacción y una conversión final de sustrato menor que los otros candidatos (Tabla 5.5.). A su vez el biocatalizador inmovilizado en mNC-NH₂ demostró las peores propiedades catalíticas y la actividad retenida más baja, un 29% de la ofrecida. Debido a la baja actividad específica de la FSA y a la baja actividad retenida tras la inmovilización se necesitaron concentraciones muy elevadas de mNC en el medio para poder añadir 1 U de FSA mL⁻¹ de reacción. Este hecho incrementó la viscosidad del

medio de reacción y según la bibliografía, las propiedades catalíticas de una enzima inmovilizada en nanopartículas dependen del tamaño de partícula y de la viscosidad del medio ya que estos parámetros están relacionados con la difusión y el choque entre partículas (Jia et al. 2003). Estos resultados junto al hecho de que las nanopartículas se aglomeraban en la suspensión descartaron los mNC como un soporte adecuado para la inmovilización de la FSA.

Al comparar los biocatalizadores observamos que el derivado inmovilizado en MANA-agarosa mostró propiedades catalíticas y actividad retenida similares al derivado inmovilizado en Co-IDA-sefarosa, pero la reacción espontánea entre el sustrato y el soporte disminuyó la productividad de esta reacción. A su vez el derivado de la glioxal-agarosa demostró propiedades catalíticas similares a las de la enzima soluble, pero la actividad retenida tras la inmovilización fue de aproximadamente el 50% de la actividad ofrecida al soporte, por lo que se necesita la doble cantidad de enzima para producir la misma concentración de producto en el tiempo de reacción establecido. Finalmente, el biocatalizador inmovilizado en Co-IDA-sefarosa poseía propiedades catalíticas similares a las de la enzima soluble y una actividad retenida de casi el 94%, por lo que la inmovilización por afinidad con colas de histidina no afectaba a la actividad de la enzima y se seleccionó este derivado, junto con la enzima soluble, como el candidato más adecuado para catalizar la síntesis de pre-D-fagomina.

Una de las principales ventajas de trabajar con enzimas inmovilizadas es la posibilidad de recuperar el biocatalizador y reutilizarlo en múltiples ciclos de reacción. Con la finalidad de evaluar la capacidad de reutilizar los distintos derivados inmovilizados de la FSA se realizaron sucesivos ciclos de adición aldólica en las condiciones preestablecidas reutilizando estos biocatalizadores para así poder comparar las métricas de la reacción de cada uno de los candidatos y así poder seleccionar el que permita aumentar la productividad de la reacción al máximo (Figura 5.11.).

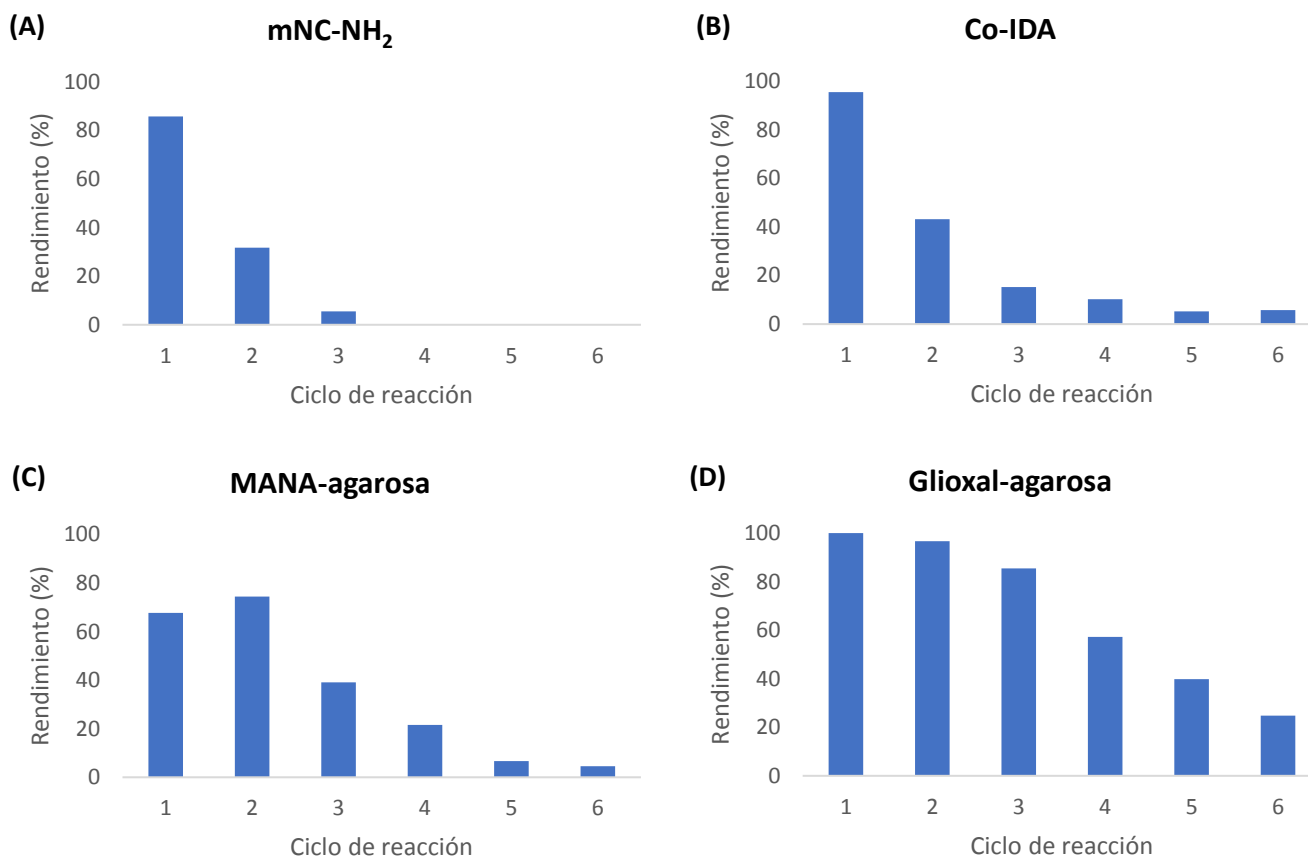


Figura 5.11. Ciclos de adición aldólica de la DHA con la β -CHO produciendo pre-D-fagomina catalizados por la FSA inmovilizada en mNC-NH₂ (A), en Co-IDA-sefarosa (B), en MANA-agarosa (C) y en glioxal-agarosa (D). El medio de reacción contenía DHA 45 mM, β -CHO 30 mM y 1 U de FSA ml⁻¹ de reacción. La adición aldólica se realizó a 25 °C y pH 8,0 durante 5 horas en agitación orbital.

Los candidatos mostraron diferentes estabilidades y propiedades catalíticas en los ciclos de reacción. El derivado de la FSA inmovilizado en mNC-NH₂ fue nuevamente el derivado que mostró peores resultados en reacción, fue el derivado que consiguió la menor conversión en la primera reacción y tras recuperar el derivado con un imán, alcanzó una conversión del 20% en el segundo ciclo de reacción y solo un 2% en el tercero. Este derivado demostró las peores propiedades catalíticas, la actividad retenida más baja de todas las inmovilizaciones y mostró muy baja estabilidad en reacción debido a la agregación de los mNC y por ello se descartó definitivamente a este derivado.

El derivado inmovilizado en Co-IDA-sefarosa fue seleccionado como el mejor candidato para catalizar una reacción individual porque el perfil de la reacción demostró que tenía prácticamente las mismas propiedades catalíticas la enzima soluble. Al recuperar el derivado y reutilizarlo en una segunda reacción la

conversión bajó hasta el 40% y en las sucesivas reacciones la conversión descendió por debajo del 20%. Esta caída en la conversión a través de los sucesivos ciclos de reacción demostró que la enzima inmovilizada en este soporte se desactivaba durante las reacciones. Con la finalidad de comprobar esta premisa se incubó el derivado en condiciones de reacción y se comprobó que la enzima no se despegaba del soporte durante el lavado, por lo que la caída de la actividad del biocatalizador es debida a la desactivación de la enzima en reacción. A pesar de que este derivado fue el que demostró mejores propiedades catalíticas en una reacción aislada, su baja estabilidad en reacción lo descartó para utilizarlo en ciclos de adición aldólica.

El siguiente derivado que demostró mejores propiedades catalíticas en la adición aldólica y poseía elevada actividad retenida fue el inmovilizado en MANA-agarosa, pero este derivado poseía la desventaja de la reacción secundaria entre soporte y sustrato. Al reutilizar este derivado en los ciclos de reacción se observó que mostraba mayor estabilidad en reacción que los derivados de mNC-NH₂ y Co-IDA-sefarosa, catalizando dos ciclos por encima del 50% de conversión y cayendo en los sucesivos ciclos de reacción, por lo que podría ser una alternativa viable para realizar los ciclos de reacción.

El candidato que fue seleccionado finalmente como el mejor biocatalizador para realizar la síntesis de pre-D-fagomina fue el derivado inmovilizado en glioxal-agarosa. Este derivado inmovilizado catalizó los ciclos de adición aldólica con las mejores propiedades catalíticas y la mayor estabilidad en reacción, aunque posee la desventaja de tener una baja carga máxima ya que su actividad retenida es de solo un 53%. Este derivado catalizó el primer ciclo de reacción con un perfil de reacción muy similar al de la enzima soluble y consiguió alcanzar una conversión superior al 50% en los 3 siguientes ciclos de reacción.

Con el objetivo de demostrar que el derivado inmovilizado en glioxal-agarosa era el candidato más adecuado para catalizar estos ciclos de reacción, a pesar de tener una actividad retenida más baja, se procedió a calcular la productividad, el rendimiento total de la reacción y el rendimiento del biocatalizador tanto para la enzima soluble como para los tres biocatalizadores inmovilizados en soportes

derivados de la agarosa (Tabla 5.6.). El derivado inmovilizado en mNC fue descartado debido a que su baja estabilidad solo le permitió realizar tres ciclos de reacción, por lo que los resultados no son comparables al del resto de candidatos.

Tabla 5.6. Productividad, rendimiento total de reacción y rendimiento de biocatalizador calculados para los ciclos de reacción catalizados por los derivados inmovilizados de la FSA en 1 mL de los soportes derivados de la agarosa y la reacción con la enzima soluble.

Las reacciones se llevaron a cabo con 1 U mL⁻¹ de reacción en un volumen final de 10 mL. La productividad se calculó sumando los μ moles producidos en cada ciclo y dividirlos por el tiempo total de los ciclos y las unidades. El rendimiento se calculó sumando los μ moles producidos en cada ciclo y dividirlos por la suma de los μ moles de sustrato. El rendimiento de biocatalizador se calculó sumando los μ moles producidos en cada ciclo y dividirlos por las unidades de enzima. Los datos de la enzima soluble se calcularon a partir de 6 reacciones en las que se reponía la enzima soluble en cada una de ellas.

Biocatalizador	Productividad (μ moles/h*U)	Rendimiento total de reacción (%)	Rendimiento de biocatalizador (μ moles/U)
Enzima soluble	1,0	>99	30,0
FSA-Co-IDA	1,6	27,7	47,9
FSA-MANA-agarosa	1,6	37,1	46,6
FSA-glioxal-agarosa	2,0	67,0	60,3

La posibilidad de reutilizar los biocatalizadores inmovilizados en seis ciclos de reacción consecutivos mejoró la productividad global y el rendimiento del biocatalizador del proceso frente a la reacción catalizada por la enzima soluble a pesar de que no se alcanza la conversión completa del sustrato en esos 6 ciclos. Al comparar los derivados inmovilizados se concluyó que los derivados de MANA-agarosa y Co-IDA-sefarosa mostraron una productividad y rendimiento de biocatalizador similares en el proceso global y mejores que los de la enzima soluble. Pero estas métricas de la reacción confirmaron la hipótesis de que a pesar de su baja actividad retenida el derivado de la FSA inmovilizada en glioxal-agarosa fue el biocatalizador más adecuado para los ciclos de adición aldólica

en estas condiciones. La síntesis de pre-D-fagomina utilizando este biocatalizador alcanzó una productividad y rendimiento del biocatalizador dos veces mayor que el mismo proceso utilizando la enzima soluble gracias a la posibilidad de reutilizar la enzima en varios ciclos de reacción con una conversión de sustrato superior al 50% en lugar de añadir nueva enzima soluble en cada reacción.

Tras realizar el estudio de la reacción con los derivados inmovilizados con 10 U mL⁻¹ de soporte se procedió a modificar la inmovilización en glioxal-agarosa y, en lugar de inmovilizar 10 unidades de FSA ml⁻¹, se inmovilizó la carga máxima de FSA activa que acepta 1 ml de este soporte, 174,1 U mL⁻¹. Este biocatalizador de alta carga se probó en los ciclos de reacción en las mismas condiciones, pero la carga de FSA se aumentó a 4 U mL⁻¹ de reacción para que los ciclos fuesen más cortos (Figura 5.12.).

La FSA inmovilizada en glioxal-agarosa se seleccionó como el candidato más estable en condiciones de reacción y el derivado más adecuado para catalizar los ciclos de adición aldólica debido a sus excelentes propiedades catalíticas. El derivado inmovilizado a carga máxima en glioxal-agarosa se utilizó en la reacción de adición aldólica con el objetivo de estudiar el efecto de la alta carga enzimática en la reutilización del biocatalizador a través de múltiples ciclos de reacción. Al utilizar el derivado a alta carga se aumenta la eficiencia volumétrica del biocatalizador ya que para añadir la misma cantidad de enzima se añade menor cantidad de derivado. En el primer ciclo de reacción el catalizador logró la conversión total del β-CHO tras dos horas de reacción, por lo que todos los ciclos de este derivado a en estas condiciones duraron dos horas. Este biocatalizador se reutilizó en 6 ciclos consecutivos de adición aldólica convirtiendo toda la cantidad del sustrato, pero en los ciclos posteriores la conversión disminuyó paulatinamente hasta el doceavo ciclo de reacción, en el que se alcanzó una conversión del 58,4% del sustrato. Este derivado de alta carga enzimática pudo reutilizarse en más ciclos de reacción al utilizar 4 U de FSA mL⁻¹ ya que la reacción era más rápida y el catalizador era más estable que el derivado de glioxal-agarosa a baja carga. Así este derivado catalizando 12 ciclos de reacción

aumentó 10 veces la productividad del proceso en comparación con una reacción de síntesis de pre-D-fagomina utilizando enzima soluble.

Este derivado se puede aplicar en la misma reacción ofreciendo mayor cantidad de unidades en reacción, pudiendo así realizar más ciclos de reacción en periodos más cortos de tiempo, lo que se traduciría en un aumento de la productividad global del proceso.

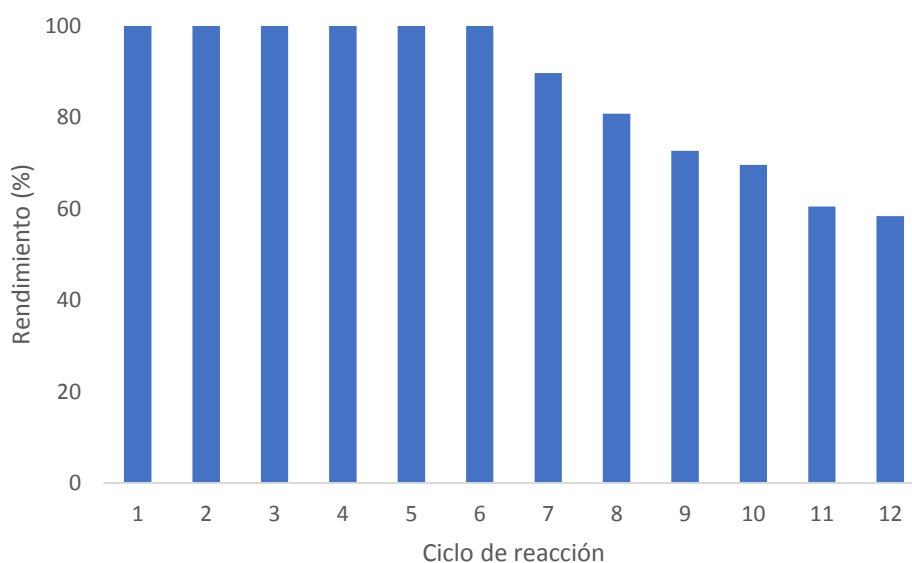


Figura 5.12. Ciclos de adición de la DHA al β -CHO produciendo pre-D-fagomina catalizados por la FSA inmovilizada en glioxal-agarosa a carga máxima. El medio de reacción contenía DHA 45 mM, β -CHO 30 mM y 4 U ml⁻¹ de reacción. La reacción se llevó a cabo a 25 °C y pH 8,0 durante 2 horas en agitación orbital.

La inmovilización de FSA en glioxal-agarosa proporcionó el biocatalizador más adecuado para los ciclos de reacción de síntesis de pre-D-fagomina ya que la unión covalente evitó la desorción de la enzima en el medio de reacción y permitió reutilizar el biocatalizador manteniendo los parámetros de actividad de la enzima soluble y aumentando su estabilidad en condiciones de reacción, por lo que resultó en un proceso más rentable que agregar nueva FSA soluble en cada nueva reacción de síntesis.

5.3.2. Inmovilización de la CPO

La inmovilización de la CPO ha sido más estudiada que la de la FSA, por ello existen gran cantidad de trabajos publicados sobre la inmovilización de la CPO utilizando diversos métodos. Existen derivados inmovilizados de la CPO por atrapamiento en matrices (Fan et al. 2018), por adsorción en diversos materiales (Muñoz-Guerrero et al. 2015) o por unión covalente al soporte (Guerrero et al. 2013). En nuestro grupo particularmente se han publicado dos trabajos sobre la inmovilización de la CPO, uno en el soporte MANA-agarosa (Pešić et al. 2012) y el otro es un estudio sobre su inmovilización en mNC (Masdeu et al. 2018).

El objetivo final de este capítulo es proponer un protocolo para la co-inmovilización de la CPO y la FSA para aplicarlo en la reacción acoplada de síntesis de pre-D-fagomina, por ello se probaron los mismos protocolos de inmovilización que se utilizaron con la FSA (Tabla 5.3.). La CPO no se puede inmovilizar en Co-IDA-sefarosa ya que no posee colas de histidinas y ya ha sido inmovilizada en MANA-agarosa, por lo que en este capítulo se abordará la inmovilización de la CPO en glioxal-agarosa y Eupergit CM.

5.3.2.1. Inmovilización en glioxal-agarosa

La inmovilización de la FSA en este soporte se realizó mediante la aminación reductora indirecta del soporte con borohidruro sódico en tampón bicarbonato 50 mM a pH 10,0. Sin embargo este protocolo no puede utilizarse para la CPO ya que esta enzima es muy inestable en pH básicos y el borohidruro a pH ácidos, por lo que se propuso realizar la reducción de las bases de Schiff formadas entre la enzima y el soporte con un agente reductor más suave, el cianoborohidruro, a dos pH distintos: pH 5,0 y pH 6,0.

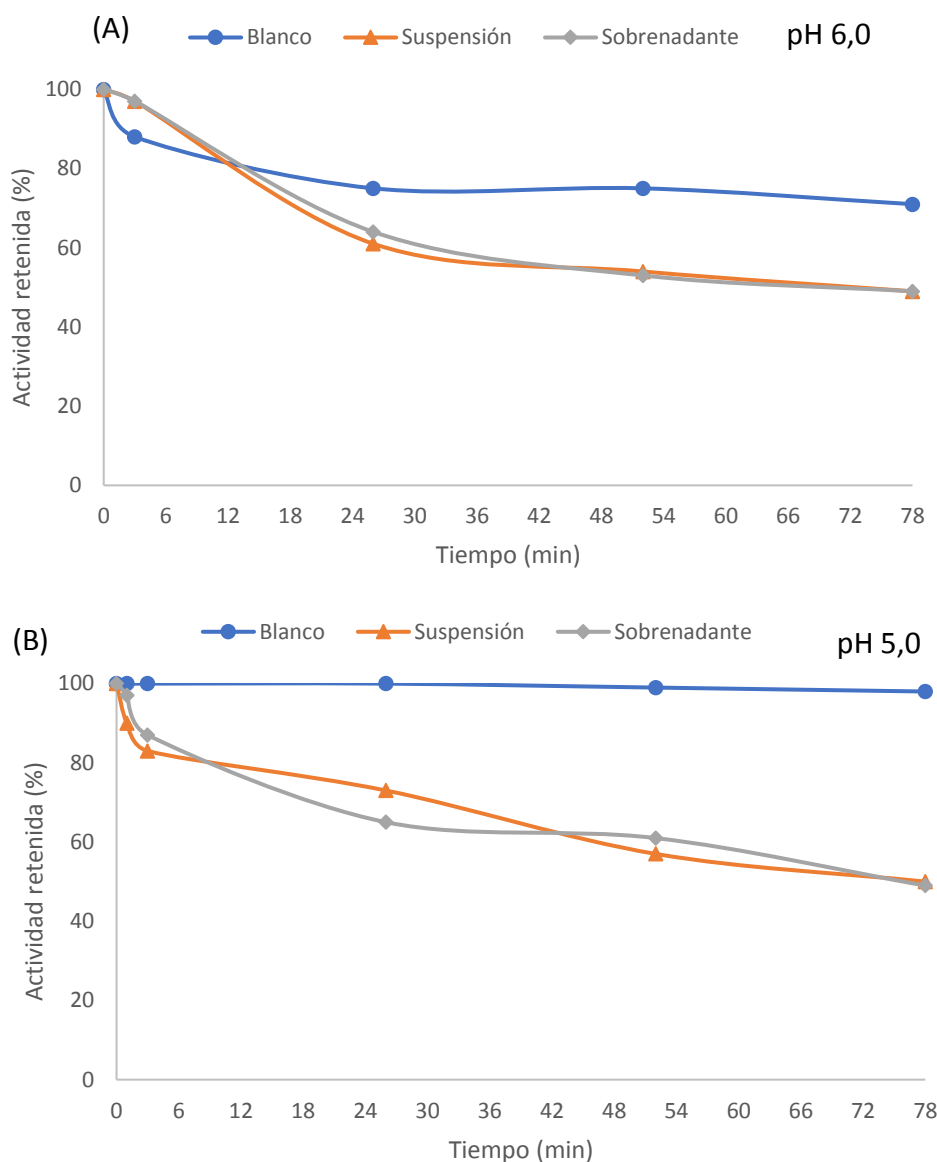


Figura 5.13. Curso de la inmovilización de la CPO en glioxal-agarosa. La gráfica A es pH 6,0 y la B a pH 5,0. La inmovilización se llevó a cabo en fosfato de sodio 25 mM a 25 °C ofreciendo 5 U mL⁻¹. La actividad de la CPO se calculó mediante el ensayo de actividad descrito en materiales y métodos. La desviación estándar se calculó a partir de 2 réplicas en cada caso.

La inmovilización de la CPO en glioxal-agarosa no mostró buenos resultados ya que se alcanzó un rendimiento de inmovilización del 51% a las 78 horas en los dos valores de pH estudiados y la actividad retenida de los dos derivados fue prácticamente nula ya que la actividad de la suspensión y del sobrenadante caían prácticamente en paralelo a lo largo de la inmovilización (Figura 5.13.). El blanco de inmovilización a pH 5,0 mantiene el 100% de su actividad durante las 78 horas y el blanco a pH 6,0 pierde rápidamente actividad durante las primeras

tres horas, pero luego se mantiene constante en un 80% de la actividad inicial hasta las 78 horas de inmovilización. Estos resultados concuerdan con la estabilidad de esta enzima a ambos valores de pH, por lo cual el cianoborohidruro no interfiere con la actividad enzimática. Al analizar las inmovilizaciones se observa que la enzima pierde su actividad al inmovilizarse a través de sus grupos aminos en superficie, lo cual puede indicar que estos grupos tienen un papel fundamental en la actividad de la enzima ya que los blancos de inmovilización no se desactivan en las mismas condiciones. Debido a ello se descartó la inmovilización de la CPO en glicolal-agarosa y se propuso estudiar otros métodos de inmovilización más adecuados para esta enzima.

5.3.2.2. Inmovilización en Eupergit CM

Tras descartar la inmovilización en glicolal-agarosa como un método adecuado para la inmovilización de la CPO se recurrió a la inmovilización en Eupergit CM como alternativa. El protocolo de acondicionamiento del soporte ya fue descrito en materiales y métodos. La inmovilización se preparó en las mismas condiciones que con la FSA, con la intención de evaluar una posible co-inmovilización en este soporte.

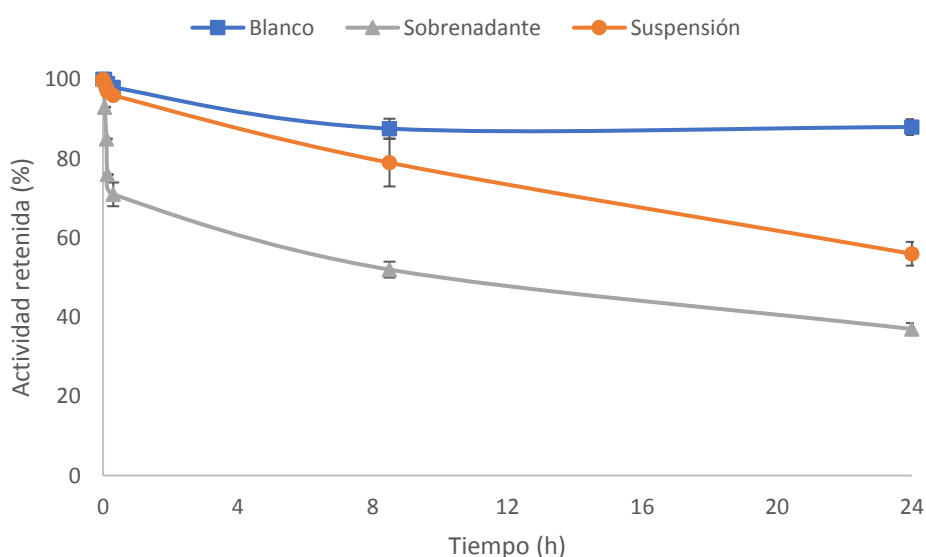


Figura 5.14. Curso de la inmovilización de la CPO en Eupergit CM. La inmovilización se llevó a cabo en fosfato de sodio 0,1 mM a pH 6,0 en presencia de NaCl 250 mM a 25 °C ofreciendo 5

U mL⁻¹. La actividad de la CPO se calculó mediante el ensayo de actividad descrito en materiales y métodos. La desviación estándar se calculó a partir de 2 réplicas en cada caso.

La inmovilización de la CPO en Eupergit CM obtuvo peores resultados que la inmovilización de la FSA en el mismo soporte, así al final de la inmovilización se alcanzó un rendimiento de inmovilización del 67,4% pero la actividad retenida fue de solo un 5,3%, por lo que nuevamente se descartó la inmovilización de la CPO en este derivado como un método adecuado. (Figura 5.14.) Los resultados obtenidos en la inmovilización de la CPO en Eupergit CM fueron muy similares a los obtenidos en glioxal-agarosa ya que nuevamente se inmovilizó a través de los grupos amino en la superficie de la enzima y nuevamente se observó que la enzima se desactivaba al inmovilizarse a través de estos grupos, por lo que se puede deducir que estos residuos tienen algún papel importante en la actividad de la enzima.

5.3.2.3. Inmovilización en MANA-agarosa

La inmovilización de la CPO en MANA-agarosa ha sido estudiada en nuestro grupo y fue publicada (Pešić et al. 2012). Con la intención de estudiar y reproducir la inmovilización de la CPO en MANA-agarosa se procedió a inmovilizar la CPO en la misma MANA-agarosa comercial 4 BCL que se utilizó para la inmovilización de la FSA (Figura 5.15.).

Tras medir la actividad del derivado inmovilizado se determinó un rendimiento de inmovilización mayor al 99% y tras lavar el derivado se midió una actividad retenida y fue del 42,3% por lo cual la CPO también pierde actividad al inmovilizarse mediante los residuos carboxilo de su superficie, pero no pierde toda su actividad como ocurría con los residuos amino. Se ofrecieron distintas concentraciones de CPO a esta inmovilización y se determinó que la carga máxima de enzima activa que admite este soporte es 4900 U mL⁻¹ de soporte.

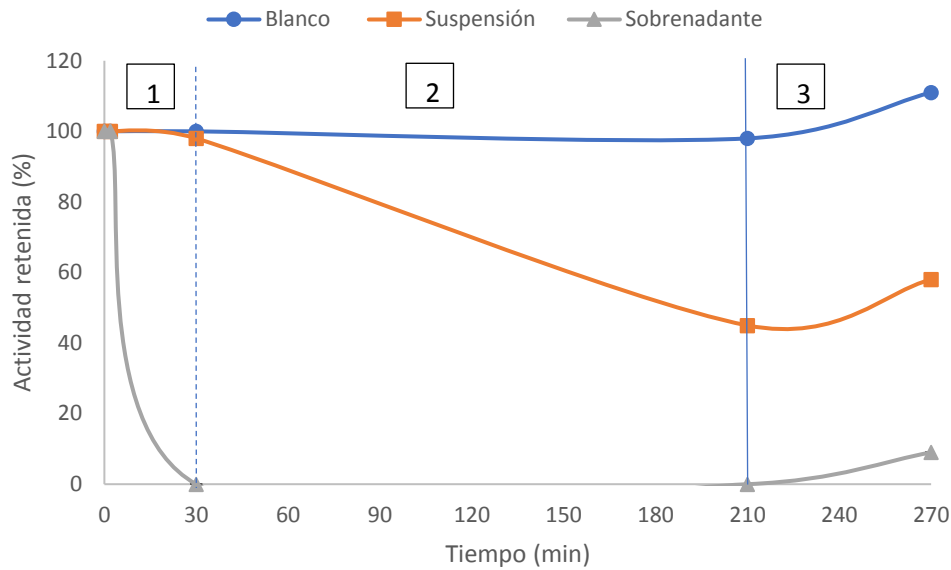


Figura 5.15. Curso de la inmovilización de la CPO en MANA-agarosa. La inmovilización se llevó a cabo en tampón fosfato de sodio 10 mM a pH 5,0 y 25 °C ofreciendo 5 U mL⁻¹. La fase 1 es la absorción iónica de la enzima en el soporte. La fase 2 es la formación de enlaces covalentes entre enzima y soporte tras la adición del EDAC 25 mM (línea punteada). La fase 3 se desorba la enzima no unida covalentemente tras añadir NaCl 1 M (línea sólida). La actividad de la CPO se calculó mediante el ensayo de actividad descrito en materiales y métodos. La desviación estándar se calculó a partir de 2 réplicas en cada caso.

Estos resultados reprodujeron de forma eficaz la inmovilización publicada de la CPO en MANA-agarosa, por lo cual se seleccionó este soporte para realizar la co-inmovilización de la CPO y la FSA.

5.3.3. Co-inmovilización de la CPO y la FSA

Al analizar las inmovilizaciones de ambas enzimas se llegó a la conclusión de que la co-inmovilización tendría que realizarse en el soporte MANA-agarosa ya que es el soporte en el que se consigue mayor actividad retenida tanto para la FSA como para la CPO. Para realizar esta co-inmovilización se comparó el protocolo de inmovilización de ambas enzimas en MANA-agarosa y se observó que ambas inmovilizaciones se realizaban en tampón fosfato de sodio 10 mM y con una concentración de EDAC 25 mM, por lo que la única diferencia entre ambos protocolos era el pH de inmovilización, pH 5,0 para la CPO y pH 6,0 para la FSA. Debido a ello se procedió a estudiar la co-inmovilización a diferentes pH (Tabla 5.8.).

5.3.3.1. Estudio del efecto del pH

Para estudiar la co-inmovilización se ofrecieron 5 U de FSA y 5 U de CPO en 1 mL de MANA-agarosa y se siguió la inmovilización de ambas enzimas mediante el protocolo descrito en los apartados anteriores.

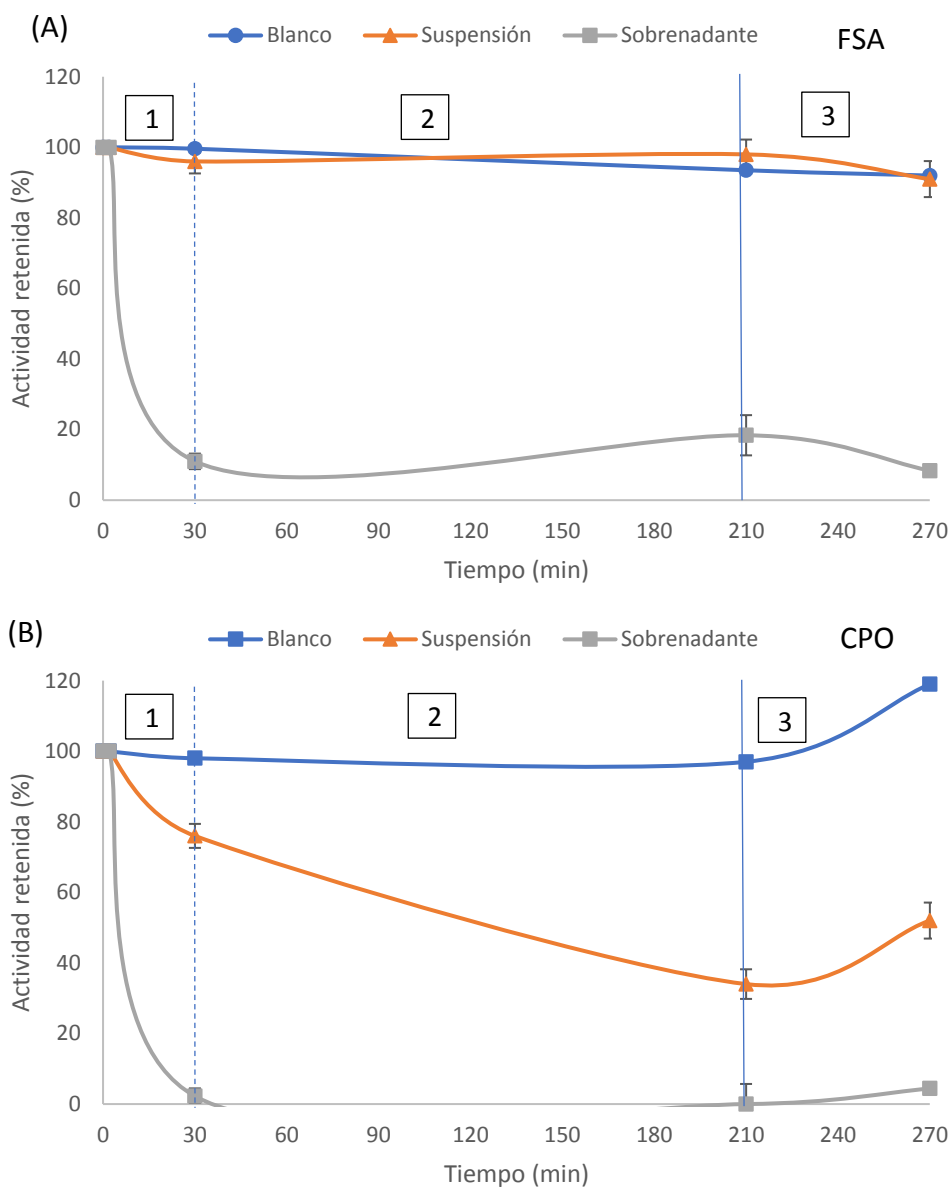


Figura 5.16. Curso de la co-inmovilización de la FSA (A) y la CPO (B) en MANA-agarosa.

La inmovilización se llevó a cabo en tampón fosfato de sodio 10 mM a pH 6,0 y 25 °C ofreciendo 10 U de FSA y 10 U de CPO por mL de soporte. La fase 1 es la absorción iónica de la enzima en el soporte. La fase 2 es la formación de enlaces covalentes entre enzima y soporte tras la adición del EDAC 25 mM (línea punteada). La fase 3 se desorba la enzima no unida covalentemente tras añadir NaCl 1 M (línea sólida). La actividad de la CPO y de la FSA se

determinaron mediante los ensayos de actividad descritos en materiales y métodos. La desviación estándar se calculó a partir de 2 réplicas en cada caso.

Tras realizar el estudio de la co-inmovilización de ambas enzimas a distintos valores de pH se observó que la inmovilización de la CPO no se ve afectada por la variación de pH del medio, siendo los valores de rendimiento de inmovilización y actividad retenida muy similares en las tres condiciones. En cambio, la inmovilización de la FSA se vio afectada por las variaciones de pH, pasando de un rendimiento del 84,0% a pH 6,0 a un 57,4% a pH 5,0 y de una actividad retenida del 86,6% a pH 6,0 a un 43,8% a pH 5,0. Esta disminución del rendimiento de inmovilización de la FSA se justifica con el punto isoeléctrico de la enzima.

Para que se produzca la adsorción iónica entre la enzima y el soporte, el pH de inmovilización debe ser menor al pKa de los grupos amino del soporte (6,9) y mayor al punto isoeléctrico de la enzima (5,9 para la FSA y 4,45 para la CPO). Al trabajar en este margen de pH el soporte tiene carga neta positiva y la enzima carga negativa. Así, al realizar la co-inmovilización a pH 5,5 y pH 5,0 la mezcla se encontró por debajo del pI de la FSA, por lo que no toda la enzima tenía carga negativa y por lo tanto el rendimiento de inmovilización fue menor que a pH 6,0. Sin embargo la inmovilización de la CPO no se vio afectada ya que su punto isoeléctrico es mucho más bajo. Por lo tanto, la co-inmovilización debe realizarse a pH 6,0 ya que a este pH se alcanzan los mayores rendimientos de inmovilización y actividad retenida para ambas enzimas (Figura 5.16.).

Al analizar los resultados de la co-inmovilización a pH 6,0 se observa que el curso de la inmovilización de la FSA es muy similar al de la inmovilización de la enzima sola, pero se llega a una actividad retenida ligeramente menor, un 86,6% frente al 89,7% de la FSA sola (Figura 5.16.). En cuanto a la CPO la actividad retenida a pH 6,0 fue del 33,3% frente al 42,3% que alcanzaba al inmovilizarse sola a pH 5,0 (Tabla 5.7.).

Tabla 5.7. Resumen de la co-inmovilización de la FSA y la CPO en MANA-agarosa a diferentes pH.

Enzima	pH	Rendimiento de inmovilización (%)	Actividad retenida (%)	Eficiencia de inmovilización (%)
CPO	5,0	99,1	40,1	40,5
	5,5	95,8	30,3	31,6
	6,0	95,6	33,3	34,8
FSA	5,0	57,4	43,8	76,3
	5,5	74,8	59,6	79,6
	6,0	84,0	86,6	>99,0

5.4. Conclusiones

Las dos enzimas propuestas para el sistema multienzimático de síntesis de pre-D-fagomina presentan características muy distintas, las cuales condicionan tanto al acoplamiento del sistema como a la co-inmovilización de dichas enzimas. La FSA es una aldolasa de gran tamaño (229,9 kDa) que posee una actividad específica baja, en torno a 15 U mg⁻¹ de FSA y presenta una elevada estabilidad a pH mayores de 6,0, por debajo de este pH precipita. La CPO en cambio es una peroxidasa de 40,5 kDa que presenta una elevada actividad específica 1400 U mg⁻¹ de CPO y es muy inestable a pH por encima de 6,0. Así el sistema multienzimático se vio limitado por estas características de ambas enzimas.

Debido a los problemas detectados para la reacción acoplada utilizando enzimas solubles se propuso como objetivo último del capítulo la co-inmovilización de ambas enzimas en un mismo soporte ya que al estar ambas enzimas inmovilizadas en la misma partícula, teóricamente se simplificaría el proceso debido a la cercanía en el espacio de los centros activos de ambas enzimas. Este hecho disminuiría los problemas de transferencia de sustratos y reduciría la acumulación de productos secundarios de reacción.

Al realizar el estudio de las condiciones de inmovilización de compromiso para ambas enzimas se observó que el derivado inmovilizado de la FSA en glioxal-agarosa fue el derivado que demostró mejores propiedades catalíticas y mayor estabilidad al realizar ciclos de síntesis de pre-D-fagomina a partir de DHA y β -CHO sin embargo, este soporte fue descartado para realizar la co-inmovilización de ambas enzimas ya que la CPO pierde prácticamente toda su actividad al inmovilizarse a través de los residuos aminos de su superficie.

El soporte MANA-agarosa fue el seleccionado para llevar a cabo la co-inmovilización de la CPO y la FSA ya que fue el único soporte en que se inmovilizó la CPO con una actividad retenida considerable y el protocolo de inmovilización de ambas enzimas en este soporte era prácticamente el mismo, pero a diferentes valores de pH, para la CPO pH 5,0 y para la FSA pH 6,0. Al estudiar el efecto del pH en la co-inmovilización se observó que este fue limitado por el punto isoeléctrico de la FSA (5,9) ya que el rendimiento de inmovilización de esta enzima disminuía considerablemente al trabajar por debajo de pH 6,0.

Finalmente, se propuso un protocolo de co-inmovilización de la CPO y la FSA y se caracterizó dicha inmovilización para poder utilizar este derivado en la reacción acoplada de síntesis de pre-D-fagomina. La co-inmovilización se realizó en el soporte MANA-agarosa en tampón fosfato 10 mM a pH 6,0 e incubando 3 horas con EDAC 25 mM a 25 °C.

**6. Aplicación del derivado co-
inmovilizado
en la síntesis de pre-D-
fagomina**

6.1. Introducción

La aplicación del derivado co-inmovilizado de la FSA y la CPO en la reacción multienzimática diseñada para la síntesis de pre-D-fagomina requirió el estudio de las condiciones de reacción con el fin de seleccionar unas condiciones óptimas y adecuadas para ambas enzimas, con el fin de alcanzar el rendimiento máximo de producto final.

La FSA es una aldolasa con gran aplicación en el campo de la síntesis química debido a su elevada capacidad catalítica, su estereoselectividad y su promiscuidad en cuanto a la aceptación de sustratos. Estas características han favorecido que durante la última década se hayan diseñado diversas rutas sintéticas utilizando esta enzima como biocatalizador. La capacidad sintética de esta aldolasa ha sido contrastada en diversos trabajos publicados, en los cuales se emplea la FSA en la síntesis de pre-D-fagomina y diversos compuestos polihidroxilados (Castillo et al. 2006)(Camps Bres et al. 2013)(Sánchez-Moreno et al. 2012). La síntesis de pre-D-fagomina ha generado gran interés por lo que la aplicación de la FSA a este proceso ha sido ampliamente estudiada y se ha propuesto un modelo matemático para la condensación aldólica de la dihidroxiacetona (DHA) y el 3-[(Bencil oxicarbonil)amino]propionaldehído (β -CHO) catalizado por la FSA (Sudar et al. 2013b). Este modelo predice la producción de pre-D-fagomina catalizada por la variedad mutante FSA A129S, estudiada en este trabajo y por la variedad doble mutante FSA A129S/A165G. Ambas variedades se probaron en reactor en “batch” y en reactor en continuo y se determinó que la vida media de la variedad doble mutante es siete veces mayor que la de la FSA A129S en el reactor en “batch” pero se necesitaba mayor cantidad de enzima doble mutante para alcanzar la misma producción que con la FSA con una mutación. Ambas enzimas demostraron muy baja estabilidad en el reactor en continuo. Este modelo demostró que la producción de pre-D-fagomina era mayor cuanto mayor era la concentración inicial de sustratos ya que el β -CHO inhibe la reacción retroaldólica, por lo que el equilibrio se desplaza hacia la producción de pre-D-fagomina. Así al realizar la reacción en tampón TEA HCl 50 mM a pH 7,5 con etilacetato 10% v/v a 25 °C con una concentración inicial

de β -CHO 76,3 mM, de DHA 100,8 mM y FSA 2,3 mg mL⁻¹ se alcanza una conversión de aproximadamente el 90%.

La reacción aldólica catalizada por la FSA es una reacción muy eficiente, rápida, estereoselectiva y con una elevada “economía atómica” por lo cual es una herramienta de gran interés para formar enlaces C-C en la industria química. Debido a ello existen diversos trabajos que estudian su aplicación sintética (Concia et al. 2009; Sudar et al. 2013a; Sugiyama et al. 2007). Esta reacción requiere un compuesto donador, generalmente una cetona que se adiciona a un aldehído aceptor formando el enlace entre carbonos (Windle et al. 2014). Los aldehídos son fuertes electrófilos y por ello pueden producir gran cantidad de reacciones secundarias con componentes del medio de reacción e incluso pueden desactivar o inhibir la aldolasa mediante uniones no selectivas. Por ello en este proyecto se propuso este sistema multienzimático en el cual se produce β -CHO in situ a partir de β -OH. La importancia de la producción del aldehído in situ para la reacción aldólica ha sido estudiada por *Mifsud et al* (Mifsud et al. 2012). Este trabajo se enfocaba en estudiar la oxidación del alcohol furfurílico mediante distintos sistemas enzimáticos o químicos para producir furfuraldehído in situ para acoplar la reacción aldólica catalizada por la FSA. Este trabajo estudió la oxidación del alcohol mediante distintos sistemas, entre ellos el sistema laccasa/TEMPO, la alcohol oxidasa, la CPO y el sistema Au/Pd-TiO₂. En esta tesis se seleccionó finalmente como oxidante la CPO ya que en el grupo de investigación existe experiencia en la oxidación de alcoholes con estructura similar utilizando esta enzima.

La oxidación del β -OH catalizada por la CPO apenas ha sido estudiada con la intención de acoplar esta reacción a la adición aldólica en este sistema multienzimático (Masdeu et al. 2016). Debido a la complejidad del sistema acoplado y a que las condiciones óptimas de cada una de las enzimas son muy distintas se propuso un modelo cinético para este sistema (Masdeu 2017). Este modelo matemático ha sido validado y predice las condiciones óptimas para la reacción acoplada.

Con la finalidad de establecer unas condiciones adecuadas para trabajar en el sistema multienzimático diversos parámetros fueron estudiados. Trabajos anteriores dentro de este proyecto determinaron que el pH de la reacción debía ser 6,5 ya que por debajo de este pH la FSA precipita y por encima de él se observó que la CPO se desactiva rápidamente. Así se estableció el tampón MES 100 mM a pH 6,5 como el buffer adecuado para la reacción acoplada. Otros parámetros como la selección del peróxido o la desactivación de las enzimas fueron estudiados por un compañero del laboratorio, Gerard Masdeu, el cual propuso un modelo cinético para este complejo sistema multienzimático (Masdeu 2017).

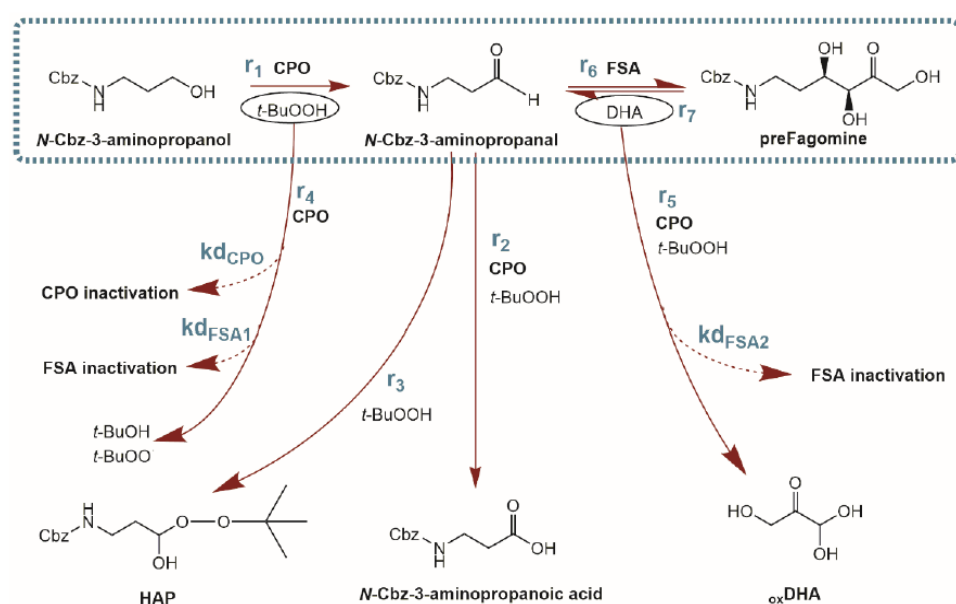


Figura 6.1. Reacciones del sistema multienzimático de síntesis de la pre-D-fagomina. Imagen tomada de la tesis de Gerard Masdeu.

Para realizar este modelo se procedió a estudiar cada una de las reacciones de forma individual con la finalidad de reducir los efectos colaterales de las otras reacciones (Figura 6.1.). Se estudió la reacción de oxidación del $\beta\text{-OH}$ por la CPO, la adición aldólica catalizada por la FSA y finalmente la reacción acoplada. El estudio de la reacción de oxidación del $\beta\text{-OH}$ abordó la desactivación de la CPO en presencia del $t\text{-BuOOH}$, la reacción química entre el $t\text{-BuOOH}$ y el $\beta\text{-CHO}$, la oxidación del $\beta\text{-CHO}$ por parte de la CPO y la propia oxidación del $\beta\text{-OH}$ por la CPO.

La ecuación de la descomposición del *t*-BuOOH por parte de la CPO (1) y de la desactivación de la CPO en presencia de *t*-BuOOH (2) se expresan a continuación:

$$r_4 = \frac{k_{cat4} * e^{-kd_{CPO} * t} * [t-BuOOH]^n}{k_4^n + [t-BuOOH]^n} \quad (1)$$

$$kd_{CPO} = \frac{k_a * 2 * r_4}{a + 2 * r_4} \quad (2)$$

Tabla 6.1. Valores estimados de los parámetros de las ecuaciones 1 y 2.

Parámetros	Valores	Unidades
k_{cat4}	$2,068 \pm 0,095$	$\mu\text{mol} * \text{min}^{-1} * \text{mgCPO}^{-1}$
k_4	$51,54 \pm 3,40$	mM
n	$1,433 \pm 0,018$	-
k_a	$7,038 * 10^{-2} \pm 0,172 * 10^{-2}$	min^{-1}
a	$3,656 * 10^{-2} \pm 0,409 * 10^{-2}$	$\text{mM} * \text{min}^{-1}$

La reacción química entre el aldehído y el peróxido se expresa como una reacción reversible entre los sustratos y el producto, un hidroxialquilperóxido (HAP) (3):

$$r_3 = k_{3i} * [\beta - CHO] * [t - BuOOH] - k_{3ii} * [HAP] \quad (3)$$

Tabla 6.2. Valores estimados se los parámetros de la ecuación 3.

Parámetros	Valores	Unidades
k_{3i}	$1,489 * 10^{-3} \pm 4,8 * 10^{-5}$	$\text{mM}^{-1} * \text{min}^{-1}$
k_{3ii}	$1,248 * 10^{-1} \pm 5,6 * 10^{-3}$	min^{-1}

Las reacciones de oxidación de la CPO siguen un mecanismo en ping-pong, así la oxidación del β -OH (4), del β -CHO (5) y la DHA (6) se expresan a continuación, donde Y_{CPO} es la concentración de CPO en mg mL^{-1} :

$$r_1 = \frac{k_{cat1} * Y_{CPO} * e^{-kd_{CPO} * t} * [\beta - OH] * [t - BuOOH]}{K_{M,\beta - OH} * [t - BuOOH] + K_{M,t - BuOOH} * [\beta - OH] + [t - BuOOH] * [\beta - OH]} \quad (4)$$

$$r_2 = \frac{k_{cat2} * Y_{CPO} * e^{-kd_{CPO} * t} * [\beta-CHO] * [t-BuOOH]}{K_{M,\beta-CHO} * [t-BuOOH] + K_{M,t-BuOOH} * [\beta-CHO] + [t-BuOOH] * [\beta-CHO]} \quad (5)$$

$$r_5 = \frac{k_{cat5} * Y_{CPO} * e^{-kd_{CPO} * t} * [DHA] * [t-BuOOH]}{K_{M,DHA} * [t-BuOOH] + K_{M,t-BuOOH} * [DHA] + [t-BuOOH] * [DHA]} \quad (6)$$

Tabla 6.3. Valores estimados de los parámetros de las ecuaciones 4, 5 y 6.

Parámetros	Valores iniciales	Unidades
k _{cat1}	11,23	μmol*min ⁻¹ *mgCPO ⁻¹
k _{cat2}	3,973	μmol*min ⁻¹ *mgCPO ⁻¹
k _{cat5}	50,34	μmol*min ⁻¹ *mgCPO ⁻¹
K _{M,t-BuOOH}	66,18	mM
K _{M,β-OH}	311,3	mM
K _{M, β-CHO}	42,53	mM
K _{M,DHA}	779,6	mM

El estudio de la reacción de la FSA se expresa con la ecuación de la adición aldólica (7) y la retroaldólica (8), donde Y_{FSA} es la concentración de FSA en mg mL⁻¹:

$$r_6 = \frac{k_{cat6} * Y_{FSA} * [DHA] * [\beta-CHO]}{K_{M,\beta-CHO} * [DHA] + K_{M,DHA} * K_{M,\beta-CHO} + [DHA] * [\beta-CHO]} \quad (7)$$

$$r_7 = \frac{k_{cat7} * Y_{FSA} * [pre-D-fagomina]}{K_{M,pre-D-fagomina} + [pre-D-fagomina]} \quad (8)$$

Tabla 6.4. Valores estimados de los parámetros de las ecuaciones 7 y 8.

Parámetros	Valores iniciales	Unidades
k _{cat6}	19,31 ± 1,00	μmol*min ⁻¹ *mgFSA ⁻¹
k _{cat7}	13,06 ± 0,69	μmol*min ⁻¹ *mgFSA ⁻¹
K _{M,DHA}	9,004 ± 1,703	mM
K _{M,β-CHO}	20,94 ± 2,25	mM
K _{M,pre-D-fagomina}	59,68 ± 1,93	mM

Finalmente, para estudiar la reacción acoplada se determinó la ecuación de la desactivación de la FSA en presencia de CPO y *t*-BuOOH (9) y en presencia de CPO, *t*-BuOOH y DHA (10).

$$kd_{FSA1} = k_1 * 2 * r_4 \quad (9)$$

$$kd_{FSA2} = k_2 * r_5 \quad (10)$$

Tabla 6.5. Valores estimados de los parámetros de las ecuaciones 9 y 10.

Parámetros	Valores iniciales	Unidades
k_1	$9,792 \cdot 10^{-2} \pm 3,57 \cdot 10^{-3}$	mM^{-1}
k_2	$6,704 \pm 0,240$	mM^{-1}

El modelo predice las condiciones óptimas para la reacción acoplada utilizando las enzimas solubles, alcanzando un rendimiento máximo del 14%. Por ello a lo largo de este capítulo se estudiaron las condiciones de reacción con la finalidad de aumentar el rendimiento utilizando el derivado co-inmovilizado de la FSA y la CPO en la síntesis de pre-D-fagomina. Así, se han abordado las posibles configuraciones del reactor, la proporción de ambas enzimas en el biocatalizador o la adición de *t*-BuOOH durante la reacción.

6.2. Objetivos

El objetivo principal de este capítulo es la utilización del derivado co-inmovilizado de la FSA y la CPO en la síntesis multienzimática de pre-D-fagomina y el estudio de las condiciones de reacción para aumentar el rendimiento.

Los objetivos específicos son:

- Determinar la carga enzimática óptima para cada una de las enzimas en el derivado co-inmovilizado.
- Reducir las reacciones secundarias y la aparición de productos secundarios de la reacción.
- Comparar los resultados obtenidos con la reacción catalizada por las enzimas solubles y la catalizada por el derivado co-inmovilizado.

6.3. Resultados y discusión

Estudios previos en el grupo de investigación descubrieron tres problemas principales en el sistema multienzimático: existen diversas reacciones secundarias dentro del sistema, la acumulación de β -COOH como producto secundario de la reacción y la rápida desactivación de la FSA al incubarla con CPO y *t*-BuOOH. El modelo predice unas condiciones óptimas para la reacción en soluble, en las cuales se alcanza un rendimiento de pre-D-fagomina máximo del 14% y ha sido validado experimentalmente. Estas condiciones óptimas se pueden ver en la tabla 6.6.

Tabla 6.6. Valores óptimos propuestos por el modelo para la síntesis de pre-D-fagomina catalizada por CPO/FSA en soluble. A 25 °C en tampón MES 100 mM a pH 6,5 a 1000 rpm. (Masdeu 2017)

Reactivo	Valor	Unidades
β -OH	16,0	mM
DHA	72,6	mM
<i>t</i> -BuOOH	39,9	mM
FSA	200	U mL ⁻¹
CPO	5000	U mL ⁻¹

6.3.1. Síntesis de pre-D-fagomina en “batch”

Se eligieron las condiciones óptimas para la reacción acoplada catalizada por CPO/FSA solubles para realizar la misma reacción con el derivado co-inmovilizado a carga máxima. Para ello se preparó un derivado co-inmovilizado manteniendo la proporción CPO/FSA (25:1) propuesta por el modelo, este derivado poseía 195,8 U de FSA y 4900 U de CPO mL⁻¹ de soporte.

Debido a que el reactor en "batch" permite una relación derivado inmovilizado/volumen total máxima de 1:10 (v/v), no se pudo disponer de la misma concentración de enzimas en reacción que la propuesta por el modelo. Añadiendo la máxima cantidad de derivado que admitía el reactor se dispuso de 19,6 U de FSA y 490 U de CPO mL⁻¹ de reacción, un orden de magnitud por debajo de lo que proponía el modelo. A pesar de ello se utilizó este biocatalizador en la reacción acoplada con la finalidad de evaluar los resultados y se observó que tras 60 minutos de reacción no se había consumido nada del β -OH, pero sí un 10% del *t*-BuOOH, indicando así una posible reacción secundaria entre la CPO y el peróxido sin oxidar el alcohol. Una vez finalizada la reacción no se detectó actividad ni de FSA ni de CPO en el derivado.

Con la intención de explicar los resultados de la reacción en "batch" se realizó una reacción empleando las enzimas solubles en las mismas concentraciones que la reacción con el co-inmovilizado. Pasada una hora de reacción no se detectó consumo de alcohol, pero sí un 23% de peróxido, sin observarse la aparición de pre-D-fagomina. Estos resultados indicaron que la concentración de enzimas no era lo suficientemente alta para producir pre-D-fagomina en estas condiciones. Además, se observó que la oxidación del alcohol empleando el derivado co-inmovilizado es más lenta que la misma reacción empleando enzima soluble a la misma cantidad de unidades, indicando así problemas de transferencia de materia en el derivado.

Tal como predecía el modelo observamos una reacción secundaria entre la CPO y el *t*-BuOOH, en la cual no se produce la oxidación del alcohol. El modelo cinético propuso que el producto de esta reacción secundaria es la especie química que desactiva la FSA durante la reacción. Con la finalidad de poner en evidencia esta reacción y estudiar la desactivación de la CPO, se incubaron 5000 U de CPO en presencia de distintas concentraciones de *t*-BuOOH a 25 °C y 1000 rpm en tampón MES 100 mM pH 6,5 durante 24 horas (Tabla 6.7.).

Tabla 6.7. Consumo de distintas concentraciones de *t*-BuOOH por 5000 U de CPO. En los tubos de la A la G se incubaron 5000 U de CPO con distintas concentraciones de *t*-BuOOH y los tubos H e I eran blancos en los que no había CPO. Las muestras se incubaron a 25 °C en tampón MES 100 mM pH 6,5 durante 24 horas a 100 rpm.

Muestra	t=0		t=24h	
	Concentración de <i>t</i> -BuOOH (mM)	Actividad (U mL ⁻¹)	Concentración de <i>t</i> -BuOOH (mM)	Actividad (U mL ⁻¹)
A	0	5000	0	4998,7
B	16	5000	0	2956,0
C	8	5000	0	3859,5
D	4	5000	0	4137,8
E	2	5000	0	4465,3
F	0,8	5000	0	4776,3
G	160	5000	51,6	0
H	160	0	156,6	0
I	16	0	16,3	0

Al incubar las 5000 U de CPO con distintas concentraciones de peróxido se observó que todo el peróxido se consumía a las 24 horas excepto en el tubo en que había una concentración de *t*-BuOOH de 160 mM, en el que tras 24 horas de incubación se detectó una concentración de peróxido de 51,6 mM. Se prepararon dos muestras sin CPO en las que se observó que el peróxido es estable en estas condiciones durante 24 horas y así se descartó la descomposición espontánea del *t*-BuOOH en las muestras. El efecto de esta reacción también se observó en el color de los tubos ya que a mayor concentración de peróxido mayor fue la pérdida de color observada en la muestra y mayor la pérdida de actividad (Figura 6.2.).

Este estudio puso en evidencia la existencia de la reacción secundaria entre CPO y *t*-BuOOH. Debido a esta reacción se propuso estudiar la adición de peróxido al medio de reacción con la finalidad de optimizar la síntesis de pre-D-fagomina.

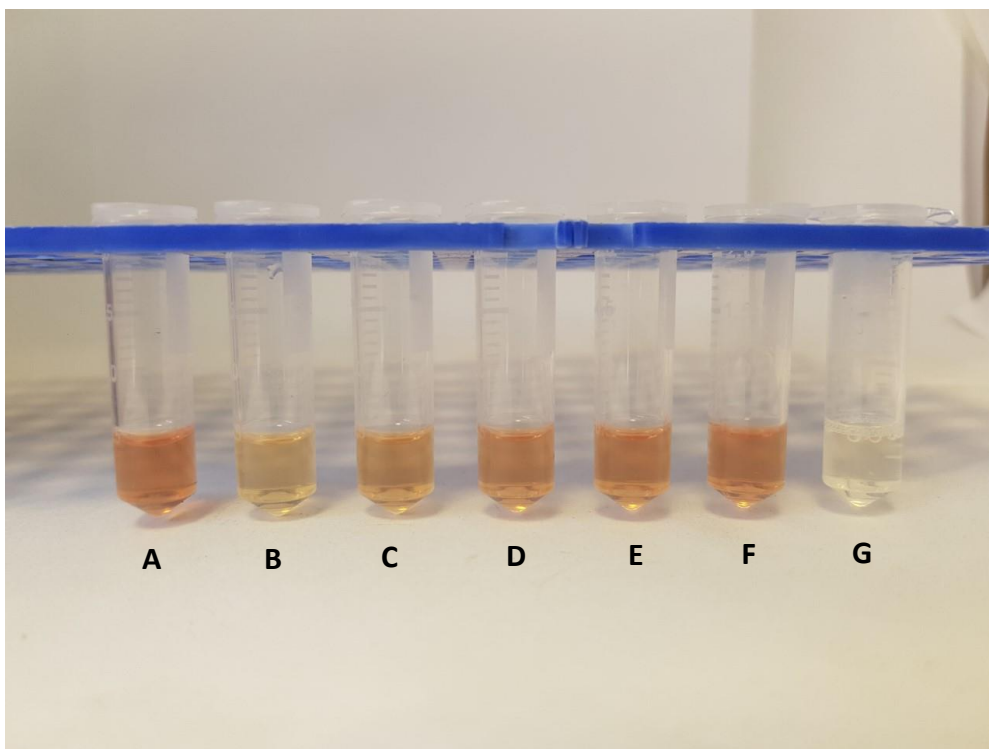


Figura 6.2. Estudio de la reacción entre distintas concentraciones de *t*-BuOOH y 5000 U de CPO. Las muestras van de izquierda a derecha de la A a la G.

6.3.2. Efecto de la naturaleza del peróxido en la síntesis de pre-D-fagomina

El derivado co-inmovilizado resultó ser incapaz de catalizar la oxidación del alcohol al utilizar como agente oxidante el *t*-BuOOH en una concentración 40 mM. Debido a ello se procedió a estudiar la reacción utilizando como agente oxidante el peróxido de hidrogeno a la misma concentración. Como alternativa se procedió a probar la misma reacción utilizando pulsos de cada uno de los peróxidos con la finalidad de aumentar la velocidad de oxidación del alcohol y evitar la aparición de reacciones secundarias (Tabla 6.8.).

Tabla 6.8. Resumen de las reacciones de síntesis de pre-D-fagomina en “batch”. Se expresa el biocatalizador empleado, el peróxido añadido, su concentración inicial y la adición o no de pulsos de peróxido con la finalidad de restituir una concentración 3mM. Las reacciones en gris se desarrollaron en el apartado 6.3.1.

Biocatalizador	Peróxido	Concentración inicial (mM)	Pulso
Co-inmovilizado	<i>t</i> -BuOOH	40	No
Enzimas solubles	<i>t</i> -BuOOH	40	No
Co-inmovilizado	<i>t</i> -BuOOH	3	Si
Enzimas solubles	<i>t</i> -BuOOH	3	Si
Co-inmovilizado	H ₂ O ₂	40	No
Enzimas solubles	H ₂ O ₂	40	No
Co-inmovilizado	H ₂ O ₂	3	Si
Enzimas solubles	H ₂ O ₂	3	Si

6.3.2.1. Reacción en “batch” con H₂O₂ 40 mM

La primera alternativa estudiada fue realizar la reacción en “batch” con las condiciones propuestas por el modelo cambiando el *t*-BuOOH por el H₂O₂. Nuevamente se realizó la reacción tanto con el derivado co-inmovilizado como con las enzimas solubles y tras dos horas de reacción se determinó una conversión de β-OH del 2% con el derivado y del 3% con las enzimas solubles, por lo cual esta alternativa fue descartada para esta reacción. Tras finalizar la reacción se observó que el derivado no tenía actividad FSA, pero se determinó una actividad aparente de 4,1 U CPO mL⁻¹ derivado (Tabla 6.9.).

6.3.2.2. Restitución de una concentración 3 mM de *t*-BuOOH cada hora

Debido a la reacción secundaria observada en el reactor en “batch” con *t*-BuOOH 40 mM se procedió a bajar la concentración de peróxido a 3 mM y se añadió un pulso de *t*-BuOOH cada hora equivalente a la restitución de una concentración 3 mM en el reactor. Se decidió restituir una concentración 3 mM cada hora basándose en la experiencia previa en el grupo en oxidación de aminoalcoholes utilizando la CPO (Pešić, López, and Álvaro 2012). Así pasada una hora de reacción se añadió un pulso de 10 μL de una solución stock 3 M de *t*-BuOOH a los 10 mL de reacción, tanto para la reacción con el co-inmovilizado como para la reacción en soluble. Pasadas dos horas de reacción se observó una

conversión de β -OH del 3% y no se detectó peróxido acumulado en el medio tanto en la reacción en soluble como con el derivado co-inmovilizado. Nuevamente al medir la actividad del derivado no se detectó actividad ni de FSA ni de CPO (Tabla 6.9.).

Estos resultados descartaron al *t*-BuOOH como agente oxidante en la síntesis de pre-D-fagomina utilizando el derivado co-inmovilizado en esta configuración de reactor. Ante este hecho se decidió cambiar el *t*-BuOOH por el peróxido de hidrogeno como agente oxidante.

6.3.2.3. Restitución de una concentración 3 mM de H₂O₂ cada hora

De la misma forma que con el *t*-BuOOH, se procedió a realizar una prueba de la misma reacción empleando pulsos de peróxido de hidrogeno equivalentes a restituir una concentración 3 mM cada hora. Para ello se montaron en paralelo la reacción con el derivado co-inmovilizado y con las enzimas solubles con la finalidad de poder comparar los resultados de ambas reacciones. Tras dos horas de reacción la conversión de alcohol fue menor al 3% para el derivado co-inmovilizado y al 4% para las enzimas solubles. Una vez finalizada la reacción se determinaron 1,7 U FSA y 4,3 U CPO mL⁻¹ derivado (Tabla 6.9.).

Tabla 6.9. Resumen de las reacciones de síntesis de pre-D-fagomina en “batch”. Se expresa el biocatalizador empleado, el peróxido añadido, su concentración inicial y la adición o no de pulsos de peróxido para restituir una concentración 3 mM cada hora. Además, se expresa la conversión de β -OH y la detección o no de actividad CPO y FSA al final de la reacción.

Biocatalizador	Peróxido	Concentración inicial (mM)	Pulso	Conversión (%)	Actividad FSA	Actividad CPO
Co-inmovilizado	<i>t</i> -BuOOH	40	No	0	No	No
Enzimas solubles	<i>t</i> -BuOOH	40	No	6	No	No
Co-inmovilizado	<i>t</i> -BuOOH	3	Si	3	No	No
Enzimas solubles	<i>t</i> -BuOOH	3	Si	3	No	No
Co-inmovilizado	H ₂ O ₂	40	No	2	No	Si
Enzimas solubles	H ₂ O ₂	40	No	3	No	Si
Co-inmovilizado	H ₂ O ₂	3	Si	3	Si	Si
Enzimas solubles	H ₂ O ₂	3	Si	4	Si	Si

Estos resultados descartaron definitivamente la configuración del reactor en “batch” para la síntesis de pre-D-fagomina utilizando el derivado co-inmovilizado y se decidió cambiar la configuración del reactor a un reactor en lecho fijo como la alternativa para este proceso.

6.3.3. Reacción acoplada en reactor de lecho fijo operado en discontinuo

La baja velocidad de oxidación del β -OH catalizada por la CPO y la rápida desactivación de la FSA resultaron ser los principales factores limitantes detectados en la síntesis de pre-D-fagomina utilizando el derivado co-inmovilizado en el reactor en “batch”. Con la finalidad de aumentar la concentración de las enzimas en la reacción se cambió la configuración del reactor a un reactor de lecho fijo (Figura 6.3.).

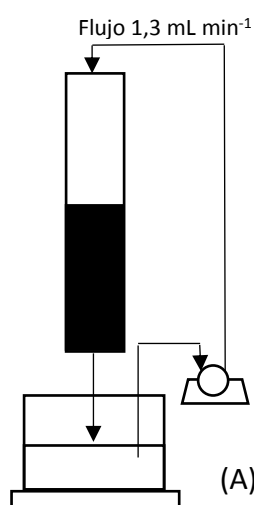


Figura 6.3. Reactor de lecho fijo: (A) Esquema del reactor y (B) foto del reactor con derivado co-inmovilizado. El caudal se estableció en $1,3 \text{ mL min}^{-1}$ ya que es el caudal mínimo que permite la bomba.

6.3.3.1. Estudio de la capacidad del derivado co-inmovilizado para catalizar la adición aldólica

Durante el estudio de la reacción con el derivado co-inmovilizado se observó que la cantidad de CPO que se ofrecía a la reacción era insuficiente para oxidar el β -

OH de forma eficiente, pero no se pudo evaluar si la cantidad de FSA en el derivado era suficiente para catalizar la síntesis de pre-D-fagomina ya que no había producción de β -CHO en la primera reacción. Con la finalidad de evaluar si el derivado co-inmovilizado era capaz de catalizar la adición de la DHA al β -CHO se empaquetó el co-inmovilizado en el reactor en lecho fijo y se dispuso a realizar la reacción aldólica en las condiciones óptimas propuestas para la reacción acoplada, asumiendo un rendimiento de β -CHO del 100%, para determinar así si la cantidad de FSA inmovilizada era suficiente para catalizar la síntesis de pre-D-fagomina o si sería el paso limitante de la velocidad de reacción en esta configuración de reactor. La reacción se llevó a cabo en el reactor de lecho fijo siguiendo las condiciones expuestas en la tabla 6.10.

Tabla 6.10. Condiciones de la reacción aldólica catalizada por el derivado co-inmovilizado.

La reacción se llevó a cabo con 98 unidades de FSA y 2450 U de CPO mL⁻¹ de reacción a 25 °C, en tampón MES 100 mM pH 6,5 recirculando el medio durante 24 h a un caudal de 1,3 mL min⁻¹.

Reactivos	Unidades	Valor
β -CHO	mM	16,0
DHA	mM	72,6
<i>t</i> -BuOOH	mM	39,9
FSA	U mL ⁻¹	97,9
CPO	U mL ⁻¹	2450

La reacción aldólica utilizando el derivado co-inmovilizado en lecho fijo alcanzó la conversión total de β -CHO al primer minuto de reacción, demostrando así que la cantidad de FSA en este reactor era suficiente para catalizar la reacción acoplada sin ser el paso limitante de la velocidad del sistema en estas condiciones.

6.3.3.2. Síntesis de pre-D-fagomina en las condiciones del modelo

Operar en el reactor de lecho fijo permitió aumentar la concentración de las enzimas en la reacción hasta prácticamente la mitad de la concentración propuesta por el modelo. Por ello se procedió a realizar la reacción acoplada en este reactor siguiendo las condiciones óptimas propuestas por el modelo (Tabla 6.11.) a 25 °C en tampón MES 100 mM a pH 6,5 recirculando el medio a través de la columna con un caudal de 1,3 mL min⁻¹, caudal mínimo permitido por la bomba.

Tabla 6.11. Valores óptimos propuestos por el modelo para la síntesis de pre-D-fagomina catalizada por CPO/FSA en soluble y condiciones de la reacción en el reactor de lecho fijo.

Reactivos	Modelo	Reactor lecho fijo
β-OH	16,0 mM	16,0 mM
DHA	72,6 mM	72,6 mM
<i>t</i> -BuOOH	39,9 mM	39,9 mM
FSA	200 U mL ⁻¹	97,9 U mL ⁻¹
CPO	5000 U mL ⁻¹	2450 U mL ⁻¹

Al realizar la reacción acoplada en el reactor de lecho fijo con el biocatalizador co-inmovilizado se detectó producción de pre-D-fagomina, lo cual no se observó en la reacción en el reactor en “batch” en las mismas condiciones y utilizando el mismo biocatalizador. Esta diferencia se explicó al disponer de una concentración de enzimas cinco veces mayor en el reactor de lecho fijo que en la configuración de reactor anterior.

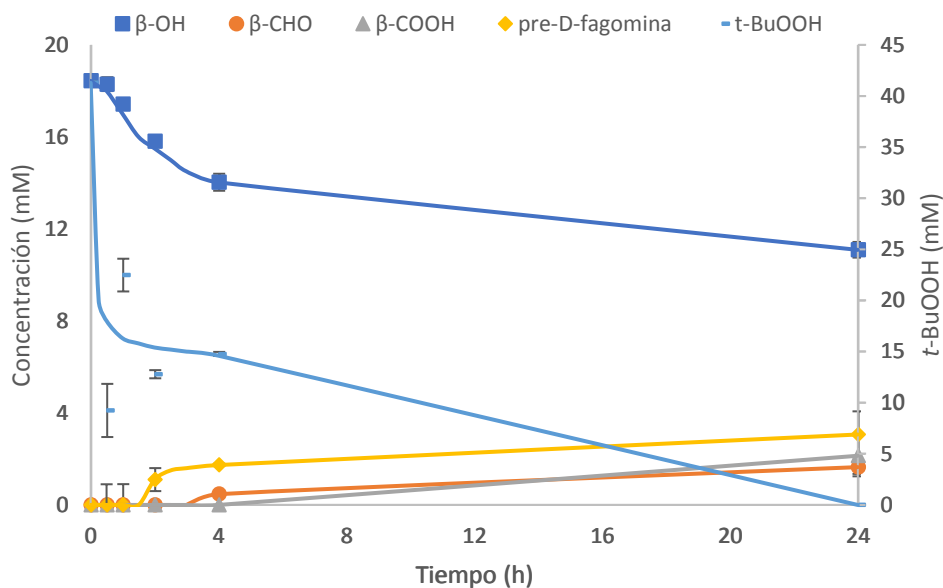


Figura 6.4. Curso de la reacción acoplada utilizando el derivado co-inmovilizado con 98 U de FSA y 2450 U de CPO mL⁻¹ de reacción. La reacción se llevó a cabo a 25 °C, en tampón MES 100 mM pH 6,5 recirculando el medio durante 24 h a un caudal de 1,3 mL min⁻¹.

Al analizar el curso de la reacción (Figura 6.4.) se observó que la velocidad de reacción fue máxima hasta las 2 horas de reacción, a partir de este punto baja la velocidad tanto de la oxidación del alcohol como de la adición aldólica. A partir de las 4 horas se manifestó la progresiva desactivación de la FSA ya que se comenzó a detectar acumulación de aldehído y ácido en el medio de reacción. Esta acumulación de aldehído y ácido aumentó con el transcurso de la reacción ya que la FSA se desactivó mucho más rápido que la CPO y la aldolasa era incapaz de convertir el β-CHO que se iba formando. Además, se observó el desacoplamiento de la reacción debido a que la CPO descompone el *t*-BuOOH sin oxidar ningún compuesto, hecho que se manifiesta ya que se consumen 400 μmoles de peróxido y solo 60 μmoles de β-OH.

Esta reacción alcanzó un rendimiento de pre-D-fagomina del 16,6% a las 24 horas, frente al 11% que se alcanzó en una hora al realizar la reacción con enzimas solubles en las mismas condiciones óptimas propuestas por el modelo. Al comparar ambos resultados se observó que la reacción soluble duraba una hora debido a que pasado este tiempo toda la FSA se había desactivado en la reacción, mientras que con el derivado co-inmovilizado la reacción se pudo mantener hasta las 24 horas ya que la desactivación de la enzima era mucho

más lenta. Debido a ello se concluyó que el derivado co-inmovilizado aumenta considerablemente la estabilidad de la FSA frente al producto de la reacción entre CPO y *t*-BuOOH. Además, se pudo confirmar que la oxidación del β -OH con el derivado co-inmovilizado era mucho más lenta que la oxidación catalizada por la CPO soluble debido a la presencia de problemas de transferencia de materia en el derivado. La baja velocidad de oxidación limitaba la reacción acoplada ya que en el apartado 6.3.3.1. se comprobó que la cantidad de FSA en el reactor de lecho fijo convertía una concentración de aldehído equivalente a un 100% de conversión de β -OH en un minuto de reacción. Así, se propuso estudiar del efecto de modificar las proporciones de CPO y FSA en el derivado co-inmovilizado con la finalidad de aumentar el rendimiento de la reacción.

6.3.3.3. Estudio de la proporción de ambas enzimas en el derivado

Debido a que la oxidación del β -CHO es el paso limitante de la reacción y que la FSA es capaz de convertir todo el aldehído en menos de un minuto, se procedió a aumentar la proporción CPO/FSA con la intención de aumentar la velocidad de oxidación del alcohol y así producir la mayor cantidad posible de β -CHO antes de la desactivación total de la aldolasa. En el apartado anterior (6.3.3.2.) se estudió el derivado con 196 U de FSA (15 mg de FSA mL⁻¹ de soporte) y 4900 U de CPO mL⁻¹ de soporte (10 mg de CPO mL⁻¹ de soporte) y en este se estudiarán otros dos derivados con distintas proporciones CPO/FSA.

A) Derivado con 163,2 U de FSA (12,5 mg de FSA mL⁻¹ de soporte) y 6125 U de CPO mL⁻¹ de soporte (12,5 mg de CPO mL⁻¹ de soporte)

Al aumentar la concentración de CPO a 3062,5 U por mililitro de reacción se observó un aumento de la velocidad inicial de oxidación del β -OH (14,8 μ moles h⁻¹) con respecto al derivado anterior (12 μ moles h⁻¹). Al mismo tiempo de reacción, 24 horas, en esta reacción se alcanzó un rendimiento de pre-D-fagomina mayor, del 21,9%.

En el curso de la reacción (Figura 6.5.) se observó que la CPO descompone el *t*-BuOOH a una velocidad mucho mayor que la de la reacción de oxidación, así pasadas 4 horas se han consumido los 400 μ moles de peróxido y solo se han

consumido 40 μmoles de alcohol. Además, se observó que la CPO oxida el aminoalcohol y el aminoaldehído incluso cuando el peróxido se ha agotado del medio, pero a una velocidad mucho menor. Debido a ello se procedió a añadir un pulso de peróxido a las 19 horas de reacción y la velocidad de oxidación volvió a aumentar, por lo cual se propuso estudiar la adición continua de *t*-BuOOH al medio durante la reacción, con la finalidad de evitar que la reacción de oxidación se detenga al agotarse el *t*-BuOOH en el medio, a las 4h de reacción.

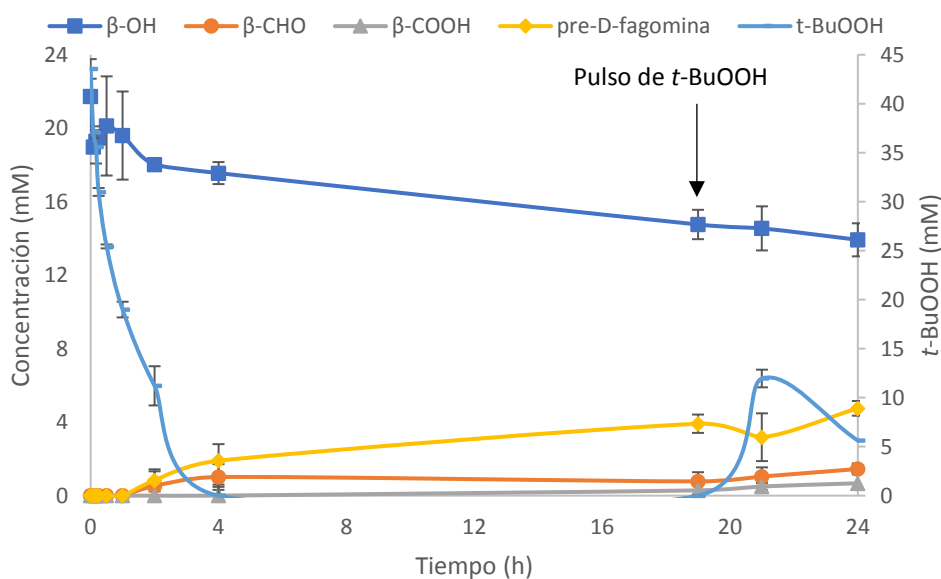


Figura 6.5. Curso de la reacción acoplada utilizando el derivado co-inmovilizado a con 81,6 U de FSA y 3062,5 U de CPO mL^{-1} de reacción. La reacción se llevó a cabo a 25 $^{\circ}\text{C}$, en tampón MES 100 mM pH 6,5 recirculando el medio durante 24 h a un caudal de 1,3 mL min^{-1} . Se realizó un pulso de *t*-BuOOH a las 19 h con la intención de restituir una concentración 40 mM.

En este derivado se disminuyó las unidades de FSA por lo que se detectó la acumulación de aldehído en el medio antes que en la reacción anterior. Finalmente se observó que a tras 24 horas se acumulaba β -CHO y β -COOH, por lo que la FSA, la cual hemos bajado su concentración en el reactor, se ha desactivado finalmente durante la reacción, hecho que se comprobó al no detectarse actividad de FSA en el derivado al final de la reacción.

B) Derivado con 130,6 U de FSA (10 mg de FSA mL⁻¹ de soporte) y 7350 U de CPO mL⁻¹ de soporte (15 mg de CPO mL⁻¹ de soporte)

Al aumentar de nuevo la proporción CPO/FSA en el derivado se observó un nuevo aumento en la velocidad inicial de oxidación del β -OH (17,6 $\mu\text{moles h}^{-1}$), lo cual permitió conseguir un rendimiento del 23,5% a las 20 horas de reacción. Así, este derivado catalizó la reacción acoplada alcanzando un mayor rendimiento de pre-D-fagomina en un menor tiempo de reacción.

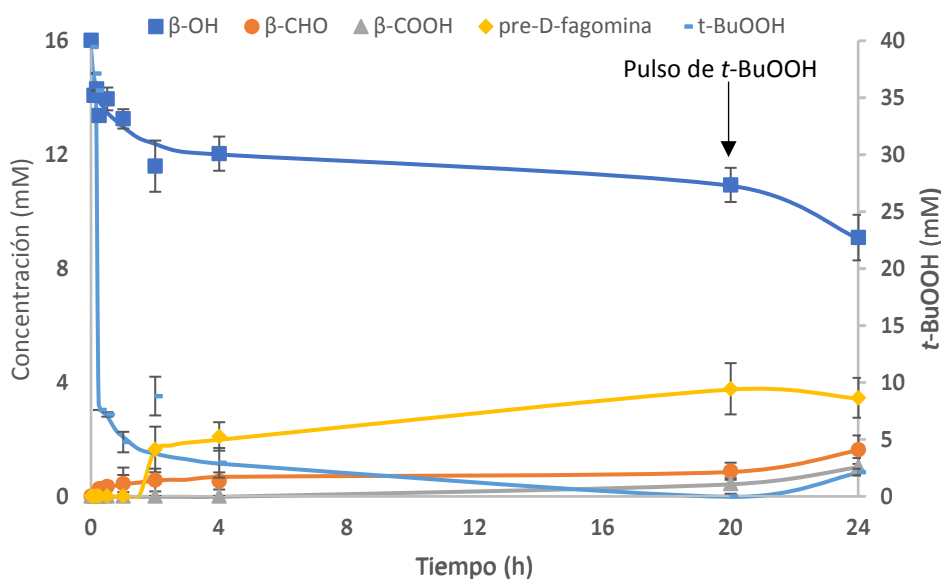


Figura 6.6. Curso de la reacción acoplada utilizando el derivado co-inmovilizado con 65,3 U de FSA y 3675 U de CPO mL⁻¹ de reacción. La reacción se llevó a cabo a 25 °C, en tampón MES 100 mM pH 6,5 recirculando el medio durante 24 h a un caudal de 1,3 mL min⁻¹. Se realizó un pulso de t-BuOOH a las 20 h con la intención de restituir una concentración 40 mM.

En esta reacción (Figura 6.6.) se observó que al volver a bajar la concentración de FSA en el reactor se detectó acumulación de aldehído desde la primera media hora. A partir de las 2 horas, la velocidad de ambas reacciones baja, por lo que a las 20 horas se añadió un pulso de peróxido con la intención de restituir una concentración 40 mM en el reactor y se observó que la velocidad de oxidación aumentó rápidamente al consumirse 1,6 μmoles de β -OH en 4 horas y detectarse acumulación tanto de aldehído como ácido al final de la reacción. Se deduce que a las 20 horas de reacción se ha desactivado la FSA ya que al aumentar la producción de β -CHO no aumentó el rendimiento de pre-D-fagomina. Nuevamente se observó que, al añadir un pulso de peróxido, a las 20 horas de

reacción, la velocidad de oxidación aumentó, por lo cual el siguiente paso a estudiar fue el sistema de adición de peróxido para optimizar la síntesis de pre-D-fagomina.

Se seleccionó el derivado con 130,6 U de FSA y 7350 U de CPO mL⁻¹ de soporte como la proporción más adecuada de ambas enzimas en el biocatalizador para la síntesis de pre-D-fagomina ya que alcanzó el mayor rendimiento de pre-D-fagomina (23,5%) en un menor periodo de tiempo (20 horas). Esta proporción de enzimas aumentó la velocidad de oxidación del alcohol, produciendo mayor cantidad de aldehído en el reactor antes de que ocurra la desactivación total de la FSA (Tabla 6.12.).

Tabla 6.12. Resumen del estudio de la proporción de FSA y CPO en el derivado co-inmovilizado. Se expresa las unidades de cada enzima por mL de soporte, el rendimiento de pre-D-fagomina y el tiempo de reacción. La reacción se llevó a cabo a 25 °C, en tampón MES 100 mM pH 6,5 recirculando el medio durante 24 h a un caudal de 1,3 mL min⁻¹.

Derivado	FSA (U mL ⁻¹)	CPO (U mL ⁻¹)	Pre-D-fagomina (%)	Tiempo (h)
A	196,0	4900	16,6	24
B	163,2	6425	21,9	24
C	130,6	7350	23,5	20

En estas reacciones se observaron los principales problemas del sistema multienzimático descritos por el modelo. La CPO oxidó el β-OH a aldehído y volvió a oxidar el β-CHO hasta ácido por lo que se detectó acumulación de β-COOH como producto secundario de la reacción. Nuevamente se detectó la aparición de la reacción secundaria de descomposición del *t*-BuOOH catalizada por la CPO. Además, se observó la desactivación de la FSA en presencia de CPO y *t*-BuOOH, lo cual se manifestó al acumularse β-CHO en el medio de reacción, ya que en el apartado 6.3.3.1. se observó que el derivado es capaz de convertir todo el β-CHO formado en la primera reacción en menos de un minuto.

6.3.3.4. Efecto de la adición de *t*-BuOOH al medio

Tras el estudio del sistema multienzimático utilizando el derivado co-inmovilizado se determinó que el paso limitante del proceso era la oxidación del β-OH por la

CPO, ya que era la reacción con menor velocidad. La CPO requería la adición de *t*-BuOOH al medio para poder oxidar el alcohol, pero además de esta reacción se detectó una reacción secundaria entre el peróxido y la CPO sin necesidad de la presencia del alcohol. El *t*-BuOOH también tenía un papel importante en la desactivación de las enzimas ya que era el responsable de la desactivación de la CPO y el producto de la reacción espontánea entre CPO y *t*-BuOOH era el compuesto que desactivaba la FSA durante la reacción. Estos factores justificaron que la concentración del peróxido en el medio era un parámetro clave en la productividad del sistema.

Con la finalidad de mejorar el proceso se propuso estudiar el efecto de la adición del peróxido al medio de forma continua mediante una microbureta para evitar la acumulación de peróxido y garantizar su presencia durante todo el tiempo de reacción (Figura 6.7.).

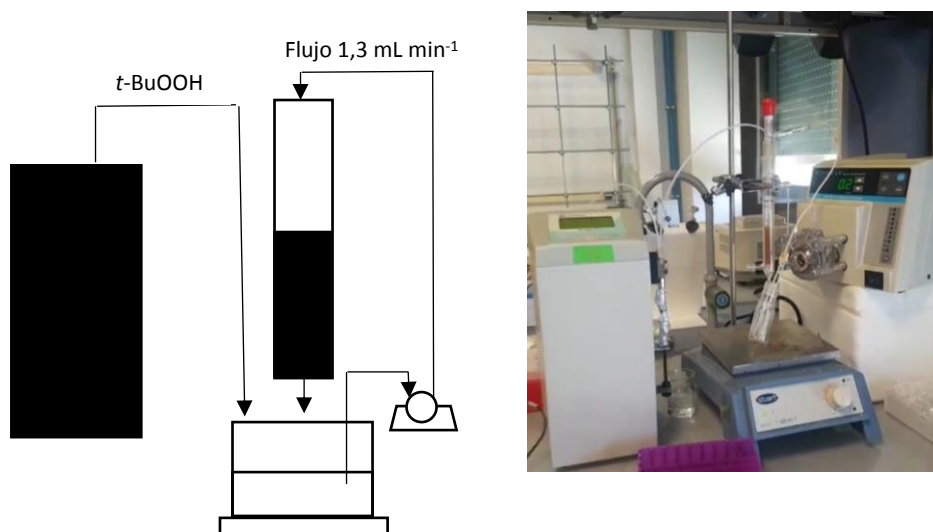


Figura 6.7. Esquema del reactor de lecho fijo acoplado a la microbureta para la adición continua de *t*-BuOOH.

Tabla 6.13. Diseño del estudio de la adición continua de *t*-BuOOH al medio. Se expresan los parámetros estudiados en estas reacciones: concentración inicial de peróxido, mmoles de peróxido adicionados cada hora, volumen del pulso de peróxido y el tiempo entre pulsos.

Reacción	Concentración inicial <i>t</i> -BuOOH (mM)	Adición <i>t</i> -BuOOH (mmoles h ⁻¹)	Volumen pulso (μL)	Tiempo entre pulsos (min)
A	16	27,2	5	17
B	16	27,2	1	3
C	16	13,6	1	3
D	16	45,3	1	3
E	0	27,2	1	3

- Adición de 27,2 mmoles de *t*-BuOOH cada hora mediante pulsos cada 17 minutos

El estudio de la adición de peróxido se inició estudiando la adición continua de 27,2 mmoles de *t*-BuOOH mediante pulsos de 5 μL de peróxido cada 17 min, intervalo máximo que permitía la microbureta. La adición de estos pulsos de una solución stock 1,36 M hacía el medio permitía la restitución teórica de una concentración 6 mM de peróxido en el medio cada hora. Esta reacción se realizó en las mismas condiciones que en el estudio de la proporción de ambas enzimas en el derivado co-inmovilizado modificando únicamente la concentración de peróxido para estudiar el efecto de su adición continua en la reacción. La reacción se empezó a una concentración inicial de *t*-BuOOH de 16 mM y se fue añadiendo el peróxido de forma continua durante 45 horas.

Al adicionar el *t*-BuOOH de forma continua se observó que la pre-D-fagomina se producía de forma ininterrumpida durante 45 horas, ya que la oxidación del β-OH no se detenía al no agotarse el peróxido del medio, como ocurría durante el estudio de la proporción de ambas enzimas en el derivado co-inmovilizado. Al inicio de la reacción se observó una rápida producción de pre-D-fagomina sin acumulación de productos secundarios, debido a la concentración inicial de peróxido en el medio, pero a partir de la media hora la velocidad de reacción bajó y la producción de pre-D-fagomina se mantuvo prácticamente lineal hasta las 45 horas de reacción.

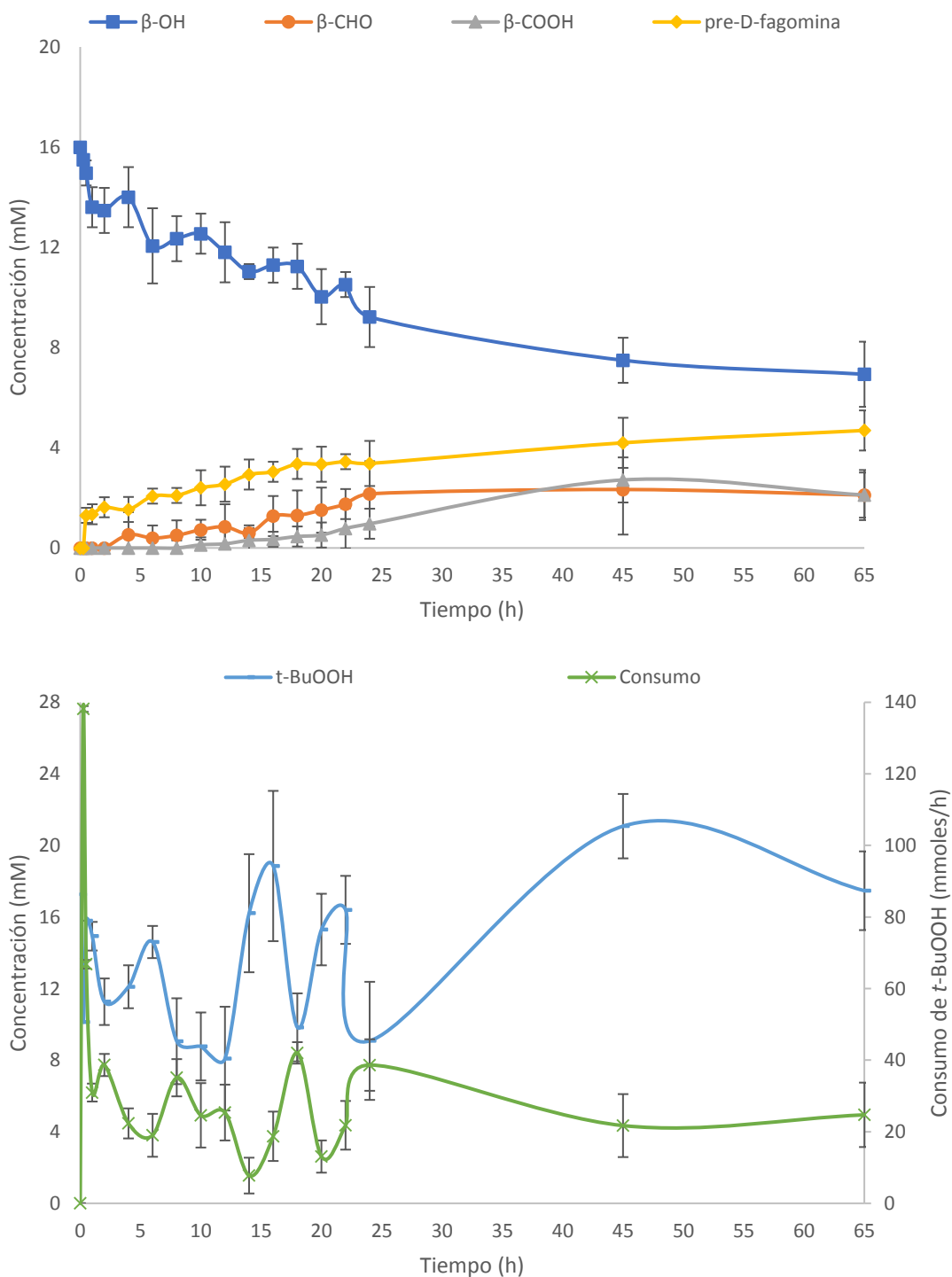


Figura 6.8. Curso de la reacción acoplada utilizando el derivado co-inmovilizado con 65,3 U de FSA y 3675 U de CPO mL⁻¹ de reacción con una adición de 27,2 mmoles de peróxido cada hora mediante pulsos cada 17 min. La reacción se llevó a cabo a 25 °C, en tampón MES 100 mM pH 6,5 recirculando el medio durante 45 h a un caudal de 1,3 mL min⁻¹.

Estudiando el curso de la reacción (Figura 6.8.) se comenzó a detectar acumulación de β-CHO a las cuatro horas de reacción, por lo que a partir de este punto la velocidad de de oxidación era mayor que la velocidad de la adición

aldólica, poniendo en manifiesto la desactivación de la FSA. Al irse desactivando la FSA el derivado era incapaz de convertir todo el β -CHO producido in situ en pre-D-fagomina, por lo cual la CPO comenzó a oxidar el β -CHO y comenzó a acumularse β -COOH en el medio, el cual fue detectado en reacción a partir de las 10 horas.

Al comparar esta reacción con la reacción sin adición continua de peróxido empleando el mismo derivado co-inmovilizado se observó que la producción de pre-D-fagomina a las 24 horas era prácticamente la misma en ambas, un 21%, por lo que aparentemente no se ganaba en producción añadiendo el peróxido de esta forma. Con la finalidad de entender estos resultados se procedió a estudiar la evolución de la concentración de *t*-BuOOH y su consumo durante la reacción y se observó que esta configuración de adición en pulsos cada 17 minutos favorecía la aparición de picos de alta concentración de peróxido que podían afectar a la estabilidad de ambas enzimas en la reacción, por lo cual se decidió realizar otra reacción añadiendo nuevamente 27,2 mmoles cada hora, pero con adiciones más cortas, asumiendo una adición continua para evitar la acumulación de peróxido en el medio de reacción.

La reacción se mantuvo durante 45 horas hasta que la elevada acumulación de productos secundarios, 14,5% β -CHO y 16,9% β -COOH, indicó que la FSA ya no era capaz de catalizar la adición aldólica alcanzando así un rendimiento máximo del 26,2% y una conversión de β -OH del 53,4%.

- Adición de 27,2 mmoles de *t*-BuOOH cada hora mediante pulsos cada 3 minutos

Con la finalidad de evitar la aparición de picos de *t*-BuOOH se acortó el intervalo entre pulsos al mínimo posible que nos permitía el aparato y se procedió a añadir 1 μ L de una solución nueva de *t*-BuOOH 1,36 M cada tres minutos al medio de reacción, permitiendo así una restitución teórica de una concentración 6 mM cada hora.

El montaje del reactor se realizó de la misma forma y en las mismas condiciones que en la reacción con pulsos cada 17 minutos con la finalidad de que la única variable modificada en este estudio fuese el tiempo entre los pulsos de *t*-BuOOH. En esta reacción (Figura 6.9.) nuevamente se observó una rápida producción de pre-D-fagomina al inicio de reacción y posteriormente la velocidad de producción fue disminuyendo con el tiempo. Al comparar esta reacción con las dos reacciones anteriores se observó que a las 24 horas se llegaba a una conversión de pre-D-fagomina mayor, un 27% frente al 21% de los casos anteriores. Este resultado demostró que la adición del *t*-BuOOH a pulsos más pequeños y en menores intervalos de tiempo evitaba la acumulación del peróxido en el medio y la consecuente desactivación del biocatalizador. Para comprobar este supuesto se estudió el consumo de peróxido en la reacción y se observó que al inicio de la reacción el consumo era elevado, en torno a 80 mmoles h⁻¹, pero fue disminuyendo gradualmente hasta estabilizarse en un consumo constante de 27 mmoles h⁻¹. Esta variación del consumo se explicó ya que la reacción empezó con una concentración inicial de peróxido de 16 mM y a partir de ahí el aporte de peróxido fue continuo a 24 mmoles cada hora, por lo que no se acumulaba en el medio.

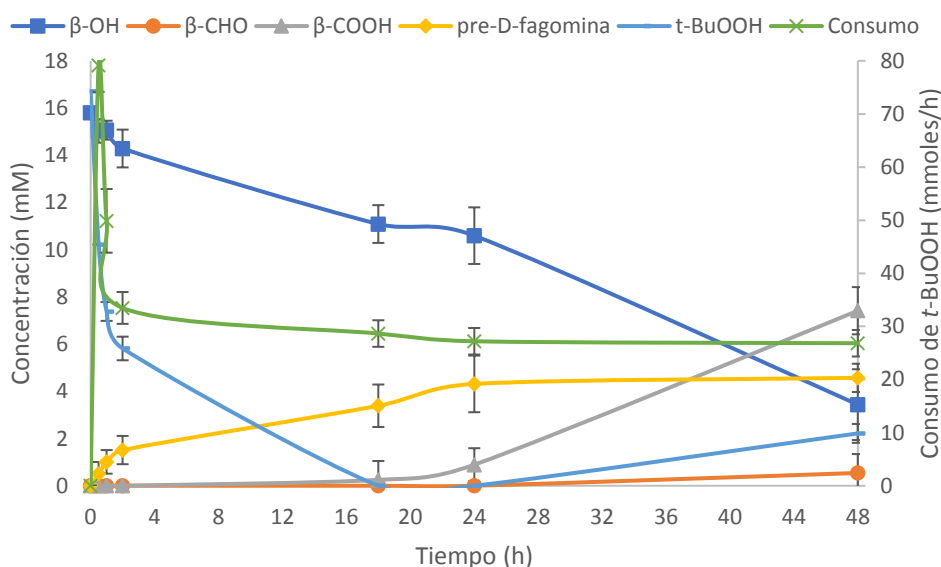


Figura 6.9. Curso de la reacción acoplada utilizando el derivado co-inmovilizado con 65,3 U de FSA y 3675 U de CPO mL⁻¹ de reacción con una adición de 27,2 mmoles de peróxido cada hora mediante pulsos cada 3 min. La reacción se llevó a cabo a 25 °C, en tampón MES 100 mM pH 6,5 recirculando el medio durante 48 h a un caudal de 1,3 mL min⁻¹.

Además de conseguir una mayor concentración de producto y no detectarse *t*-BuOOH en el medio, a las 24 horas de reacción no se detectó presencia de β -CHO y solo se detectó un 6% de β -COOH, por lo cual esta configuración de reactor permitió disminuir la producción de productos secundarios y al no acumularse aldehído se consiguió aumentar la estabilidad de la FSA en reacción (Figura 6.9.).

La reacción se mantuvo hasta las 48 horas con la intención de observar si el derivado era capaz de alcanzar una conversión mayor de pre-D-fagomina pero el rendimiento de producto aumentó solo un 2% desde las 24 hasta las 48 horas, llegando a un rendimiento final del 29%. En cambio, el rendimiento de ácido aumentó de un 6% a las 24 horas a un 47% a las 48, por lo cual se dedujo que la FSA prácticamente se había desactivado a las 24 horas y por ello el alcohol fue convertido a ácido. Además de la acumulación de ácido, a las 48 horas se detectó una concentración de *t*-BuOOH de 2,2 mM, por lo cual al final de la reacción la CPO ya no era capaz de convertir todo el peróxido que se añadía en el medio. Al finalizar la reacción se observó que el derivado co-inmovilizado había cambiado de color desde un marrón oscuro al inicio de la reacción hasta un amarillo claro al final de esta y no se detectó actividad de ninguna de las enzimas dos enzimas en el biocatalizador (Figura 6.10.).

La adición continua de peróxido permitió alcanzar un rendimiento global mayor tras 24 horas de reacción que en los anteriores casos a pesar de que la conversión de β -OH fue menor, un 32,9% frente al 43,3% de la reacción sin adición continua de *t*-BuOOH y la de pulsos cada 17 minutos. Esto demostró que la velocidad de adición del peróxido tenía un papel fundamental no solo en la velocidad de oxidación sino, también en la estabilidad de las enzimas en el medio de reacción y por ello se propuso estudiar la misma reacción utilizando el mismo derivado co-inmovilizado en las mismas condiciones, pero variando la cantidad de mmoles de peróxido que se añaden cada hora, manteniendo los pulsos de 1 μ L cada 3 minutos.

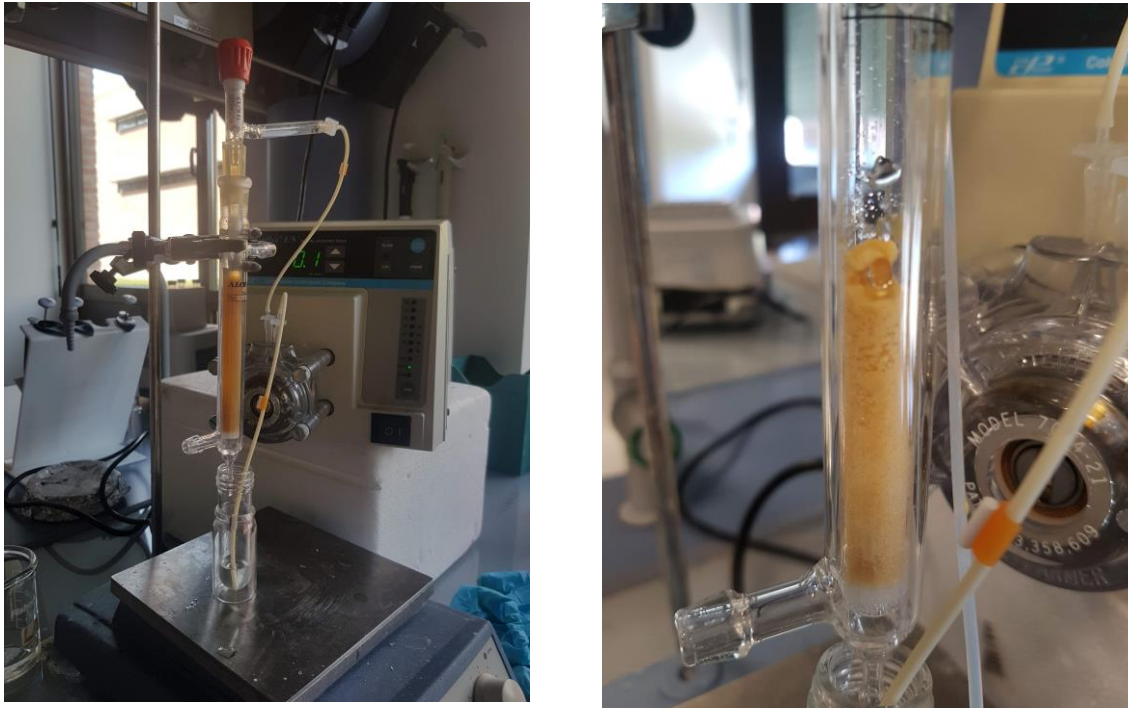


Figura 6.10. Derivado co-inmovilizado antes de la reacción (izquierda) y después de la reacción (derecha).

- Adición de 13,6 mmoles de *t*-BuOOH cada hora mediante pulsos cada 3 minutos

Se dispuso a realizar una reacción bajando la adición de peróxido a 13,6 mmoles cada hora con la intención de evaluar si un aporte menor de *t*-BuOOH permitiría alcanzar una mayor producción pre-D-fagomina. Esta hipótesis se basó en que las enzimas deberían ser más estables al estar expuestas a una menor concentración de *t*-BuOOH en el medio. Con este objetivo se realizó el mismo montaje que en la reacción anterior, pero la concentración del stock de *t*-BuOOH se bajó a 0,68 M, para que así realizando exactamente la misma adición a pulsos cada 3 minutos se añadiesen 13,6 mmoles cada hora.

La reacción acoplada con esta adición de peróxido (Figura 6.11.) está limitada por la baja velocidad de la oxidación del β -OH, mucho más lenta que la adición aldólica a esta carga enzimática. Al bajar el caudal de adición de peróxido se favoreció la estabilidad de las enzimas durante la reacción ya que estaban expuestas a una menor cantidad de equivalentes de *t*-BuOOH. A su vez la disminución del caudal de adición de peróxido disminuyó la velocidad de la

oxidación de la CPO y por consiguiente la del sistema multienzimático en general.

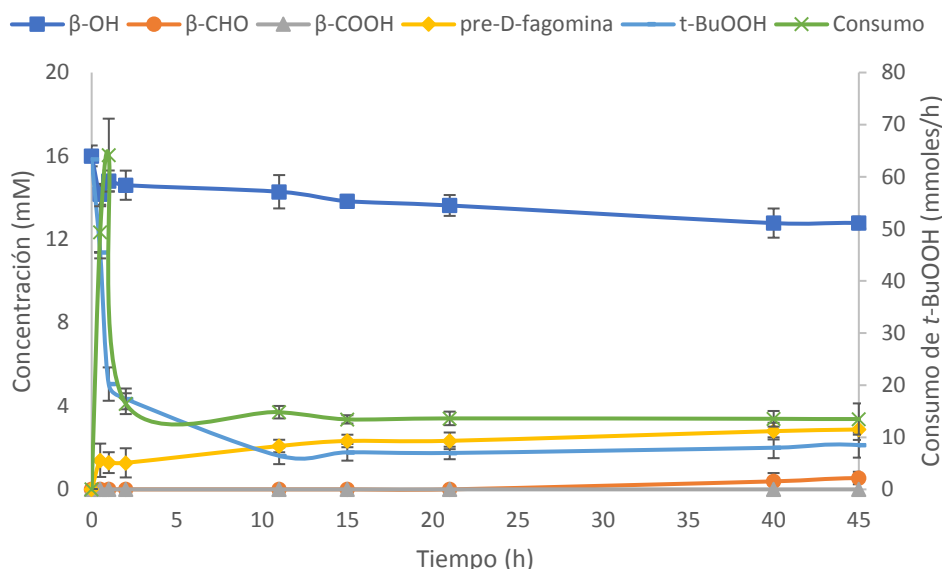


Figura 6.11. Curso de la reacción acoplada utilizando el derivado co-inmovilizado con 65,3 U de FSA y 3675 U de CPO mL⁻¹ de reacción con una adición de 13,6 mmoles de peróxido cada hora mediante pulsos cada 3 min. La reacción se llevó a cabo a 25 °C, en tampón MES 100 mM pH 6,5 recirculando el medio durante 45 h a un caudal de 1,3 mL min⁻¹.

Tras 45 horas, solo se alcanzó un rendimiento de pre-D-fagomina del 18% frente al 29% que se alcanzaba en 48 horas con una adición de *t*-BuOOH de 27,2 mmoles cada hora. En este punto se alcanzó una conversión del aminoalcohol del 20% y un rendimiento de aldehído del 3,4%, sin detectarse la presencia de ácido en el medio. Estos resultados permitieron deducir que la FSA seguía activa en el derivado, tal y como se esperaba al bajar el caudal de peróxido. Se observó que al inicio de la reacción el consumo de *t*-BuOOH era elevado (64 mmoles h⁻¹) debido a la concentración inicial de peróxido, pero acabó estabilizándose en un consumo de 13,5 mmoles h⁻¹, indicando que está limitado por la velocidad de adición.

El aumento de estabilidad de las enzimas no compensó la disminución de la velocidad de oxidación del β-CHO ya que se requería de un tiempo mucho mayor para alcanzar un rendimiento de pre-D-fagomina igual o mayor al alcanzado con la adición de 27,2 mmoles cada hora, por lo que la productividad global del sistema se vería afectada debido al elevado tiempo de reacción. Al final de la

reacción el derivado co-inmovilizado no había cambiado de color y aun se detectaba actividad tanto de FSA como de CPO, por lo que se comprobó que el bajar el caudal de *t*-BuOOH aumentaba la estabilidad del biocatalizador.

- Adición de 45,3 mmoles de *t*-BuOOH cada hora mediante pulsos cada 3 minutos

El estudio de la adición de peróxido demostró que bajar el caudal de adición a 13,6 mmoles cada hora resultaba en una menor productividad del sistema debido a los elevados tiempos de reacción. Por lo cual se decidió estudiar el comportamiento del sistema al aumentar el caudal de adición de *t*-BuOOH a 45,3 mmoles cada hora, permitiendo así una restitución teórica de una concentración 10 mM cada hora. El aumento de la adición de peróxido debería aumentar la velocidad de oxidación de la CPO y por lo tanto la velocidad del sistema, por lo que si la FSA en el co-inmovilizado fuese lo suficientemente estable podrían conseguirse mayores rendimientos en menores periodos de tiempo, aumentando así la productividad del sistema.

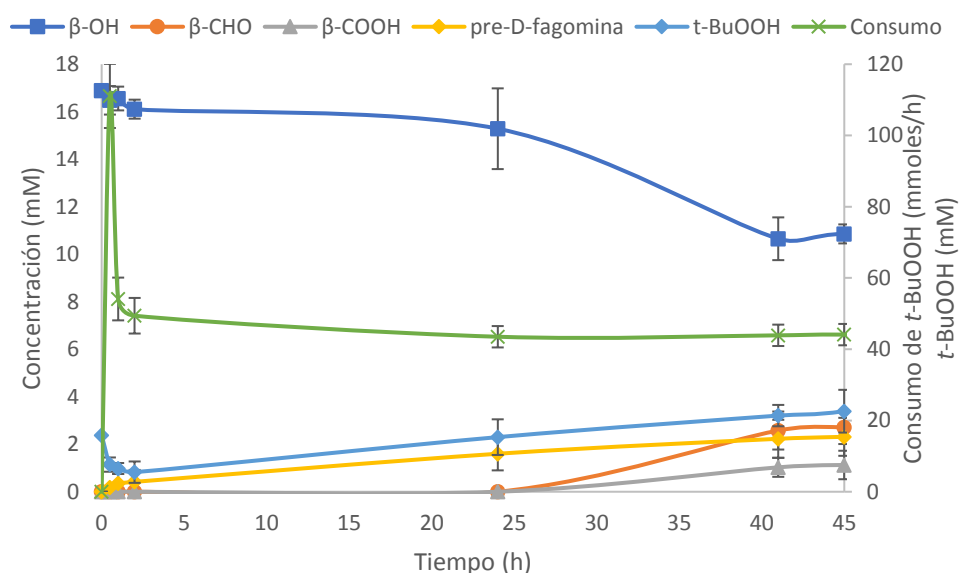


Figura 6.12. Curso de la reacción acoplada utilizando el derivado co-inmovilizado con 65,3 U de FSA y 3675 U de CPO mL⁻¹ de reacción con una adición de 45,3 mmoles de peróxido cada hora mediante pulsos cada 3 min. La reacción se llevó a cabo a 25 °C, en tampón MES 100 mM pH 6,5 recirculando el medio durante 45 h a un caudal de 1,3 mL min⁻¹.

Se observó que al aumentar la adición de *t*-BuOOH se alcanzó un rendimiento de pre-D-fagomina a las 45 horas del 14%, menor aún que el 18% alcanzado añadiendo 13,6 mmoles cada hora en el mismo tiempo. Al estudiar el curso de la reacción (Figura 6.12.) se vio que el elevado caudal aportaba una cantidad de *t*-BuOOH por hora mayor al consumo de *t*-BuOOH por parte de la CPO, por lo que, a diferencia de las otras dos reacciones, siempre existía una concentración detectable de peróxido en el medio. El *t*-BuOOH se fue acumulando hasta alcanzar la concentración inicial a las 24 horas y superarla en un 42,7% a las 45 horas de reacción.

Esta elevada concentración de peróxido en el medio favoreció la desactivación tanto de la FSA como de la CPO y por ello se llegó a un rendimiento de reacción tan bajo. Al estudiar el consumo de peróxido se observó que el consumo inicial era de 111,1 mmoles por hora y después se estabiliza en 44 mmoles por hora, incluso al detenerse la reacción de oxidación, lo cual vuelve a demostrar que existe una reacción espontánea entre la CPO y el *t*-BuOOH sin necesidad de oxidar ningún sustrato.

La baja acumulación de β -CHO (16%) y β -COOH (6,7%) a las 45 horas de reacción junto con la baja producción de pre-D-fagomina (14%) demostró que tanto la FSA como la CPO han sido desactivadas debido a la elevada concentración de peróxido en el medio. La desactivación además se manifestó en el cambio de color del biocatalizador que pasó de marrón oscuro a un tono blanco y no se detectó actividad de ninguna de las dos enzimas al final de la reacción (Figura 6.13.).



Figura 6.13. Derivado co-inmovilizado antes de la reacción (izquierda) y después de la reacción (derecha).

- Adición de 27,2 mmoles de t -BuOOH cada hora mediante pulsos cada 3 minutos sin adición inicial de t -BuOOH

El estudio de la adición de peróxido determino que mejor la adición era mediante pulsos cada tres minutos para evitar así la acumulación de picos de alta concentración de t -BuOOH en el medio. Además, determinó que el aporte adecuado de t -BuOOH era 27,2 mmoles cada hora. Al bajarlo a 13,6 mmoles cada hora la reacción era muy lenta y al subirlo a 45,3 mmoles por hora la adición de peróxido era demasiado elevada y desactivaba rápidamente las enzimas. Para completar el estudio de la adición de t -BuOOH se realizó una nueva reacción con una adición de peróxido de 27,2 mmoles cada hora, pero sin añadir una concentración inicial de peróxido al inicio de la reacción.

En la reacción sin adición inicial de peróxido (Figura 6.14.) no se observó la rápida producción de pre-D-fagomina que se observaba en las otras reacciones ya que no existía una concentración inicial alta de peróxido para que la CPO pudiera oxidar el β -OH. La reacción comenzó más lentamente ya que durante

las dos primeras horas no se detectó ni consumo de β -OH ni aparición de pre-D-fagomina pero a las 24 horas de reacción el rendimiento de pre-D-fagomina alcanzó era del 22% y la conversión de alcohol del 25%, por lo que apenas se detectaron trazas de los productos secundarios de la reacción (Figura 6.14.).

Tras 48 horas se alcanzó un rendimiento final del 26% y una conversión de β -OH del 28,6%, detectando apenas un 1% de aldehído y un 2% de ácido. A las 48 horas el derivado ya había adquirido el color amarillento característico de la desactivación del biocatalizador y no se detectó actividad de ninguna de las dos enzimas.

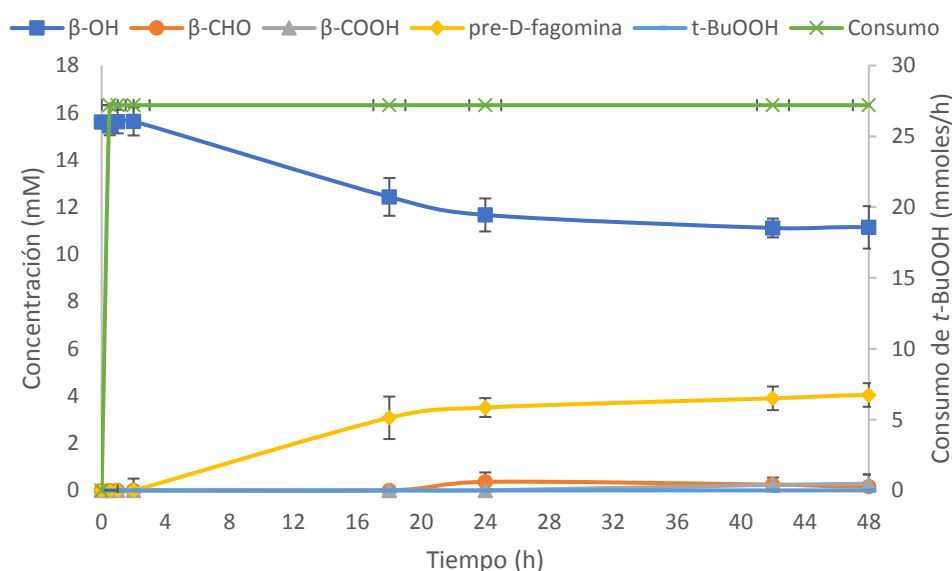


Figura 6.14. Curso de la reacción acoplada utilizando el derivado co-inmovilizado con 65,3 U de FSA y 3675 U de CPO mL⁻¹ de reacción con una adición de 27,2 mmoles de peróxido cada hora mediante pulsos cada 3 min sin añadir concentración inicial de t-BuOOH. La reacción se llevó a cabo a 25 °C, en tampón MES 100 mM pH 6,5 recirculando el medio durante 48 h a un caudal de 1,3 mL min⁻¹.

La reacción sin adición inicial de peróxido alcanzó un rendimiento de pre-D-fagomina a las 48 horas ligeramente inferior (26%) que la reacción con la misma adición de peróxido añadiendo una concentración inicial de 16 mM (29%). Sin embargo, en la reacción sin adición inicial de peróxido apenas existe un 3% de los productos secundarios frente al 50% que se detectan en la otra reacción, de los cuales un 47% es β -COOH, el cual no puede reutilizarse en otra adición aldólica. Por lo tanto, se concluyó que la mejor configuración de adición de

peróxido para este sistema se había alcanzado utilizando este biocatalizador era mediante una adición de 27,2 mmoles de *t*-BuOOH cada hora, en pequeños pulsos de 1 μ L cada tres minutos y sin añadir una concentración inicial de peróxido. Esta configuración permitió que no se acumulase peróxido en el medio ya que el consumo de peróxido permaneció constante durante todo el proceso a 27,2 mmoles por hora, coincidiendo con la velocidad de adición del *t*-BuOOH.

Esta configuración permitió obtener un 26% de pre-D-fagomina frente al 14% de rendimiento máximo que proponía el modelo para la reacción con las enzimas solubles. El derivado co-inmovilizado no solo consiguió casi el doble de rendimiento de pre-D-fagomina utilizando la mitad de las unidades de FSA y de CPO, sino que además apenas se detectó aparición de productos secundarios, un 3% frente al 11% que se producían en la reacción con las enzimas solubles. Por lo tanto, el derivado co-inmovilizado catalizó la síntesis de pre-D-fagomina de forma más eficiente y selectiva y permitiría recircular el medio de reacción a través de distintos reactores hasta agotar el sustrato del medio de reacción, aumentando así el rendimiento.

6.4. Conclusiones

Se comprobó que al utilizar el derivado co-inmovilizado a carga máxima en un reactor en “batch” la concentración de las enzimas era demasiado baja para catalizar la síntesis de pre-D-fagomina, por lo que se decidió trabajar en una configuración de reactor en lecho fijo, que permitió aumentar la concentración de las enzimas en la reacción utilizando el mismo derivado co-inmovilizado.

Durante el estudio de las condiciones de reacción se observó que la estabilidad de la FSA aumentaba y la velocidad de la oxidación del β -OH disminuía al co-inmovilizar las enzimas. Así el aumento de la estabilidad de la FSA en reacción permitió aumentar la relación CPO/FSA sin comprometer su capacidad de catalizar la reacción aldólica.

La adición de *t*-BuOOH resultó ser un parámetro clave en sistema multienzimático ya que su concentración en el medio condicionaba la velocidad

de oxidación del β -OH, la reacción secundaria entre CPO y *t*-BuOOH y la estabilidad de las enzimas en la reacción. El estudio de la adición de *t*-BuOOH permitió alcanzar un rendimiento de pre-D-fagomina (26%) dos veces mayor al obtenido con las enzimas solubles (11%) y con una aparición mucho menor de productos secundarios (menor al 3%).

Debido al problema de tiempo que hacía terminar la parte experimental de la tesis, no pudo llegarse a optimizar el sistema, pero si se han sentado las bases para entender su funcionamiento. En trabajos futuros debería estudiarse la adición de *t*-BuOOH en valores por encima y por debajo de 27,1 mmol h⁻¹ con la finalidad de seleccionar el caudal de adición óptimo. Además, deberían estudiarse distintas concentraciones iniciales de *t*-BuOOH con la finalidad de aumentar la velocidad inicial de la reacción sin adición inicial de oxidante ya que durante las dos primeras horas no se detecta conversión de β -OH.

Seguidamente se debería estudiar el escalado del sistema, lo cual permitiría trabajar con volúmenes mayores y la adición del *t*-BuOOH podría ser continua. Este escalado permitiría además trabajar con la velocidad de recirculación del medio y el volumen de reacción.

Finalmente, ya que el biocatalizador se desactiva y no puede reutilizarse, debería estudiarse la posibilidad de recircular el medio de reacción a través de varios reactores con derivado co-inmovilizado con la finalidad de agotar el sustrato del medio.

7. Bibliografía

- Ahmad, Abdul. L., E. M. Low, and Syamsul. R. Abd Shukor. 2013. "Immobilization of Phenylalanine Dehydrogenase onto Eupergit CM for the Synthesis of (S)-2-Amino-4-Phenylbutyric Acid." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 88:26–31.
- Ahmad, Razi and Meryam Sardar. 2015. "Enzyme Immobilization: An Overview on Nanoparticles as Immobilization Matrix." *Biochemistry & Analytical Biochemistry* 04(178).
- Amézqueta, Susana and Josep Lluís Torres. 2016. "Advances in the Analysis of Iminocyclitols: Methods, Sources and Bioavailability." *Talanta* 151:157–71.
- Anastas, Paul and Nicolas Eghbali. 2010. "Green Chemistry: Principles and Practice." *Chemical Society Reviews* 39(1):301–12.
- Anastas, Paul and John Warner. 1998. *Green Chemistry: Theory and Practice*. Oxford: Oxford University Press.
- Ardao, Ines, Maria Dolors Benaiges, Glòria Caminal, and Gregorio Álvaro. 2006. "One Step Purification-Immobilization of Fuculose-1-Phosphate Aldolase, a Class II DHAP Dependent Aldolase, by Using Metal-Chelate Supports." *Enzyme and Microbial Technology* 39(1):22–27.
- Arnau, José, Conni Lauritzen, Gitte Petersen, and John Pedersen. 2006. "Current Strategies for the Use of Affinity Tags and Tag Removal for the Purification of Recombinant Proteins." *Protein Expression and Purification* 48(1):1–13.
- Arnold, Frances H. 1998. "Design by Directed Evolution." *Accounts of Chemical Research* 31(3):125–31.
- Babich, Lara, L. J. C. Van Hemert, A. Bury, A. F. Hartog, P. Falcicchio, J. Van Der Oost, T. Van Herk, R. Wever, and F. P. J. T. Rutjes. 2011. "Synthesis of Non-Natural Carbohydrates from Glycerol and Aldehydes in a One-Pot Four-Enzyme Cascade Reaction." *Green Chemistry* 13(10):2895–2900.
- Banba, Yasunori, C. Abe, H. Nemoto, A. Kato, I. Adachi, and H. Takahata. 2001. "Asymmetric Synthesis of Fagomine and Its Congeners." *Tetrahedron Asymmetry* 12(6):817–19.
- Bartali, Laura, Andrea Casini, Antonio Guarna, Ernesto. G. Occhiato, and Dina Scarpi. 2010. "Enantiodivergent Chemoenzymatic Synthesis of 4-Hydroxypiperidine Alkaloids." *European Journal of Organic Chemistry* (30):5831–40.
- Bartali, Laura, Dina Scarpi, Antonio Guarna, Cristina Prandi, and Ernesto G. Occhiato. 2009. "Chemistry of Lactam-Derived Vinyl Phosphates: Stereoselective Synthesis of (+)-Fagomine." *Synlett* 1(6):913–16.
- Bavaro, Teodora, G. Cattaneo, I. Serra, I. Benucci, M. Pregolato, and M. Terreni. 2016. "Immobilization of Neutral Protease from *Bacillus Subtilis* for Regioselective Hydrolysis of Acetylated Nucleosides: Application to Capecitabine Synthesis." *Molecules* 21(12):1621.
- Bayramoglu, Gulay, Begum Altintas, Meltem Yilmaz, and M. Yakup Arica. 2011. "Immobilization of Chloroperoxidase onto Highly Hydrophilic Polyethylene Chains via Bio-Conjugation: Catalytic Properties and Stabilities." *Bioresource Technology* 102(2):475–82.
- Betancor, Lorena and Heather R. Luckarift. 2013. "Co-Immobilized Coupled Enzyme Systems in Biotechnology." *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 27(1):95–114.
- Bezerra, Camilla Salviano, Celina Maria Gentil De Farias Lemos, Marylane De Sousa, and Luciana Rocha Barros Gonçalves. 2015. "Enzyme

- Immobilization onto Renewable Polymeric Matrixes: Past, Present, and Future Trends.” *Journal of Applied Polymer Science* 132(26):1–15.
- Boller, Thomas, Christian Meier, and Stefan Menzler. 2002. “EUPERGIT Oxirane Acrylic Beads: How to Make Enzymes Fit for Biocatalysis.” *Organic Process Research and Development* 6(4):509–19.
- Bornscheuer, Uwe. T., G. W. Huisman, R. J. Kazlauskas, S. Lutz, J. C. Moore, and K. Robins. 2012. “Engineering the Third Wave of Biocatalysis.” *Nature* 485:185–94.
- Bortone, Nadia, Marcello Fidaleo, and Mauro Moresi. 2012. “Immobilization/Stabilization of Acid Urease on Eupergit Supports.” *Biotechnology Progress* 28(5):1232–44.
- Bradford, Marion M. 1976. “A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding.” *Analytical Biochemistry* 72(1–2):248–54.
- Calleja, Daniel, John Kavanagh, Carles de Mas, and Josep López-Santín. 2015. “Simulation and Prediction of Protein Production in Fed-Batch E. Coli Cultures: An Engineering Approach.” *Biotechnology and Bioengineering* 113(4):772–82.
- Camps Bres, Flora, Christine Guérard-Hélaine, Carlos Fernandes, José A. Castillo, and Marielle Lemaire. 2013. “Fructose-6-Phosphate Aldolases as Versatile Biocatalysts for Nitrocyclitol Syntheses.” *Tetrahedron Asymmetry* 24(18):1075–81.
- Castillo, José A., Jordi Calveras, Josefina Casas, Montserrat Mitjans, M. Pilar Vinardell, Teodor Parella, Tomoyuki Inoue, Georg A. Sprenger, Jesús Joglar, and Pere Clapés. 2006. “Fructose-6-Phosphate Aldolase in Organic Synthesis: Preparation of D-Fagomine, N-Alkylated Derivatives, and Preliminary Biological Assays.” *Organic Letters* 8(26):6067–70.
- Castillo, José A., Christine Guérard-Hélaine, Mariana Gutiérrez, Xavier Garrabou, Martine Sancelme, Melanie Schürmann, Tomoyuki Inoue, Virgil Hélaine, Franck Charmantray, Thierry Gefflaut, Laurence Hecquet, Jesús Joglar, Pere Clapés, Georg A. Sprenger, and Marielle Lemaire. 2010. “A Mutant D-Fructose-6-Phosphate Aldolase (Ala129Ser) with Improved Affinity towards Dihydroxyacetone for the Synthesis of Polyhydroxylated Compounds.” *Advanced Synthesis and Catalysis* 352(6):1039–46.
- Chen, Rachel Ruizhen. 2007. “Permeability Issues in Whole-Cell Bioprocesses and Cellular Membrane Engineering.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 74(4):730–38.
- Clapés, Pere, Wolf Dieter Fessner, Georg A. Sprenger, and Anne K. Samland. 2010. “Recent Progress in Stereoselective Synthesis with Aldolases.” *Current Opinion in Chemical Biology* 14(2):154–67.
- Colonna, Stefano, Nicoletta Gaggero, Carlo Richelmi, and Piero Pasta. 1999. “Recent Biotechnological Developments in the Use of Peroxidases.” *Trends in Biotechnology* 17(4):163–68.
- Concia, Alda Lisa, Caries Lozano, José A. Castillo, Teodor Parella, Jesús Joglar, and Pere Clapés. 2009. “D-Fructose-6-Phosphate Aldolase in Organic Synthesis: Cascade Chemical-Enzymatic Preparation of Sugar-Related Polyhydroxylated Compounds.” *Chemistry - A European Journal* 15(15):3808–16.
- Corkran, Hilary M., Stefan Munneke, Emma M. Dangerfield, Bridget L. Stocker, and Mattie S. M. Timmer. 2013. “Applications and Limitations of the I2-

- Mediated Carbamate Annulation for the Synthesis of Piperidines: Five-versus Six-Membered Ring Formation." *Journal of Organic Chemistry* 78(19):9791–9802.
- Cui, Jian Dong and Shi Ru Jia. 2015. "Optimization Protocols and Improved Strategies of Cross-Linked Enzyme Aggregates Technology: Current Development and Future Challenges." *Critical Reviews in Biotechnology* 35(1):15–28.
- Dean, Stephen M., William A. Greenberg, and Chi Huey Wong. 2007. "Recent Advances in Aldolase-Catalyzed Asymmetric Synthesis." *Advanced Synthesis and Catalysis* 349(8–9):1308–20.
- Van Dongen, Stijn F. M., Madhavan Nallani, Jeroen J. L. M. Cornelissen, Roeland J. M. Nolte, and Jan C. M. Van Hest. 2009. "A Three-Enzyme Cascade Reaction through Positional Assembly of Enzymes in a Polymersome Nanoreactor." *Chemistry - A European Journal* 15(5):1107–14.
- Drueckhammer, Dale G., J. Robert Durrwachter, Richard L. Pederson, Debbie C. Crans, Lacy Daniels, and Chi Huey Wong. 1989. "Reversible and in Situ Formation of Organic Arsenates and Vanadates as Organic Phosphate Mimics in Enzymatic Reactions: Mechanistic Investigation of Aldol Reactions and Synthetic Applications." *Journal of Organic Chemistry* 54(1):70–77.
- Durany, Olga, Carles De Mas, and Josep López-Santín. 2005. "Fed-Batch Production of Recombinant Fuculose-1-Phosphate Aldolase in E. Coli." *Process Biochemistry* 40(2):707–16.
- Espelt, Laia, Teodor Parella, Jordi Bujons, Conxita Solans, Jesús Joglar, Antonio Delgado, and Pere Clapés. 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(20):4887–99.
- Fan, Xueting, Mancheng Hu, Shuni Li, Quanguo Zhai, Fei Wang, and Yucheng Jiang. 2018. "Charge Controlled Immobilization of Chloroperoxidase on Both Inner/Outer Wall of NHT: Improved Stability and Catalytic Performance in the Degradation of Pesticide." *Applied Clay Science* 163:92–99.
- Fernandez-Lafuente, Roberto, C. M. Rosell, V. Rodriguez, C. Santana, G. Soler, A. Bastida, and J. M. Guisán. 1993. "Preparation of Activated Supports Containing Low PK Amino Groups. A New Tool for Protein Immobilization via the Carboxyl Coupling Method." *Enzyme and Microbial Technology* 15(7):546–50.
- Ferreira, Matheus M., Fernanda L. B. Santiago, Nádia A. G. d. Silva, Jaine H. H. Luiz, Roberto Fernández-Lafuente, Adriano A. Mendes, and Daniela B. Hirata. 2018. "Different Strategies to Immobilize Lipase from *Geotrichum Candidum*: Kinetic and Thermodynamic Studies." *Process Biochemistry* 67:55–63.
- Fessner, Wolf Dieter, Dirk Heyl, and Madhura Rale. 2012. "Multi-Enzymatic Cascade Synthesis of d-Fructose 6-Phosphate and Deoxy Analogs as Substrates for High-Throughput Aldolase Screening." *Catalysis Science and Technology* 2(8):1596–1601.
- Filice, Marco and Jose M. Palomo. 2014. "Cascade Reactions Catalyzed by

- Bionanostructures." *ACS Catal.* 4(5):1588–98.
- García-Embid, Sonia, Francesca Di Renzo, Laura De Matteis, Nicoletta Spreti, and Jesús M. de la Fuente. 2018. "Magnetic Separation and High Reusability of Chloroperoxidase Entrapped in Multi Polysaccharide Micro-Supports." *Applied Catalysis A: General* 560:94–102.
- García-Junceda, Eduardo, Shen Gwo-Jenn, Sugai Takeshi, and Chi-Huey Wong. 1995. "A New Strategy for the Cloning, Overexpression and One Step Purification of 3 DHAP-Dependent Aldolases: Rhamnulose-1-Phosphate Aldolase, Fuculose-1-Phosphate Aldolase and Tagatose-1,6-Diphosphate Aldolase." *Bioorg Med Chem* 3(7):945–53.
- Garrabou, Xavier, José A. Castillo, Christine Guérard-Hélaine, Teodor Parella, Jesús Joglar, Marielle Lemaire, and Pere Clapés. 2009. "Asymmetric Self- and Cross-Aldol Reactions of Glycolaldehyde Catalyzed by d-Fructose-6-Phosphate Aldolase." *Angewandte Chemie - International Edition* 48(30):5521–25.
- Garrabou, Xavier, Jesús Joglar, Teodor Parella, Ramon Crehuet, Jordi Bujons, and Pere Clapés. 2011. "Redesign of the Phosphate Binding Site of L - Rhamnulose-1-Phosphate Aldolase towards a Dihydroxyacetone Dependent Aldolase." *Advanced Synthesis and Catalysis* 353(1):89–99.
- Gibert, Stephanie, Norbert Bakalara, and Xavier Santarelli. 2000. "Three-Step Chromatographic Purification Procedure for the Production of a His-Tag Recombinant Kinesin Overexpressed in E. Coli." *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 737(1–2):143–50.
- Gilles, Maxime A., Antoine Q. Hudson, and C. L. Borders. 1990. "Stability of Water-Soluble Carbodiimides in Aqueous Solution." *Analytical Biochemistry* 184(2):244–48.
- Goldberg, Katja, Kirsten Schroer, Stephan Lütz, and Andreas Liese. 2007. "Biocatalytic Ketone Reduction - A Powerful Tool for the Production of Chiral Alcohols - Part I: Processes with Isolated Enzymes." *Applied Microbiology and Biotechnology* 76(2):249–55.
- Gómez, Livia, Eunice Molinar-Toribio, María Ángeles Calvo-Torras, Carles Adelantado, M. Emília Juan, Joana M. Planas, Xavier Cañas, Carles Lozano, Sergio Pumarola, Pere Clapés, and Josep Lluís Torres. 2012. "D-Fagomine Lowers Postprandial Blood Glucose and Modulates Bacterial Adhesion." *British Journal of Nutrition* 107(12):1739–46.
- Guérard-Hélaine, Christine, Bertrand Légeret, Carlos Fernandes, Vanessa Prévot, Claude Forano, and Marielle Lemaire. 2011. "Efficient Immobilization of Fructose-6-Phosphate Aldolase in Layered Double Hydroxide: Improved Stereoselective Synthesis of Sugar Analogues." *New Journal of Chemistry* 35(4):776–79.
- Guerrero, E., P. Aburto, E. Terrés, O. Villegas, E. González, T. Zayas, F. Hernández, and E. Torres. 2013. "Improvement of Catalytic Efficiency of Chloroperoxidase by Its Covalent Immobilization on SBA-15 for Azo Dye Oxidation." *Journal of Porous Materials* 20(2):387–96.
- Guisán, José M. 1988. "Aldehyde-Agarose Gels as Activated Supports for Immobilization-Stabilization of Enzymes." *Enzyme and Microbial Technology* 10(6):375–82.
- Gutierrez, Mariana, Teodor Parella, Jesús Joglar, Jordi Bujons, and Pere Clapés. 2011. "Structure-Guided Redesign of d-Fructose-6-Phosphate

- Aldolase from *E. Coli*: Remarkable Activity and Selectivity towards Acceptor Substrates by Two-Point Mutation." *Chemical Communications* 47(20):5762–64.
- Heux, Stéphanie, Isabelle Meynial-Salles, Michael J. O'Donohue, and Claire Dumon. 2015. "White Biotechnology: State of the Art Strategies for the Development of Biocatalysts for Biorefining." *Biotechnology Advances* 33(8):1653–70.
- Hibbert, Edward G., Frank Baganz, Helen C. Hailes, John M. Ward, Gary J. Lye, John M. Woodley, and Paul A. Dalby. 2005. "Directed Evolution of Biocatalytic Processes." *Biomolecular Engineering* 22(1–3):11–19.
- Huang, Shih Hung, Min Hung Liao, and Dong Hwang Chen. 2003. "Direct Binding and Characterization of Lipase onto Magnetic Nanoparticles." *Biotechnology Progress* 19(3):1095–1100.
- Jia, Hongfei, Guangyu Zhu, and Ping Wang. 2003. "Catalytic Behaviors of Enzymes Attached to Nanoparticles: The Effect of Particle Mobility." *Biotechnology and Bioengineering* 84(4):406–14.
- Johnson, Andrew K., Anna M. Zawadzka, Lee A. Deobald, Ronald L. Crawford, and Andrzej J. Paszczynski. 2008. "Novel Method for Immobilization of Enzymes to Magnetic Nanoparticles." *Journal of Nanoparticle Research* 10(6):1009–25.
- Kallam, Srinivasa Reddy, Rajender Datrika, Sandip R. Khobare, Vikas S. Gajare, Nagaraju Rajana, H. Rama Mohan, J. Moses Babu, V. Siddaiah, and T. V. Pratap. 2016. "Concise and Highly Stereoselective Syntheses of D-Fagomine and 2-Epi-Fagomine." *Tetrahedron Letters* 57(12):1351–53.
- Kikani, Bhavtosh A., Sandhya Pandey, and Satya P. Singh. 2013. "Immobilization of the α -Amylase of *Bacillus Amyloliquifaciens* TSWK1-1 for the Improved Biocatalytic Properties and Solvent Tolerance." *Bioprocess Biosyst Eng* 36(5):567–77.
- Kim, Ji Yeon, Yu Mu, Xiangdan Jin, Seok Hwi Park, Van Thoai Pham, Dong Keun Song, Kee Young Lee, and Won Hun Ham. 2011. "Efficient and Stereoselective Syntheses of DAB-1 and D-Fagomine via Chiral 1,3-Oxazine." *Tetrahedron* 67(48):9426–32.
- Knezevic, Zorica, Nenad Milosavic, Dejan Bezbradica, Zivana Jakovljevic, and Radivoje Prodanovic. 2006. "Immobilization of Lipase from *Candida Rugosa* on Eupergit® C Supports by Covalent Attachment." *Biochemical Engineering Journal* 30(3):269–78.
- Koyama, Masahiro, Masahiro Koyama, and Sadao Sakamura. 1974. "The Structure of a New Piperidine Derivative from Buckwheat Seeds (*Fagopyrum Esculentum* Moench)." *Agricultural and Biological Chemistry* 38(5):1111–12.
- Kralj, Slavko and Darko Makovec. 2014. "The Chemically Directed Assembly of Nanoparticle Clusters from Superparamagnetic Iron-Oxide Nanoparticles." *RSC Advances* 4(25):13167–71.
- Kralj, Slavko and Darko Makovec. 2015. "Magnetic Assembly of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticle Clusters into Nanochains and Nanobundles." *ACS Nano* 9(10):9700–9707.
- Kumari, Nitee, B. Gopal Reddy, and Yashwant D. Vankar. 2009. "Efficient and Stereodivergent Syntheses of D- and L-Fagomines and Their Analogues." *European Journal of Organic Chemistry* (1):160–69.
- Kundu, Pintu K. and Sunil K. Ghosh. 2011. "Silicon-Mediated Asymmetric

- Synthesis of Fagomine and 3,4-Di-Epi-Fagomine.” *Tetrahedron Asymmetry* 22(10):1090–96.
- Lee, Sang Yup. 1996. “High Cell-Density Culture of Escherichia Coli.” *Trends in Biotechnology* 14(3):98–105.
- Lin, Baixue and Yong Tao. 2017. “Whole-Cell Biocatalysts by Design.” *Microbial Cell Factories* 16(106):1–12.
- Liu, Long, Haiquan Yang, Hyun-dong Shin, Rachel R. Chen, Jianghua Li, Guocheng Du, and Jian Chen. 2013. “How to Achieve High-Level Expression of Microbial Enzymes Strategies and Perspectives.” *Bioengineered* 4(4):212–23.
- Lloret, Lucia, Gemma Eibes, G. Feijoo, M. T. Moreira, and Juan M. Lema. 2012. “Continuous Operation of a Fluidized Bed Reactor for the Removal of Estrogens by Immobilized Laccase on Eupergit Supports.” *Journal of Biotechnology* 162(4):404–6.
- Mahdi, Rima, Christine Guérard-Hélaine, Céline Laroche, Philippe Michaud, Vanessa Prévot, Claude Forano, and Marielle Lemaire. 2015. “Polysaccharide-Layered Double Hydroxide-Aldolase Biohybrid Beads for Biocatalysed CC Bond Formation.” *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 122:204–11.
- Margolin, Alexey L. and Manuel A. Navia. 2001. “Protein Crystals as Novel Catalytic Materials.” *Angewandte Chemie International Edition* 40(12):2204–22.
- Masdeu, Gerard. 2017. “Chloroperoxidase and D-Fructose-6-Phosphate Aldolase in Enzymatic Cascade Reactions for the Synthesis of Iminocyclitols (Doctoral Dissertation).” Universidad Autónoma de Barcelona.
- Masdeu, Gerard, Slavko Kralj, Stane Pajk, Josep López-Santín, Darko Makovec, and Gregorio Álvaro. 2018. “Hybrid Chloroperoxidase-Magnetic Nanoparticle Clusters: Effect of Functionalization on Biocatalyst Performance.” *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 93(1):233–45.
- Masdeu, Gerard, Míriam Pérez-Trujillo, Josep López-Santín, and Gregorio Álvaro. 2016. “Chloroperoxidase-Catalyzed Amino Alcohol Oxidation : Substrate Specificity and Novel Strategy for the Synthesis of N -Cbz-3-Aminopropanal.” *Process Biochemistry* 51(9):1204–11.
- Mateo, Cesar, Olga Abian, Roberto Fernandez-Lafuente, and Jose M. Guisan. 2000. “Increase in Conformational Stability of Enzymes Immobilized on Epoxy-Activated Supports by Favoring Additional Multipoint Covalent Attachment.” *Enzyme and Microbial Technology* 26(7):509–15.
- Mateo, Cesar, Jose M. Palomo, Gloria Fernandez-Lorente, Jose M. Guisan, and Roberto Fernandez-Lafuente. 2007. “Improvement of Enzyme Activity, Stability and Selectivity via Immobilization Techniques.” *Enzyme and Microbial Technology* 40(6):1451–63.
- Mifsud, Maria, Anna Szekrényi, Jesús Joglar, and Pere Clapés. 2012. “In Situ Aldehyde Generation for Aldol Addition Reactions Catalyzed by D-Fructose-6-Phosphate Aldolase.” *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 84:102–7.
- Min, Im Sook, Seung In Kim, Seungmin Hong, In Su Kim, and Young Hoon Jung. 2013. “Total Synthesis of D-Fagomine and 6-Deoxyfagomine.” *Tetrahedron* 69(19):3901–6.

- Morris, David R. and Lowell P. Hager. 1966. "Chloroperoxidase. I. Isolation and Properties of the Crystalline Glycoprotein." *J Biol Chem* 241(8):1763–68.
- Muñoz-Guerrero, Fabio A., Sergio Águila, Rafael Vazquez-Duhalt, and Joel B. Alderete. 2015. "Enhancement of Operational Stability of Chloroperoxidase from *Caldariomyces Fumago* by Immobilization onto Mesoporous Supports and the Use of Co-Solvents." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 116:1–8.
- Novick, Scott J. and J. David Rozzell. 2005. *Immobilization of Enzymes by Covalent Attachment*. Vol. 17.
- Pereira, Marita G., Susana Velasco-Lozano, Sonia Moreno-Perez, Aline M. Polizeli, Paulo R. Heinen, Fernanda D. A. Facchini, Ana C. Vici, Mariana Cereia, Benevides C. Pessela, Gloria Fernandez-Lorente, Jose M. Guisan, João A. Jorge, and T. M. Polizel. Maria de Lourdes. 2017. "Different Covalent Immobilizations Modulate Lipase Activities of *Hypocrea Pseudokoningii*." *Molecules* 22(9):1448.
- Pešić, Milja, Carmen López, and Gregorio Álvaro. 2012. "Chloroperoxidase Catalyzed Oxidation of Cbz-Ethanolamine to Cbz-Glycinal." *Biochemical Engineering Journal* 67:218–24.
- Pešić, Milja, Carmen López, Gregorio Álvaro, and Josep López-Santín. 2012. "A Novel Immobilized Chloroperoxidase Biocatalyst with Improved Stability for the Oxidation of Amino Alcohols to Amino Aldehydes." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 84:144–51.
- Pešić, Milja, Carmen López, Josep López-Santín, and Gregorio Álvaro. 2013. "From Amino Alcohol to Aminopolyol: One-Pot Multienzyme Oxidation and Aldol Addition." *Applied Microbiology and Biotechnology* 97(16):7173–83.
- Pickard, Michael A. and Atsumi Hashimoto. 1988. "Stability and Carbohydrate Composition of Chloroperoxidase from *Caldariomyces Fumago* Grown in a Fructose–Salts Medium." *Canadian Journal of Microbiology* 34(8):998–1002.
- Pinsach, Jaume, Carles de Mas, and Josep López-Santín. 2008. "Induction Strategies in Fed-Batch Cultures for Recombinant Protein Production in *Escherichia Coli*: Application to Rhamnulose 1-Phosphate Aldolase." *Biochemical Engineering Journal* 41(2):181–87.
- Pollard, David J. and John M. Woodley. 2007. "Biocatalysis for Pharmaceutical Intermediates: The Future Is Now." *Trends in Biotechnology* 25(2):66–73.
- Prakasham, Reddy S., G. Sarala Devi, K. Rajya Laxmi, and Ch Subba Rao. 2007. "Novel Synthesis of Ferric Impregnated Silica Nanoparticles and Their Evaluation as a Matrix for Enzyme Immobilization." *Journal of Physical Chemistry C* 111(10):3842–47.
- Rocha-Martín, Javier, Blanca de Las Rivas, Rosario Muñoz, José M. Guisán, and Fernando López-Gallego. 2012. "Rational Co-Immobilization of Bi-Enzyme Cascades on Porous Supports and Their Applications in Bio-Redox Reactions with Insitu Recycling of Soluble Cofactors." *ChemCatChem* 4(9):1279–88.
- Roy, J. Jegan and T. Emilia Abraham. 2004. "Strategies in Making Cross-Linked Enzyme Crystals." *Chemical Reviews* 104(9):3705–22.
- Rozzell, J. David. 1999. "Commercial Scale Biocatalysis : Myths and Realities." *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 7(10):2253–61.
- Ruiz, Jordi, Jaume Pinsach, Gregorio Álvaro, Glòria González, Carles de Mas, David Resina, and Josep López-Santín. 2009. "Alternative Production

- Process Strategies in E. Coli Improving Protein Quality and Downstream Yields." *Process Biochemistry* 44(9):1039–45.
- Samland, Anne K. and Georg A. Sprenger. 2006. "Microbial Aldolases as C-C Bonding Enzymes - Unknown Treasures and New Developments." *Applied Microbiology and Biotechnology* 71(3):253–64.
- Sánchez-Moreno, Israel, Virgil Hélaïne, Nicolas Poupard, Franck Charmantray, Bertrand Légeret, Laurence Hecquet, Eduardo García-Junceda, Roland Wohlgemuth, Christine Guérard-Hélaïne, and Marielle Lemaire. 2012. "One-Pot Cascade Reactions Using Fructose-6-Phosphate Aldolase: Efficient Synthesis of D-Arabinose 5-Phosphate, D-Fructose 6-Phosphate and Analogues." *Advanced Synthesis and Catalysis* 354(9):1725–30.
- Sautner, Viktor, Mascha Miriam Friedrich, Anja Lehwiss-Litzmann, and Kai Tittmann. 2015. "Converting Transaldolase into Aldolase through Swapping of the Multifunctional Acid-Base Catalyst: Common and Divergent Catalytic Principles in F6P Aldolase and Transaldolase." *Biochemistry* 54(29):4475–86.
- Schneider, Sarah, Tatyana Sandalova, Gunter Schneider, Georg A. Sprenger, and Anne K. Samland. 2008. "Replacement of a Phenylalanine by a Tyrosine in the Active Site Confers Fructose-6-Phosphate Aldolase Activity to the Transaldolase of Escherichia Coli and Human Origin." *Journal of Biological Chemistry* 283(44):30064–72.
- Schoffelen, Sanne and Jan C. M. Van Hest. 2013. "Chemical Approaches for the Construction of Multi-Enzyme Reaction Systems." *Current Opinion in Structural Biology* 23(4):613–21.
- Schürmann, Martin, Melanie Schürmann, and Georg A. Sprenger. 2002. "Fructose 6-Phosphate Aldolase and 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Synthase from Escherichia Coli as Tools in Enzymatic Synthesis of 1-Deoxysugars." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 19–20:247–52.
- Schürmann, Melanie and Georg A. Sprenger. 2001. "Fructose-6-Phosphate Aldolase Is a Novel Class I Aldolase from Escherichia Coli and Is Related to a Novel Group of Bacterial Transaldolases." *Journal of Biological Chemistry* 276(14):11055–61.
- Shaw, Paul D. and Lowell P. Hager. 1961. "Biological Chlorination: VI. CHLOROPEROXIDASE: A COMPONENT OF THE β -KETOADIPATE CHLORINASE SYSTEM." *J Biol Chem* 236(6):1626–30.
- Sheldon, Roger A. and Sander van Pelt. 2013. "Enzyme Immobilisation in Biocatalysis: Why, What and How." *Chemical Society Reviews* 42(15):6223–35.
- Sheldon, Roger A. and John M. Woodley. 2018. "Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry." *Chemical Reviews* 118(2):801–38.
- Sigyn, Authors, Björk Sigurdardóttir, Jonas Lehmann, Simona Ovtar, and Manuel Pinelo. 2018. "Enzyme Immobilization on Inorganic Surfaces for Membrane Reactor Applications: Mass Transfer Challenges, Enzyme Leakage and Reuse of Materials." *Advanced Synthesis and Catalysis* 360(14):2578–2607.
- Sirisha, Vippula L., Ankita Jain, and Amita Jain. 2016. "Enzyme Immobilization: An Overview on Methods, Support Material, and Applications of Immobilized Enzymes." *Advances in Food and Nutrition Research* 79:179–211.
- Smith, Silas W. 2009. "Chiral Toxicology : It ' s the Same Thing . . . Only

- Different." *Toxicological Science* 110(1):4–30.
- Soler, Anna, Mariana L. Gutiérrez, Jordi Bujons, Teodor Parella, Cristina Minguillon, Jesús Joglar, and Pere Clapés. 2015. "Structure-Guided Engineering of D-Fructose-6-Phosphate Aldolase for Improved Acceptor Tolerance in Biocatalytic Aldol Additions." *Advanced Synthesis and Catalysis* 357(8):1787–1807.
- Soriano, Sébastien, Margarita Escudero-Casao, M. Isabel Matheu, Yolanda Díaz, and Sergio Castellón. 2016. "Substrate-Regiocontrolled Synthesis of Enantioenriched Allylic Amines by Palladium-Catalysed Asymmetric Allylic Amination: Formal Synthesis of Fagomine." *Advanced Synthesis and Catalysis* 358(24):4057–66.
- Spahn, Cynthia and Shelley Minter. 2008. "Enzyme Immobilization in Biotechnology." *Recent Patents on Engineering* 2(3):195–200.
- Studier, F. William and Barbara A. Moffatt. 1986. "Use of Bacteriophage T7 RNA Polymerase to Direct Selective High-Level Expression of Cloned Genes." *Journal of Molecular Biology* 189(1):113–30.
- Sudar, Martina, Zvezdana Findrik, Durda Vasić-Rački, Pere Clapés, and Carles Lozano. 2013a. "Aldol Addition of Dihydroxyacetone to N-Cbz-3-Aminopropanal Catalyzed by Two Aldolases Variants in Microreactors." *Enzyme and Microbial Technology* 53(1):38–45.
- Sudar, Martina, Zvezdana Findrik, Durda Vasić-Rački, Pere Clapés, and Carles Lozano. 2013b. "Mathematical Model for Aldol Addition Catalyzed by Two D-Fructose-6-Phosphate Aldolases Variants Overexpressed in E. Coli." *Journal of Biotechnology* 167(3):191–200.
- Sudar, Martina, Zvezdana Findrik, Durda Vasić-Rački, Anna Soler, and Pere Clapés. 2015. "A New Concept for Production of (3S,4R)-6-[(Benzyloxycarbonyl)Amino]-5,6-Dideoxyhex-2-Ulose, a Precursor of D-Fagomine." *RSC Advances* 5(85):69819–28.
- Sugiyama, Masakazu, Zhangyong Hong, Pi Hui Liang, Stephen M. Dean, Lisa J. Whalen, William A. Greenberg, and Chi Huey Wong. 2007. "D-Fructose-6-Phosphate Aldolase-Catalyzed One-Pot Synthesis of Iminocyclitols." *Journal of the American Chemical Society* 129(47):14811–17.
- Sugiyama, Masakazu, Zhangyong Hong, Lisa J. Whalen, William A. Greenberg, and Chi Huey Wong. 2006. "Borate as a Phosphate Ester Mimic in Aldolase-Catalyzed Reactions: Practical Synthesis of L-Fructose and L-Iminocyclitols." *Advanced Synthesis and Catalysis* 348(18):2555–59.
- Szekrenyi, Anna, Xavier Garrabou, Teodor Parella, Jesús Joglar, Jordi Bujons, and Pere Clapés. 2015. "Asymmetric Assembly of Aldose Carbohydrates from Formaldehyde and Glycolaldehyde by Tandem Biocatalytic Aldol Reactions." *Nature Chemistry* 7(9):724–29.
- Szekrenyi, Anna, Anna Soler, Xavier Garrabou, Christine Guérard-Hélaine, Teodor Parella, Jesús Joglar, Marielle Lemaire, Jordi Bujons, and Pere Clapés. 2014. "Engineering the Donor Selectivity of D-Fructose-6-Phosphate Aldolase for Biocatalytic Asymmetric Cross-Aldol Additions of Glycolaldehyde." *Chemistry - A European Journal* 20(39):12572–83.
- Takahata, Hiroki, Yasunori Banba, Hidekazu Ouchi, Hideo Nemoto, Atsushi Kato, and Isao Adachi. 2003. "Asymmetric Synthesis of the Four Possible Fagomine Isomers." *Journal of Organic Chemistry* 68(9):3603–7.
- Takahata, Hiroki, Yasunori Banba, Mayumi Sasatani, Hideo Nemoto, Atsushi Kato, and Isao Adachi. 2004. "Asymmetric Synthesis of 1-Deoxynojirimycin

- and Its Congeners from a Common Chiral Building Block.” *Tetrahedron* 60(37):8199–8205.
- Tanner, Pascal, Ozana Onaca, Vimalkumar Balasubramanian, Wolfgang Meier, and Cornelia G. Palivan. 2011. “Enzymatic Cascade Reactions inside Polymeric Nanocontainers: A Means to Combat Oxidative Stress.” *Chemistry - A European Journal* 17(16):4552–60.
- Terrasán, César Rafael Fanchini, María Romero-Fernández, Alejandro H. Orrego, Sandro Martins Oliveira, Benevides Costa Pessela, Eleonora Cano Carmona, and José Manuel Guisan. 2017. “Immobilization and Stabilization of Beta-Xylosidases from *Penicillium Janczewskii*.” *Applied Biochemistry and Biotechnology* 182(1):349–66.
- Thomas, John A. and R. Morris. 1970. “Cholorperoxidase. VII. CLASSICAL PEROXIDATIC, CATALATIC, AND HALOGENATING FORMS OF THE ENZYME.” *J Biol Chem* 245(12):3129–34.
- Thorell, Stina, Melanie Schürmann, Georg A. Sprenger, and Gunter Schneider. 2002. “Crystal Structure of Decameric Fructose-6-Phosphate Aldolase from *Escherichia Coli* Reveals Inter-Subunit Helix Swapping as a Structural Basis for Assembly Differences in the Transaldolase Family.” *Journal of Molecular Biology* 319(1):161–71.
- Tibbe, Jagdish D., Hui Fu, Timothy Noël, Qi Wang, Jan Meuldijk, and Volker Hessel. 2013. “Flow Synthesis of Phenylserine Using Threonine Aldolase Immobilized on Eupergit Support.” *Beilstein Journal of Organic Chemistry* 9:2168–79.
- Tron, Gian C., T. Pirali, R. A. Billington, P. L. Canonico, G. Sorba, and A. A. Genazzani. 2008. “Click Chemistry Reactions in Medicinal Chemistry: Applications of the 1,3-dipolar Cycloaddition between Azides and Alkynes.” *Med. Res. Rev.* 28(2):278–308.
- Urrutia, Paulina, Claudia Bernal, Sindy Escobar, Cristiam Santa, Monica Mesa, Lorena Wilson, and Andres Illanes. 2014. “Influence of Chitosan Derivatization on Its Physicochemical Characteristics and Its Use as Enzyme Support.” *Journal of Applied Polymer Science* 131(8):1–10.
- Valencia, Daniela, Marina Guillén, Maximilian J. L. J. Fürst, Josep López-Santín, and Gregorio Álvaro. 2018. “An Immobilized and Highly Stabilized Self-Sufficient Monooxygenase as Biocatalyst for Oxidative Biotransformations.” *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 93(4):985–93.
- Velasco-Lozano, Susana, Fernando López-Gallego, Juan C. Mateos-Díaz, and Ernesto Favela-Torres. 2016. “Cross-Linked Enzyme Aggregates (CLEA) in Enzyme Improvement – a Review.” *Biocatalysis* 1(1):166–77.
- Wei, Mohui, Zijie Li, Tiehai Li, Baolin Wu, Yunpeng Liu, Jingyao Qu, Xu Li, Lei Li, Li Cai, and Peng George Wang. 2015. “Transforming Flask Reaction into Cell-Based Synthesis: Production of Polyhydroxylated Molecules via Engineered *Escherichia Coli*.” *ACS Catalysis* 5(7):4060–65.
- Wells, Andy and Hans Peter Meyer. 2014. “Biocatalysis as a Strategic Green Technology for the Chemical Industry.” *ChemCatChem* 6(4):918–20.
- Willson, Michele. 1995. “Review Class I Aldolases.” *Prog.Biophys.Molec.Biol.* 63:301–40.
- Windle, Claire L., Marion Müller, Adam Nelson, and Alan Berry. 2014. “Engineering Aldolases as Biocatalysts.” *Current Opinion in Chemical Biology* 19(1):25–33.

- Woodley, John M. 2008. "New Opportunities for Biocatalysis: Making Pharmaceutical Processes Greener." *Trends in Biotechnology* 26(6):321–27.
- Yao, Jian, Qinglong Chen, Guoxiang Zhong, Wen Cao, An Yu, and Yuhuan Liu. 2014. "Immobilization and Characterization of Tannase from a Metagenomic Library and Its Use for Removal of Tannins from Green Tea Infusion." *Journal of Microbiology and Biotechnology* 24(1):80–86.
- Yin, Jiechao, Guangxing Li, Xiaofeng Ren, and Georg Herrler. 2007. "Select What You Need: A Comparative Evaluation of the Advantages and Limitations of Frequently Used Expression Systems for Foreign Genes." *Journal of Biotechnology* 127(3):335–47.
- Zaak, Hadjer, Sara Peirce, Tiago de Albuquerque, Mohamed Sassi, and Roberto Fernandez-Lafuente. 2017. "Exploiting the Versatility of Aminated Supports Activated with Glutaraldehyde to Immobilize β -Galactosidase from *Aspergillus Oryzae*." *Catalysts* 7(9):250.
- Zucca, Paolo, Roberto Fernandez-Lafuente, and Enrico Sanjust. 2016. "Agarose and Its Derivatives as Supports for Enzyme Immobilization." *Molecules* 21(11):1577.