

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



**NUEVA NUCLEÓSIDO 2'-DESOXIRRIBOSILTRANSFERASA
DE *DESULFOALEA PSYCROPHILA***

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Yohana Alfaro Ureña

Bajo la dirección de los doctores

M^a Isabel de la Mata Riesco
Miguel Arroyo Sánchez,
Jesús Fernández Lucas

Madrid, 2012

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I**



**Nueva nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa de
*Desulfotalea psychrophila***

TESIS DOCTORAL

Por

YOHANA ALFARO UREÑA

Madrid, 2012

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I



“Nueva nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa de *Desulfotalea psychrophila*”

Memoria presentada por **Yohana Alfaro Ureña** para optar al grado de **Doctor en Bioquímica y Biología Molecular** por la Universidad Complutense de Madrid.

Directores de la Tesis Doctoral:

Dra. M^a Isabel de la Mata Riesco

Dr. Miguel Arroyo Sánchez

Dr. Jesús Fernández Lucas

Madrid 2012

Dña. María Isabel de la Mata Riesco, Profesora Titular de la Universidad Complutense de Madrid adscrita al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I de la Facultad de Biología, con número de registro personal _____, en su calidad de DIRECTORA, D. Miguel Arroyo Sánchez, Profesora Titular de la Universidad Complutense de Madrid adscrito al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I de la Facultad de Biología, con número de registro personal _____ y D. Jesús Fernandez Lucas, Investigador Posdoctoral con cargo a Proyecto, en la Universidad Complutense de Madrid adscrito al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I de la Facultad de Biología, con número de registro personal _____

HACEN CONSTAR:

Que el trabajo presentado por Dñ. Yohana Alfaro Ureña para aspirar al título de Doctor con título: **“Nueva nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa de *Desulfotalea psychrophila*”**, presenta la calidad suficiente para ser defendido. El trabajo ha sido realizado en el laboratorio del Grupo de Biotecnología Enzimática del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Complutense de Madrid. Este trabajo aporta conocimientos de una nueva NDT de *Desulfotalea psychrophila*, para su aplicación en la síntesis industrial de nucleósidos de interés terapéutico utilizando condiciones sostenibles. En la presente Tesis la doctoranda ha realizado un estudio con la enzima psicrófila, ha caracterizado dicha enzima en el medio de reacción y realizado ensayos de inmovilización, obteniendo un derivado inmovilizado que ha caracterizado exhaustivamente con vistas a su utilización en biorreactores enzimáticos.

Por todo ello informamos favorablemente la mencionada Tesis Doctoral, por lo que bajo nuestra opinión procede la exposición y defensa de la misma.

Fdo. M^a Isabel de la Mata Riesco
Profesora Titular de la Universidad Complutense de Madrid

Fdo. Miguel Arroyo Sánchez
Profesora Titular de la Universidad Complutense de Madrid

Fdo. Jesús Fernandez Lucas
Investigador Posdoctoral con cargo a Proyecto

Agradecimientos

A יהוה

Agradecimientos

ושרה ליחיתהל יל תודוהל מיהולאל לע דסחה לודגה ולש יא תונלבסו יק מע לכ דחא תושקב
ךרואל מינשה הארו מיבר מיצורמ דסחב ולש. ינא הדומ לכל דחא, 3 נב, יבא חורו, שדוקה הדות
ת.יפוסניא

Por otra parte a mi muy amado esposo Manuel Sandoval Barrantes que ha sido el pilar más importante aquí en este país aparte de Dios, durante todos estos años, gracias por tu ayuda en todo y por hacer de mi vida y mi matrimonio lo más hermoso jamás pensado y por sobre todo gracias por ser como eres, te deseo lo mejor, que Dios te llene de muchas bendiciones siempre, también quiero agradecer a Dios por este hij@ que viene en camino que llena de alegría mi vida y deseo también para ti las mejores bendiciones de Dios.

Este trabajo se realizó bajo la co-dirección de la Doctora María Isabel de la Mata Riesco, Profesor Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I de la Universidad Complutense de Madrid, y directora del grupo de investigación Biotecnología Enzimática de la UCM, a quien quiero agradecer por haberme permitido formar parte del grupo de investigación, por su paciencia, comprensión, apoyo durante la realización del mismo; Doctor Miguel Arroyo Sánchez Profesor Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I de la Universidad Complutense de Madrid, y Doctor Jesús Fernández Lucas Investigador Posdoctoral con cargo a proyecto, a quienes quiero agradecer por su ayuda, y por su disponibilidad durante todos estos años de investigación.

Dentro de este grupo quiero agradecer a Alba Fresco Taboada por su atención y ayuda en cada momento que necesité, sobre todo por su amistad y cariño que fueron de mucha ayuda en este país, fuera de mi entorno y mi familia, la llevaré por siempre en mi corazón, también a el Doctor Daniel Hormigo Cisneros y al futuro Doctor Javier García Hidalgo por su amable colaboración y su gentileza en cada uno de los problemas y abundantes dudas, muchas gracias por todo. A Sonia Baños por su ayuda y cariño para conmigo, a Iria, por su colaboración y ayuda, a Miguel Villalón por esos momentos divertidos, y a Rodrigo te deseo lo mejor en estos años de Tesis que están iniciando para ti.

A Rosa Rodríguez de la secretaría de estudiantes, gracias a su colaboración, en los trámites de mi admisión y a lo largo de estos años. A la Doctora Alejandra Sáenz de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UCM (Jana) quiero agradecer su apoyo logístico en procedimientos experimentales, y por su gran disponibilidad. Agradezco también a la Laurita por su constante apoyo sobretodo es esos momentos difíciles en los cuales me brindo muchos ánimos para continuar, a Regina por su amabilidad y cariño, agradezco también a todas las personas del departamento que en uno u otro momento me han ayudado en estos años.

Agradecimientos

También quiero agradecer a mi Familia, lo más importante que Dios me ha dado, a mi Madre: Dinorah Ureña Hernández, por su oraciones y apoyo emocional, a mi padre Modesto Alfaro Ugalde porque aunque no ha estado conmigo durante muchos años es parte importante en mi vida, a mi hermano, Henry Alfaro Ureña, y a la familia de Manuel: Don Manuel, Doña Carmen, Annia, Haylin, Pablo, Diego y Treicy porque todos ustedes son una bendición de Dios en mi vida, y llenan de alegría cada uno de mis días.

Y Por último, pero no por ello menos importantes a Bernardo Torres, Alfredo García, a Patxi y Pilar, a José Luis y Carmen, a Pedro, Janina y su hijo, a Jesús, a todo el grupo de jóvenes y al grupo de alabanza y a toda la congregación de la iglesia Cuerpo de Cristo, en Madrid, España, por su amistad durante estos años. Por otra parte a Don José Palma y Doña Marta de Palma, a José y Mary, a Randal y Yendry de la iglesia Pueblo de Cristo en Heredia, Costa Rica, por sus constantes oraciones que han sido de mucha ayuda

Abreviaturas

Abreviaturas

Abreviaturas

A	Adenina
Ac.U	Acido Úrico
ACV	Aciclovir
ADN	Acido desoxirribonucleico
Ado	Adenosina
AEE	Actividad específica de la enzima
AEE_{der}	Actividad específica del derivado inmovilizado
Ara-A	Arabinosiladenina
Ara-C	Arabinosilcitosina
Ara-U	Arabinosiluridina
ARN	Ácido ribonucleico
AZT	3'-azido-2',3'-didesoxitimidina
BSA	Albúmina de suero bovino (<i>bovine serum albumin</i>)
C	Citosina
CPME	Ciclopentenil metil éter
dAdo	2'-desoxiadenosina
DC	Dicroísmo circular
dCit	2'-desoxicitidina
ddl	2',3'-didesoxiinosina
dIno	2'-desoxiinosina
dUri	2'-desoxiuridina
DMSO	Dimetil sulfóxido
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
DpNDT	Nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa de <i>Desulfotalea psychrophila</i> .
dRib	2'-desoxirribosa
DSC	Calorimetría diferencial de barrido (Differential Scanning Calorimetry)
dUri	2'-desoxiuridina
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
H	Hipoxantina
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
Ino	Inosina
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranósido
<i>k_{cat}</i>	Constante catalítica
<i>k_{cat}/K_m</i>	Eficacia catalítica
Kn	Kanamicina
K_M	Constante de Michaelis-Menten
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
LfNDT	Nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa de <i>Lactobacillus fermentum</i>
LhNDT	Nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa de <i>Lactobacillus helveticus</i>
LhNDT1	Nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa de <i>Lactobacillus helveticus</i>
LINDT	Nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa de <i>Lactobacillus leichmanni</i> .

Abreviaturas

LrNDT	Nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa de <i>Lactobacillus reuteri</i>
MES	ácido 2-(<i>N</i> -morfolino) etanosulfónico
MRS	Medio Man-Rogosa-Sharpe
NDT	Nucleósido 2'-desoxirribosil transferasa tipo II
ORF	Marco de lectura abierto (Opened Reading Frame)
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
PEG	Polietilenglicol
PSA	Persulfato amónico
PTD	Nucleósidos 2'-desoxirribosiltransferasa tipo I
Pur	Purina
PyNP	Pirimidina nucleósido fosforilasa
Pyr	Pirimidina
SDS	Dodecilsulfato sódico (Sodium Dodecyl Sulphate)
TAE	Tampón Tris (40 mM) /EDTA disódico (2mM) / ácido acético 0,1142% m/v)
TE	Tampón Tris/HCl-EDTA
TEMED	Tetrametiletilendiamina
TES	Ácido tris (hidroximetil) metil-2-aminometanosulfónico
T_m	Temperatura de desnaturalización
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
Tyd	Timidina
TyNP	Timidina nucleósido fosforilasa
U	Uracilo
UI	Unidades internacionales de actividad enzimática
UNP	Uridina nucleósido fosforilasa
Uri	Uridina
V_{max}	Velocidad máxima de una enzima
2,6-“D”Amp	2,6-diaminopurina
2,6-damp	2,6-diaminopurina
5-“Br”U	5-bromouracilo
5-“Cl”U	5-clorouracilo
5-“F”U	5-fluorouracilo
5-“IU”	5-iodouracilo
6-“M”	6-mercaptapurina

ÍNDICE

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

1.	Biotecnología blanca y biotransformaciones	3
2.	Los nucleósidos: conceptos generales	4
3.	Análogos de nucleósidos	5
4.	Enzimas implicadas en la síntesis de nucleósidos	7
4.1	Nucleósido fosforilasas	7
4.1.1.	Purina nucleósido fosforilasas (PNPs)	8
4.1.2.	Pirimidina nucleósido fosforilasas (PyNPs)	9
4.2.	Nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasas	10
4.2.1.	Mecanismo de reacción de las nucleósidos 2'-desoxirribosiltransferasas	12
5.	Los microorganismos extremófilos como fuente de enzimas de interés biotecnológico	14
5.1.	El microorganismo psicrófilo <i>Desulfotalea psychrophila</i> :	15
6.	Inmovilización de enzimas	16
6.1.	Aspectos básicos sobre la inmovilización de enzimas	17
6.1.1.	Métodos de inmovilización	17
6.1.1.1.	Método de Inmovilización por retención física	17
6.1.1.2.	Método de inmovilización por unión química	20
6.1.2.	Ventajas y desventajas de los diferentes métodos de inmovilización	29
7.	Efectos de la inmovilización en la actividad y estabilidad de las enzimas	29
7.1.	Efecto de la inmovilización sobre la estabilidad enzimática	30
7.2.	Efectos de la inmovilización sobre la actividad enzimática	32

Índice

8.	Inmovilización de enzimas en quitosano	35
	8.1. Quitosano: características, propiedades y aplicaciones	35
	8.2. Aplicaciones del quitosano como soporte en inmovilización de enzimas	38
	8.3. Inmovilización de enzimas en partículas magnéticas de quitosano	44
	OBJETIVOS	47
	MATERIALES Y MÉTODOS	51
1.	Reactivos	53
2.	Microorganismos y plásmidos	54
3.	Oligonucleótidos sintéticos	55
4.	Medios de cultivo	56
5.	Revitalización y mantenimiento de las cepas	56
6.	Purificación del ADN de <i>Desulfotalea psychrophila</i> DSM 12343	57
7.	Transformación genética de las cepas de <i>E. coli</i>	57
	7.1. Transformación de las cepas	57
	7.2. Método de selección en <i>E. coli</i> de los plásmidos recombinantes	57
8.	Purificación del ADN plasmídico de <i>E. coli</i>	58
9.	Técnicas electroforéticas de ADN	58
10.	Secuenciación del ADN	59
11.	Clonación y expresión del gen <i>ndt</i> de <i>Desulfotalea psychrophila</i> DSM 12343	59
12.	Producción, aislamiento y purificación de la nucleosido 2'-desoxirribosiltransferasa (<i>Dp</i> NDT) de <i>Desulfotalea psychrophila</i> , producida por <i>E. coli</i> BL21 (pET24ndt)	61

13.	Cuantificación de la proteína	64
14.	Técnicas electroforéticas de proteínas	64
	14.1. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE)	64
	14.2. Electrotransferencia de proteínas a membranas de PVDF y análisis de la secuencia aminoterminal	65
15.	Caracterización funcional de la enzima <i>Dp</i> NDT recombinante	66
	15.1. Determinación de la actividad desorribosiltransferasa	66
	15.2. Estudio de la influencia del pH sobre la actividad y la estabilidad de la enzima	67
	15.3. Estudio de la influencia de la temperatura sobre la actividad y la estabilidad de la enzima	68
	15.4. Estudio de la influencia de la fuerza iónica sobre la actividad enzimática	69
	15.5. Determinación de los parámetros cinéticos de la <i>Dp</i> NDT recombinante	69
16.	Caracterización estructural de la enzima <i>Dp</i> NDT recombinante	70
	16.1. Espectroscopía de absorción UV-visible	70
	16.2. Cálculo del coeficiente de extinción molar	70
	16.3. Espectroscopía de fluorescencia	71
	16.4. Dicroísmo circular	71
	16.5. Microcalorimetría diferencial de barrido	72
	16.6. Ultracentrifugación analítica	73
	16.7. Modelización de la estructura terciaria	74
17.	Inmovilización de la <i>Dp</i> NDT recombinante	74

Índice

17.1. Producción de las partículas magnéticas	74
17.2. Unión covalente de la <i>Dp</i> NDT a las partículas magnéticas de quitosano	75
17.3 Determinación de la actividad de la <i>Dp</i> NDT recombinante inmovilizada	76
17.4. Estudio de la influencia del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática de derivado inmovilizado	77
18. Estudios de termoinactivación de la <i>Dp</i> NDT recombinante libre e inmovilizada	77
19. Síntesis de nucleósidos naturales y no naturales catalizada por <i>Dp</i> NDT recombinante libre e inmovilizada	78
20. Métodos analíticos para la determinación de la actividad enzimática	78
21. Reutilización de la enzima inmovilizada	80
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	81
1. Obtención de la nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa recombinante de <i>Desulfotalea psychrophila</i> DSM 12343	83
1.1. Amplificación, clonación y secuenciación del gen <i>ndt</i> de <i>Desulfotalea psychrophila</i> DSM 12343	83
1.2. Sobreexpresión del gen <i>ndt</i> de <i>Desulfotalea psychrophila</i>	87
2. Aislamiento y purificación de la nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa recombinante de <i>Desulfotalea psychrophila</i>	88
2.1. Cromatografía de intercambio iónico	89
2.2. Cromatografía de penetrabilidad en Superosa 12.	90
2.3. Análisis de la secuencia aminoterminal	92

3.	Determinación de la actividad de la <i>Dp</i> NDT recombinante	92
4.	Caracterización funcional de la <i>Dp</i> NDT recombinante	93
4.1.	Estudio de la influencia del pH sobre la estabilidad y actividad enzimática	94
4.2.	Estudio de la influencia de la temperatura sobre la actividad y estabilidad enzimática de la <i>Dp</i> NDT recombinante	96
4.3.	Estudio de la actividad de la enzima <i>Dp</i> DNT frente a fuerza iónica.	97
4.4.	Efecto de diferentes aditivos sobre la actividad de la <i>Dp</i> NDT	98
4.5.	Determinación de los parámetros cinéticos de la <i>Dp</i> NDT recombinante.	101
5.	Caracterización estructural de la <i>Dp</i> NDT recombinante	102
5.1.	Espectroscopía de absorción UV-visible	102
5.2.	Cálculo del coeficiente de extinción molar de la <i>Dp</i> NDT	103
5.3.	Espectroscopía de fluorescencia	103
5.4.	Espectro de dicroísmo circular	105
5.5.	Determinación de la temperatura de desnaturalización	108
5.6.	Ultracentrifugación analítica	110
5.7.	Predicción de la estructura terciaria de la <i>Dp</i> NDT recombinante	110
5.8.	Predicción del centro activo de la <i>Dp</i> NDT recombinante	112
5.9.	Estudio de la implicación del residuo C-terminal en la actividad De la <i>Dp</i> NDT recombinante mediante mutagénesis dirigida	115
6.	Inmovilización de la <i>Dp</i> NDT recombinante	116
6.1.	Caracterización funcional de la <i>Dp</i> NDT inmovilizada	120
6.1.1.	Estudio de la influencia del pH sobre la actividad	

Índice

	de la <i>Dp</i> NDT inmovilizada	120
	6.1.2. Estudio de la influencia de la temperatura sobre la actividad y estabilidad de la <i>Dp</i> NDT inmovilizada	121
7.	Estudios de termoinactivación de la <i>Dp</i> NDT libre e inmovilizada	122
8.	Síntesis de nucleósidos catalizada por la <i>Dp</i> NDT recombinante libre e inmovilizada	125
	8.1. Síntesis de nucleósidos naturales	127
	8.2. Síntesis de nucleósidos naturales utilizando bases poco solubles en disolventes acuosos	129
	8.3. Síntesis de nucleósidos no naturales	131
9.	Reutilización de la <i>Dp</i> NDT inmovilizado	137
		145
	CONCLUSIONES	
		151
	BIBLIOGRAFÍA	

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. Biotecnología blanca y biotransformaciones

En la actualidad, existe un creciente interés en el desarrollo de procesos ambientales más aceptables en la industria química o biotecnológica. Esta tendencia hacia lo que se conoce como tecnologías sostenibles se puede definir como la química verde o biotecnología blanca, en función del tipo de procesos, químicos o biotecnológicos. La definición de química verde se formuló por primera vez en 1993 por el Programa Química Verde de los EE.UU. de la Agencia de Protección Ambiental (EPA). La Biotecnología Blanca se suele definir como *la obtención de productos de alto valor añadido o de servicios, en condiciones sostenibles tanto desde el punto de vista del empleo de disolventes y de reactivos así como en la obtención de productos no contaminantes y/o no agresivos con el medio ambiente, utilizando biocatalizadores* (Alcalde y col., 2006; Schmid y col., 2002; Sheldon y Van Rantwijk, 2004). Por otro lado, la Asociación Europea de Bioindustrias (EuropaBio) define la biotecnología blanca como un campo emergente dentro de la biotecnología moderna que sirve a la industria para producir sustancias de interés. Por lo tanto, la biotecnología blanca puede ayudar a contribuir a la preservación del medio ambiente a la vez que favorece el desarrollo industrial, mediante el empleo de productos químicos menos peligrosos, disolventes inocuos, (Anastas, 2010; Hernaiz y col., 2010; Horvath y Anastas, 2007), minimizando de esta manera la producción de residuos en lugar de remediarlo posteriormente.

Por otro lado, las Biotransformaciones se definen como *“aquellos procesos en los que microorganismos o sus enzimas aisladas, transforman compuestos orgánicos de origen sintético”* (Faber, 2011). Estas reacciones químicas catalizadas por células, órganos o enzimas aprovechan las propiedades de las enzimas, como son la especificidad de sustrato y los elevados rendimientos de las reacciones catalizadas por las mismas, así como su capacidad para llevar a cabo las reacciones en condiciones

Introducción

de pH y temperatura no agresivas. Por esta razón, las biotransformaciones tienen un gran potencial para generar nuevos productos o para producir productos conocidos de manera más eficiente.

2. Los nucleósidos: conceptos generales

Los nucleósidos son moléculas que forman parte de la estructura de los ácidos nucleicos, se generan por medio de un enlace covalente entre una base heterocíclica purínica o pirimidínica con una pentosa ya sea ribosa o 2'-desoxirribosa. La uridina, la citidina, la adenosina, la guanosina, la timidina y la inosina son ejemplos de nucleósidos (Figura 1).

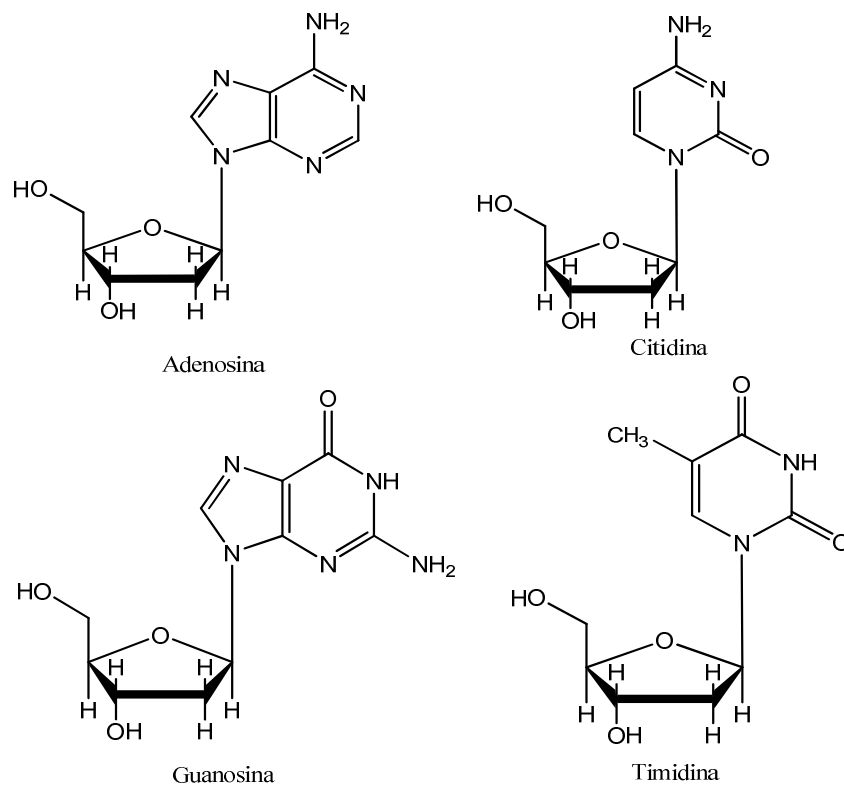


Figura 1: Nucleósidos naturales.

Por medio de la unión de una D-ribosa o 2'-D-desoxirribosa y una base heterocíclica púrica como adenina o guanina (mediante un enlace β -N-glucósido entre el carbono anomérico del azúcar y el nitrógeno N9 de la purina), o bien pirimidínica como citosina, timina o uracilo (mediante un enlace β -N-glucósido entre el carbono anomérico del azúcar y el nitrógeno N1 de la pirimidina) se conforman los nucleósidos naturales (Figura 1), los cuales una vez fosforilados dan lugar a los nucleótidos, los cuales son utilizados por todos los seres vivos para construir los ácidos nucleicos (ADN y ARN).

3. Análogos de nucleósidos

En los últimos años se ha prestado mucha atención al desarrollo de metodologías eficaces para la síntesis de nucleósidos análogos, ya que estos compuestos tienen potenciales implicaciones biológicas interesantes (Merino y *col.*, 1998). Al provocarse una pequeña alteración en la estructura química de los nucleótidos hace que se originen estructuras defectuosas de ácidos nucleicos, haciendo de esta forma que no puedan cumplir sus funciones o que se detenga la síntesis o reparación de los mismos; lo que ha permitido la utilización de las moléculas análogas sintéticas como fármacos antitumorales y antivirales entre otros usos. Como ejemplos podemos citar el aciclovir, el AZT, la ddl, la ribavirina, etc. (Elion y *col.*, 1977; Garg y *col.*, 1999; Keller y *col.*, 1981; Panchagnula y Patel, 1997; Schmid y *col.*, 2002; Utagawa, 1999)(Figura 2).

Tradicionalmente la síntesis de estos compuestos se ha llevado a cabo mediante diferentes métodos químicos que a menudo requieren largos procesos de varias etapas, incluyendo reacciones de protección-desprotección de grupos funcionales, sobre la base heterocíclica y/o el azúcar para permitir la modificación de los nucleósidos (Boryski, 2008), lo cual disminuye el rendimiento global de la reacción y encarece el proceso. La utilización de enzimas para la síntesis de análogos de nucleósidos en medios acuosos o en disolventes no contaminantes se muestra como una alternativa más ecológica y eficiente, lo que a su vez significa un proceso de síntesis menos agresivo con el medio ambiente, donde la química sintética tradicional es reemplazada (toda o en parte) por el uso de catalizadores naturales: las enzimas. En este sentido, un proceso enzimático para la síntesis de nucleósidos modificados

Introducción

supone una alternativa interesante a los procedimientos químicos conocidos. Este enfoque biotecnológico muestra muchas ventajas, como condiciones de reacción muy suaves, un proceso altamente regio y estereoselectivo y una tecnología respetuosa del medio ambiente (Lewkowicz y Iribarren, 2006; Li y col., 2010; Mikhailopulo, 2007; Trelles y col., 2003; Trelles y col., 2004).

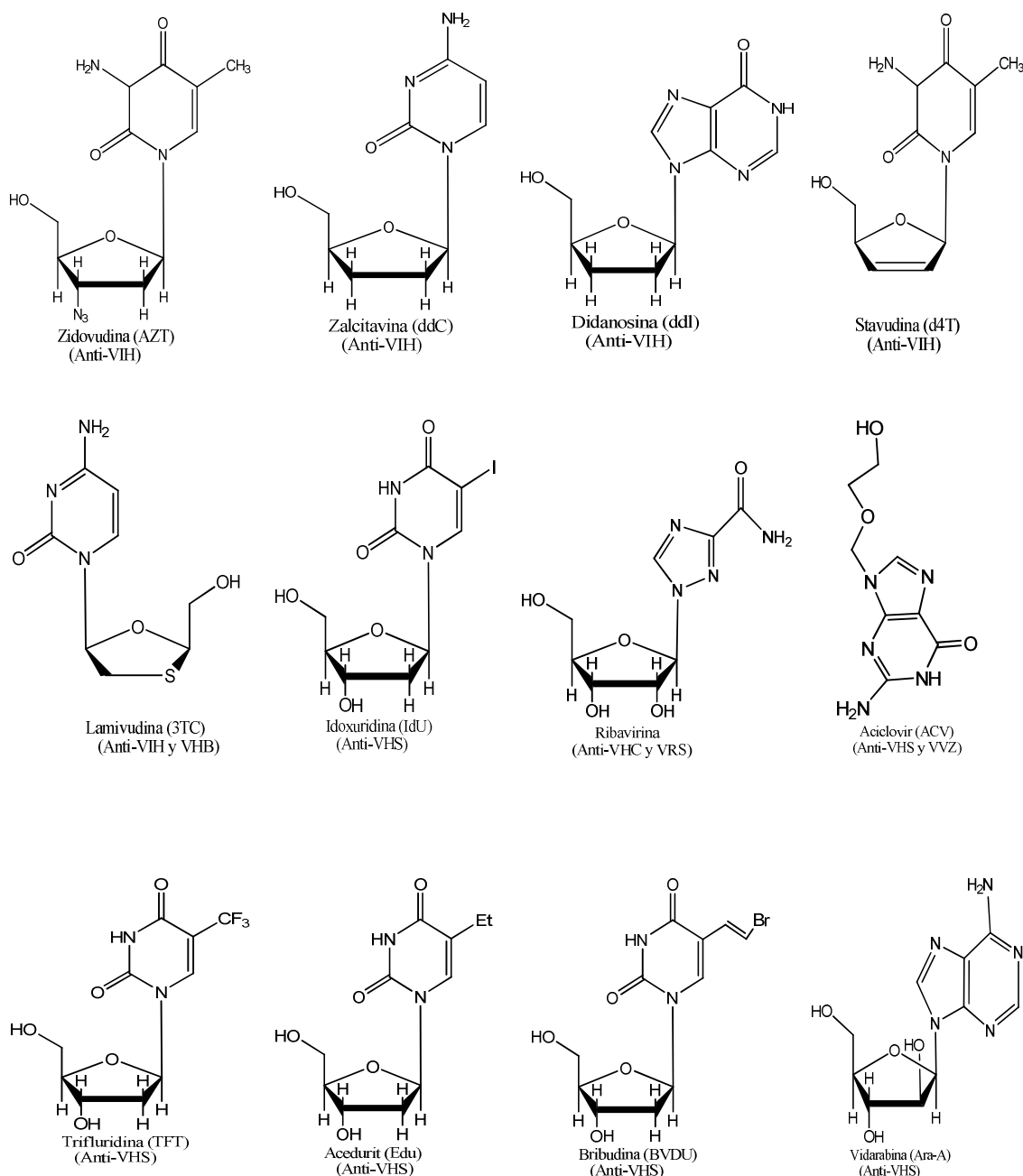


Figura 2: Análogos de nucleósidos con actividad terapéutica. (Mathé y Gosselin, 2006)

4. Enzimas implicadas en la síntesis de nucleósidos

La mayoría de los fármacos antivirales, pertenecen al grupo de los nucleósidos modificados, cuya especificidad se debe a la inhibición selectiva de enzimas involucradas en el metabolismo viral. Dada su importancia, se han desarrollado numerosos métodos químicos para la preparación de estas moléculas, aunque su compleja estructura hace que se requiera un elevado número de pasos de síntesis lo que a su vez aumenta el impacto de éstos procesos en el medio ambiente. La biocatálisis se presentan como una solución a estos problemas, debido a su bajo impacto ambiental, ya que la mayoría de los procesos se realizan eficientemente en agua (un disolvente inocuo para el medio ambiente y los seres vivos) y muchas de las reacciones son catalizadas en un único paso aumentando la eficacia del proceso.

La utilización de enzimas ha permitido explorar nuevos procesos biocatalizados de síntesis de nucleósidos en los que se introducen modificaciones que aumentan la diversidad estructural de los nucleósidos, y de esta forma obtener nucleósidos púricos y pirimidínicos a partir de otros nucleósidos previamente existentes. Existen dos tipos de enzimas que catalizan estos procesos, el primero son las nucleósido fosforilasas y el segundo son las nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasas.

4.1 Nucleósido fosforilasas

La familia de las nucleósido fosforilasas (PNPs) poseen poca especificidad por el anillo de pentosa y pueden catalizar el intercambio de bases entre ribonucleósidos o 2'-desoxirribonucleósidos (Figura 3). Agrupan una serie de actividades enzimáticas implicadas en la vía de rescate de nucleósidos de purina y pirimidina, y catalizan la fosforólisis reversible e independiente de ATP de nucleósidos. Dichas enzimas fueron descubiertas en 1911 (Levene y Medigreceanu, 1911).

Introducción

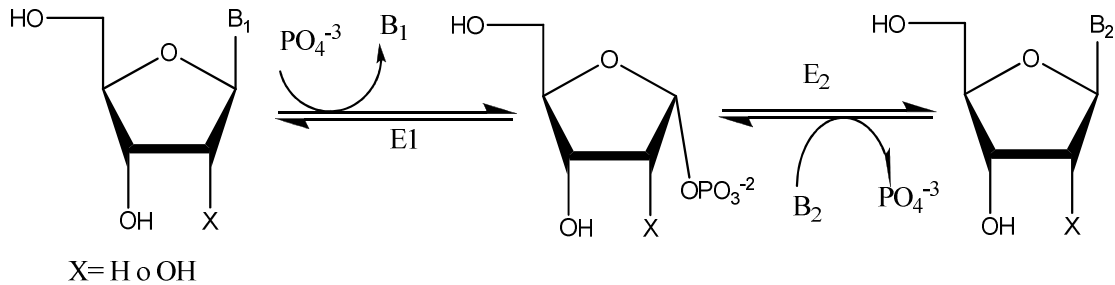


Figura 3: Reacción catalizada por los nucleósido fosforilasas donde B₁ y B₂ son pirimidina o purina, E₁ y E₂ son pirimidina o purina nucleósido fosforilasa respectivamente

Estas enzimas catalizan la fosforólisis reversible de ribonucleósidos o desoxirribonucleósidos con la formación de ribosa-1- α -fosfato o 2'-desoxirribosa-1- α -fosfato como intermedio reactivo, y la base correspondiente. Se conocen tanto **purina** (EC 2.4.2.1) como **pirimidina** (EC 2.4.2.2, EC2.4.2.3 y EC 2.4.2.4) **nucleósido fosforilasas** (Burns y *col.*, 1993; Lewkowicz y *col.*, 2000; Shirae y *col.*, 1988), que pueden ser de origen bacteriano o de tejidos de mamíferos.

Dentro del grupo de las nucleósido fosforilasas existen dos clases, según la base heterocíclica que reconocen (Pugmire y Ealick, 2002):

4.1.1. Purina nucleósido fosforilasas (PNPs).

Dentro de esta clase de nucleósido fosforilasas se pueden distinguir a su vez tres subclases:

- 1) **PNPs tipo I:** Ino-guanosina fosforilasas. Son enzimas homotrímeras de bajo peso molecular, sus masas oscilan entre 80 kDa y 100 kDa. Su especificidad de sustrato las convierte en enzimas que catalizan la síntesis de 6-oxo-purinas y sus nucleósidos. Un ejemplo es la PNP de *Bacillus steraothermophilus* TH6-2 (Zhou y *col.*, 1999).

- 2) **PNPs tipo II:** Son proteínas homohexaméricas de alto peso molecular con masas moleculares mucho más altas, entre 110 kDa y 160 kDa. Estas tienen la característica de ser menos específicas que las PNP tipo I; aceptan 6-oxo y/o 6-aminopurinas y uridina. También aceptan adenosina selectivamente respecto a guanosina. Un ejemplo de este tipo de enzimas son las PNP/UDP-1 de *E. coli* (Mao y col., 1997), y de *Salmonella typhimurium* (Robertson y Hoffee, 1973).
- 3) **PNPs tipo III:** Son enzimas homodiméricas, -triméricas, -tetraméricas o -hexaméricas. Con un peso molecular de entre 60 kDa y 180 kDa. Este grupo de enzimas se subdivide en dos: aquellos que poseen la misma especificidad que las PNP tipo I con la salvedad de que no son homotriméricas; y las que poseen la misma especificidad que las PNP tipo II con la salvedad de que no son homohexaméricas. Un ejemplo de este tipo de enzimas son las PNP de *Proteus vulgaris* (Surette y col., 1990) y de *Plasmodium falciparum* (Shi y col., 2004).

4.1.2. Pirimidina nucleósido fosforilasas (PyNPs)

Dentro de esta clase de nucleósido fosforilasas se pueden distinguir a su vez tres subclases:

- 1) **PyNPs tipo I:** Específicas principalmente de timidina y, en menor medida, de otros 2'-desoxirribonucleósidos pirimidínicos. Se las conoce comúnmente como timidina fosforilasas (**TyNP**) (Walter y col., 1990).
- 2) **PyNPs tipo II:** Específicas de uridina y en menor medida 2'-desoxiuridina, y conocidas también como uridina fosforilasas (**UNP**) (Krenitsky y col., 1965).
- 3) **PyNPs tipo III:** Antranilato fosforil transferasas. Pertenecen a la familia de las glicosiltransferasas, y efectúan la reacción de fosforólisis (en equilibrio con la síntesis) del N-(5-fosfo-D-ribosil)-antranilato con difosfato. Un ejemplo de este tipo

Introducción

de enzimas, es la aislada de *Pectobacterium carotovorum* la cual interviene en la biosíntesis de triptófano (Kim y col., 2002).

4.2. Nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasas

Son enzimas que catalizan el intercambio de bases entre 2'-desoxirribosilnucleósidos. Se encuentran abundantemente en microorganismos del género *Lactobacillus* y son específicas exclusivamente de 2'-desoxirribonucleósidos. (Figura 4). Estas enzimas han sido aisladas de *L. leichmanii* (Beck y Levin, 1963; Carson y Bruce-Wasson, 1988), *L. helveticus* (Kaminski, 2002; Krenitsky y col., 1981) y posteriormente en otras especies del mismo género, como *L. fermentum* (Kaminski y col., 2008) y *L. reuteri* (Fernández-Lucas y col., 2010). Las nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasas, también denominados trans-N-desoxirribosilasas (NDT), fueron descubiertas por primera vez por MacNutt en *Lactobacillus helveticus* (MacNutt, 1952) y posteriormente fue purificada por Roush y Betz (Roush y Betz, 1958). Todas las enzimas pertenecientes a esta familia exhiben una especificidad estricta sobre 2'-desoxirribosa, si bien se pueden observar diferencias en la especificidad en el reconocimiento de la base nitrogenada entre las diferentes enzimas aisladas hasta la fecha. Esto ha permitido su clasificación en dos subclases de enzimas según la reacción que catalizan:

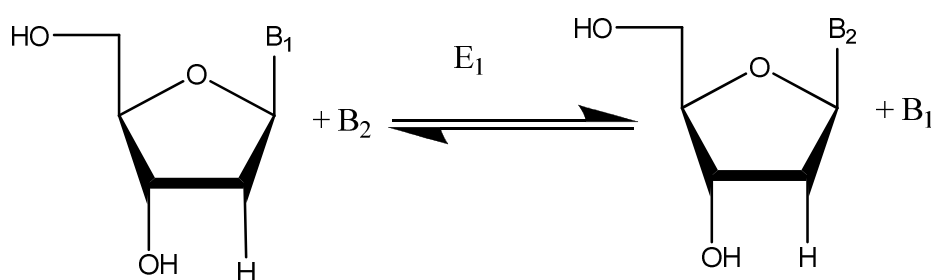
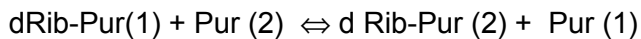


Figura 4: Reacción catalizada por las 2'-desoxirribosiltransferasas. B₁ y B₂: son pirimidina o purina, y E₁: 2'-desoxirribosiltransferasa

1. **NDTs tipo I:** son enzimas que catalizan la transferencia de las bases solo entre 2'-desoxirribonucleósidos purínicos y una purina (comúnmente llamadas NDTs tipo I, o PDTs).

La reacción esquematizada que catalizarían estas enzimas sería:



2. **NDTs tipo II:** son las enzimas que catalizan la transferencia de bases entre 2'-desoxirribonucleósidos independientemente del tipo de base. Comúnmente llamadas NDTs tipo II, o NDTs).

Las reacciones que catalizarían estas enzimas sería:

- i) $\text{dRib - Pur (1) + Pur (2)} \Leftrightarrow \text{d Rib-Pur (2) + Pur (1)}$
- ii) $\text{dRib-Pur + Pyr} \Leftrightarrow \text{d Rib-Pyr + Pur}$
- iii) $\text{dRib - Pyr (1) + Pyr (2)} \Leftrightarrow \text{d Rib - Pyr + Pyr (2)}$

en donde, dRib = 2'-desoxi-D-ribosa, Pur = base púrica y Pyr = base pirimidínica.

Estas enzimas se han aislado de bacterias lácticas (Carson y Bruce-Wasson, 1988; Ichikawa y Kato, 2001; Kaminski, 2002); y están implicadas en la ruta de salvamento de purinas para la síntesis de ADN (Hammer-Jespersen, 1983), aunque esto no está claro en el caso *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Miyamoto y col., 2007). Se han encontrado 2'-desoxirribosiltransferasas también en algunas especies de *Streptococcus* (Chawdhri y col., 1991), y organismos parasitarios unicelulares eucariotas como *Crithidia luciliae* (Steenkamp, 1992) y *Trypanoma brucei* (Bosch y col., 2006).

Dentro de la familia de los lactobacilos, se ha podido aislar, purificar y cristalizar las NDTs de *Lactobacillus leichmanni* y *L. helveticus*. En *Lactobacillus leichmanni*, la enzima presenta subunidades de aproximadamente 18 kDa las cuales oligomerizan para formar un hexámero. La Figura 5 muestra la estructura de la 2'-

Introducción

desoxirribosiltransferasa de *Lactobacillus leichmanni* clonada en *E. coli* BL21(DE3) (Armstrong y col., 1996).

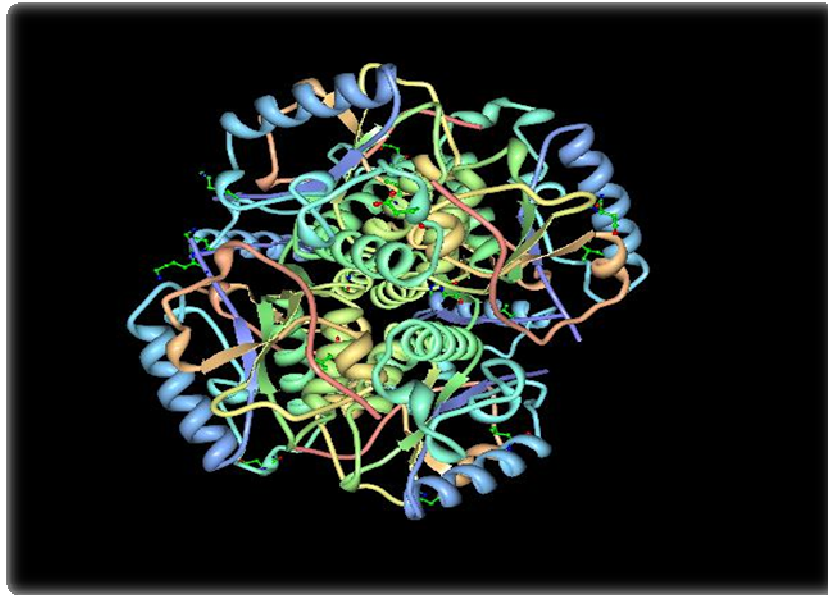


Figura 5: Estructura de la 2'-desoxirribosiltransferasa de *Lactobacillus leichmanni* (PDB, código 1F8X).

4.2.1. Mecanismo de reacción de los nucleósidos 2'-desoxirribosiltransferasas

El mecanismo catalítico descrito por las nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasas generalmente es un mecanismo ping-pong bi-bi (Danzin y Cardinaud, 1974; 1976) (Figura 6).

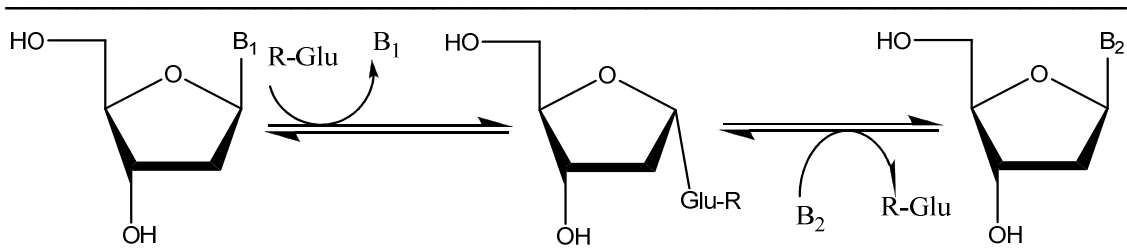


Figura 6: Mecanismo catalítico de las nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasas.

En este mecanismo está implicado un residuo de ácido glutámico que actúa como nucleófilo. Para la nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa de *Lactobacillus leichmanni*, se ha caracterizado la estructura del centro activo identificándose el ácido glutámico 98 como residuo esencial en la actividad, (Porter y col., 1995; Porter y Short, 1995b; Short y col., 1996) (Figura 7).

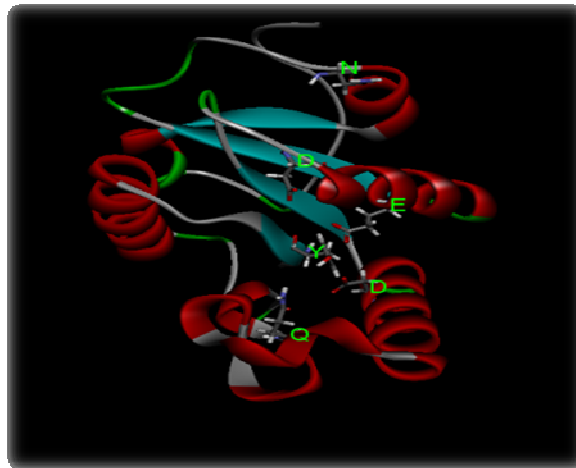


Figura 7: Centro activo de la nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa de *Lactobacillus leichmanni*. En la imagen aparecen las cadenas laterales de los aminoácidos que constituyen el centro activo Y4, Q45, D71 y 91, E98 y N122 (Short y col., 1996).

5. Los microorganismos extremófilos como fuente de enzimas de interés biotecnológico

Los ambientes extremos son aquellos en los que uno o varios de los parámetros de mayor relevancia para el desarrollo de la vida, como la temperatura, la acidez, la salinidad, la presión, o el nivel de radiación, se consideran hostiles para la vida desde el punto de vista del hombre. Los microorganismos que viven en estos ambientes se denominan extremófilos y están tan perfectamente adaptados al medio que todos sus componentes funcionan de manera óptima en esas condiciones extremas. Su maquinaria metabólica puede funcionar en condiciones que serían totalmente adversas para otros seres vivos. Entre los organismos extremófilos que resisten temperaturas extremas destacan los termófilos, que habitan a temperaturas de hasta 115 °C y los psicrófilos, que se reproducen a temperaturas inferiores a 5 °C.

Una de las principales aplicaciones biotecnológicas de los microorganismos extremófilos es su capacidad de producir de enzimas que pueden ser útiles en la composición de productos comerciales (detergentes), sistemas analíticos (biosensores, técnicas de detección de ADN), o procesos industriales (generación de alcohol a partir de maíz o de la paja de cereales como el trigo)(Demirjian y col., 2001). Entre las aplicaciones más llamativas de las enzimas de extremófilos están el uso de proteasas y lipasas en detergentes para lavado en frío o en caliente, y las ADN polimerasas termoestables que se usan rutinariamente en la técnica de la PCR, base de muchos análisis genéticos para la identificación forense, análisis clínicos o análisis de alimentos. De hecho, la PCR se pudo desarrollar gracias a la utilización de la polimerasa termorresistente de *Thermus aquaticus*, microorganismo aislado de las fuentes termales del parque de Yellowstone por Thomas Brock de la Universidad de Madison (EE.UU.) en los años 70 (Brock, 1997).

Actualmente se buscan microorganismos psicrófilos que produzcan nuevas enzimas con potencial biotecnológico que presenten buena actividad a bajas temperaturas (Cavicchioli y col., 2011; Cavicchioli y col., 2002; Hoyoux y col., 2004; van den Burg, 2003). Muchos de estos microorganismos psicrófilos suelen encontrarse en el agua o

en sedimentos marinos de zonas muy frías como los océanos Antártico y Ártico (Deming, 2002; Marx y col., 2007).

5.1. El microorganismo psicrófilo *Desulfotalea psychrophila*:

Desulfotalea psychrophila es una proteobacteria delta Gram-negativa reductora de sulfato. Se trata de un microorganismo psicrófilo que fue aislado por vez primera de un sedimento marino de la costa de Svalbard en el Ártico (Rabus y col., 2004). Puede soportar ambientes extremadamente fríos, pudiendo incluso sobrevivir en soluciones salobres y aguas marinas a temperaturas por debajo de 0 °C, concretamente hasta -1,7 °C (Rabus y col., 2004). Es un anaerobio estricto, cuya temperatura óptima de crecimiento está comprendida entre 10 °C y 18 °C, en medios con un pH comprendido entre 7,2 y 7,9. Por otra parte, el microorganismo necesita cloruro magnésico y cloruro sódico (10 g/L) para crecer, y puede utilizar ácidos carboxílicos, ácido fórmico, alcoholes y aminoácidos como fuente de carbono y donadores de electrones. Esta proteobacteria es capaz de reducir el sulfato, el sulfito y el tiosulfato a sulfuro, y el citrato férrico a citrato ferroso (Knoblauch y col., 1999). El microorganismo tiene forma de bastoncillo alargado (0,6 µm de ancho y 4,5-7,4 µm de largo) y, a veces, ligeramente curvado (Figura 8). *D. psychrophila* juega un papel importante en los ciclos energéticos globales de carbono y azufre, ya que es un miembro abundante de la comunidad bacteriana. Debido a que su hábitat natural son ambientes muy fríos, es una de las especies bacterianas amenazadas por el cambio climático.

El genoma de *Desulfotalea psychrophila* está constituido por un cromosoma circular de 3.523.383 pb, y dos plásmidos de 121.586 pb y 14.663 pb de longitud, con un total de 3118 genes putativos que codifican para la síntesis de distintas proteínas, incluida una nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa (secuencia NCBI: YP_064470.1). La información del genoma ha permitido la clonación, expresión en *E. coli*, y purificación de la arginina quinasa (Andrews y col., 2008) y la isocitrato deshidrogenasa (Fedoy y col., 2007) de este microorganismo para su posterior caracterización bioquímica.

Introducción

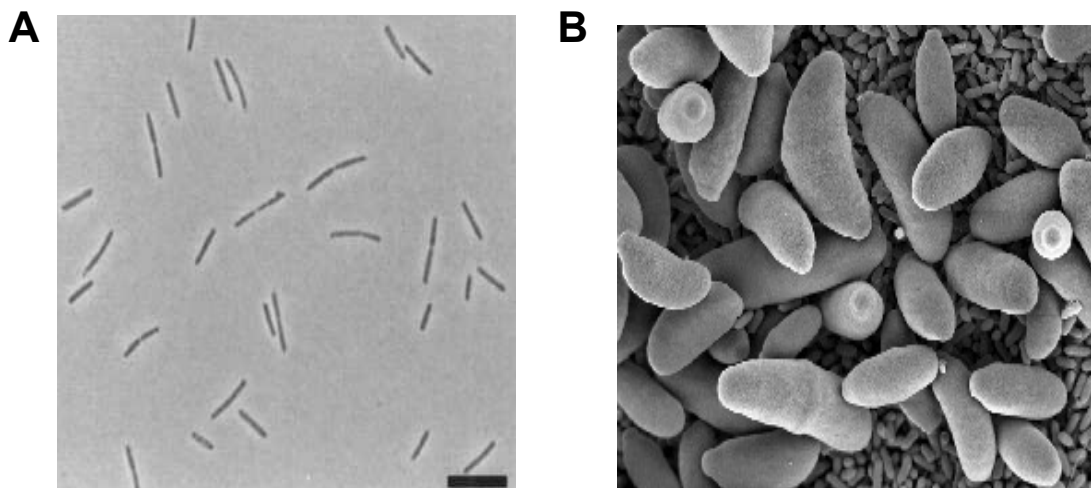


Figura 8: El microorganismo *Desulfotalea psychrophila*. (A) microfotografía de contraste de fase (barra 15 μm) (Knoblauch y col., 1999). (B) microfotografía en microscopio electrónico (tomada del NCBI) http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=bioproject&cmd=Retrieve&dopt=Overview&list_uids=12751.

6. Inmovilización de enzimas

Los procesos industriales catalizados por enzimas son cada vez más numerosos, ya que las enzimas presentan una serie de ventajas frente a los catalizadores químicos convencionales: presentan una elevada actividad catalítica y una gran especificidad de sustrato (en algunos casos, las enzimas son enantioespecíficas y regioselectivas) (Clark, 1994; García-Galan y col., 2011; Mateo y col., 2007a); y son muy activas a temperatura ambiente y presión atmosférica. En la mayoría de los casos, las enzimas se encuentran inmovilizadas, lo que ha permitido superar diversos inconvenientes inherentes a las enzimas en solución como su inestabilidad en diferentes condiciones de trabajo, su separación de los sustratos y productos del medio de reacción, o su reutilización en ciclos sucesivos de reacción. De esta manera, el empleo de enzimas inmovilizadas ha logrado que muchos procesos biotecnológicos sean económicamente rentables (Arroyo, 1998). Las técnicas de inmovilización de enzimas aparecieron en la década de los cincuenta del siglo XX (Hartmeier, 1985); a partir de entonces, las

16

aplicaciones de las enzimas inmovilizadas han ido aumentando progresivamente (Krajewska, 2004).

6.1. Aspectos básicos sobre la inmovilización de enzimas

La inmovilización se podría definir como un confinamiento de una enzima en una región definida del espacio, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica, y que pueden ser reutilizadas. Esta definición se ha ampliado con conceptos como la restricción completa o parcial de los grados de libertad de movimiento de las enzimas por su unión a un soporte (Arroyo, 1998). En este sentido, dicha unión, facilita su separación posterior del medio de reacción donde se encuentran los sustratos y productos. Sin embargo, las reacciones catalizadas por enzimas inmovilizadas son sistemas heterogéneos en los que la transferencia de masa está restringida, y por tanto, requieren generalmente un mayor tiempo de reacción en comparación con la misma enzima libre para alcanzar la misma conversión (Fernández-Lafuente y *col.*, 2000).

6.1.1. Métodos de inmovilización.

Se conocen dos tipos fundamentales de inmovilización de enzimas: la retención física y la unión química (Brady y Jordaan, 2009; Cao, 2005; Lalonde y Margolin, 2008; Sheldon, 2007).

6.1.1.1. Método de Inmovilización por retención física

Estos se clasifican en atrapamiento en matrices (geles o fibras) e inclusión en membranas (microencapsulación y reactores de membrana) (Figura 9).

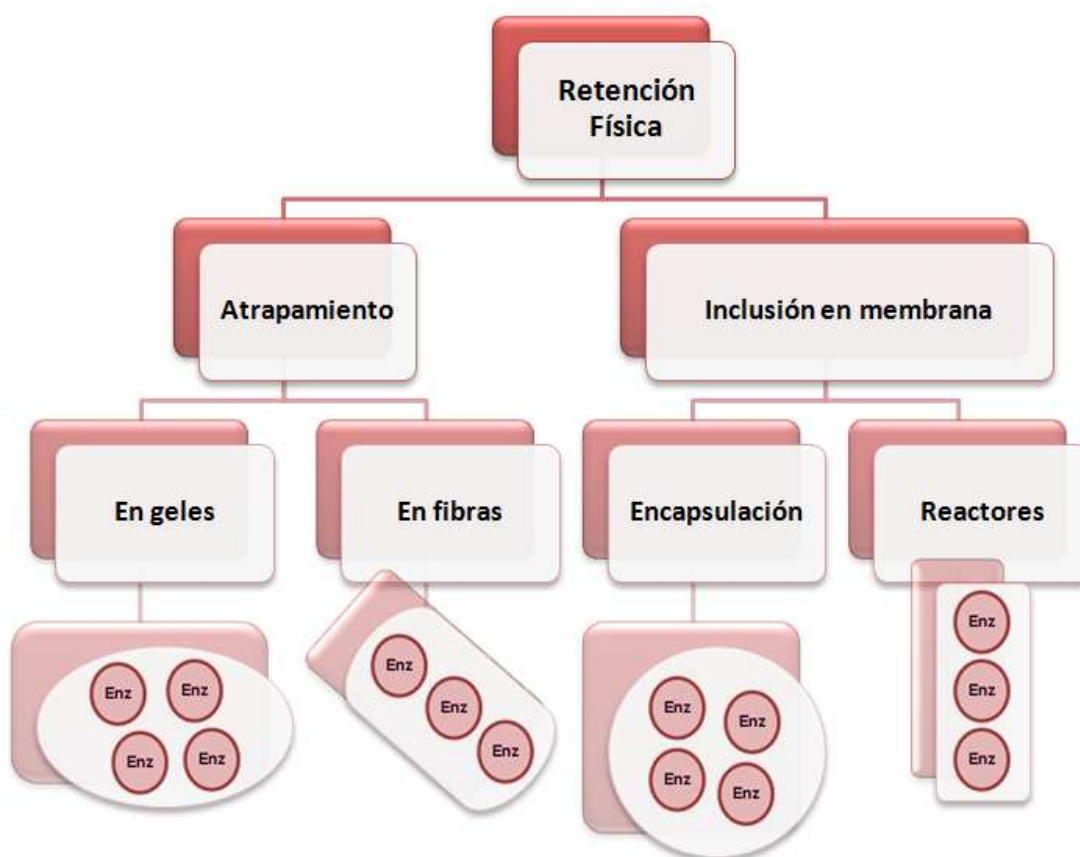


Figura 9: Métodos de inmovilización de enzimas mediante retención física.

1. Atrapamiento de enzimas

El atrapamiento consiste en la retención física de la enzima en las cavidades interiores de una matriz sólida porosa. Estas matrices son poliméricas, y pueden ser sintéticas o naturales. Entre las sintéticas destacan aquellas constituidas por prepolímeros fotoentrecruzables (Sheldon, 2007), resinas de poliuretano, poliacrilamida, o polímeros obtenidos mediante la polimerización de distintos precursores como silano/alquil-silano (Luckarift y *col.*, 2004), poli-siloxano/alcohol polivinílico (Santos y *col.*, 2008a; Santos y *col.*, 2008b) o poli(2-hidroxietilacrilato)/poli(dimetilsiloxano) (Bruns y Tiller, 2004). En cuanto a las matrices naturales empleadas para el atrapamiento de enzimas destacan los hidrogeles iónicos como el carragenato (van de Velde y *col.*, 2002), el pectato

(Nahalka y col., 2004), el alginato (Zhang y col., 2007; Zhang y col., 2009b), el quitosano (Krajewska, 2004); y los termogeles como el agar, la agarosa (Banerjee y Debnath, 2007) o la gelatina (Scardi, 1987). El proceso de inmovilización se lleva a cabo mediante la suspensión de la enzima en una solución del monómero, e inicio de la polimerización mediante un cambio de temperatura o mediante la adición de un reactivo químico. El atrapamiento de enzimas puede ser en geles o en fibras, que suelen ser más resistentes que los geles. En el caso de los geles, la enzima queda atrapada en el interior del gel, mientras que en el caso de la fibra la enzima se encuentra ocluida dentro de las microcavidades de una fibra sintética. El atrapamiento requiere poca cantidad de enzima para obtener derivados activos. Como ventaja adicional, la enzima no sufre ninguna alteración en su estructura este método protege a la proteína frente a interfases gas/liquido (burbujas de aire), estrés mecánico y disolventes orgánicos. De todas formas, el atrapamiento requiere un control riguroso de las condiciones de polimerización, así como la comprobación de que la naturaleza química del proceso no altera los grupos reactivos de la proteína (Arroyo, 1998). Como desventaja, se obtienen derivados con baja carga enzimática, y la transferencia de masa se encuentra limitada ya que el sustrato debe atravesar los poros de la matriz hasta alcanzar el centro activo de la enzima (Brady y Jordaan, 2009).

2. Inclusión de enzimas en membranas

En esta técnica de inmovilización, las enzimas se encuentran rodeadas de membranas semipermeables con un tamaño de poro determinado que permite el paso de moléculas de sustrato y de producto, pero no del biocatalizador. Existen dos modalidades dentro de la técnica: la microencapsulación y los reactores de membrana. En el proceso de **microencapsulación**, se pueden generar membranas semipermeables permanentes o no permanentes. Las membranas permanentes se originan mediante polimerización de tipo interfacial, obteniéndose microcápsulas tienen forma esférica, con tamaños comprendidos entre 1 y 100 μm de diámetro (Yi y col., 1998; Zhang y Rochefort, 2011). Por otra parte, se pueden generar membranas semipermeables no permanentes mediante la adición de surfactantes, permitiendo la obtención de *micelas*

Introducción

reversas y los *liposomas*. Las micelas reversas son estables en reacciones enzimáticas llevadas a cabo en disolventes orgánicos (Fadnavis y Deshpande, 2002; Tonova y Lazarova, 2008), mientras que los liposomas poseen una doble capa de surfactante que permiten su utilización en disolventes acuosos (Yoshimoto, 2011; Yoshimoto y col.).

Por otro lado, los **reactores de membrana** emplean membranas permeables al producto final, permeables o no al sustrato inicial y obviamente impermeables a la enzima (Agustian y col., 2011; Jochems y col., 2011). El control selectivo de sustratos y productos se realiza mediante el tamaño de poro de la membrana. Estas membranas sintéticas, disponibles comercialmente, tienen un tamaño de poro definido (en un intervalo de 500 a 300.000 Da). Mediante una bomba, se establece un flujo líquido de sustrato que atraviesa el reactor; en su interior sucede la reacción y el producto formado difunde libremente por la membrana. Este método está principalmente indicado para sustratos que tengan una elevada masa molecular y sean solubles en agua.

6.1.1.2. Método de inmovilización por unión química

Los métodos de inmovilización de enzimas por unión química se clasifican en dos tipos: unión a soportes y reticulado (o entrecruzamiento) (Figura 10).

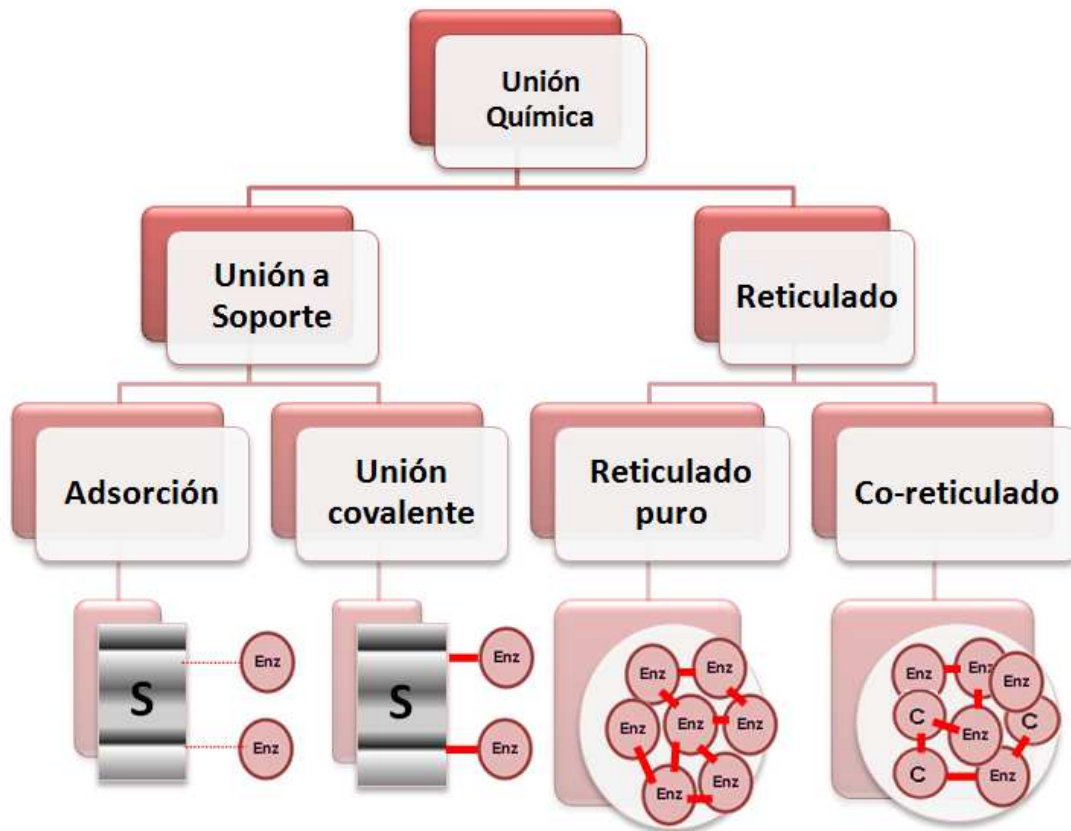


Figura 10: Métodos de inmovilización mediante retención química.

I. Unión de enzimas a soportes

La unión a soportes es el método de inmovilización más utilizado y del que se dispone de mayor información. La selección del soporte para inmovilizar debe tener en cuenta la resistencia mecánica del mismo a las condiciones de operación del reactor y que sea fácilmente separable del medio líquido para que el biocatalizador pueda ser reutilizado. Se han utilizado una gran variedad de materiales como soportes para la inmovilización de numerosas enzimas. Estos materiales difieren en tamaño, densidad, porosidad y forma, aunque generalmente se encuentran forma de cilindro, hojas, fibras y más corrientemente en forma de esferas (Arroyo, 1998). Los soportes pueden clasificarse en dos grandes grupos:

Introducción

- *Soportes inorgánicos*. En este grupo hay una gran variedad de soportes, que pueden ser naturales (arcillas como la bentonita, piedra pómez, sílice, entre otros.) o materiales manufacturados (óxidos de metales y vidrio de tamaño de poro controlado, vidrio no poroso, alúmina, cerámicas, gel de sílice, etc.).
- *Soportes orgánicos*. Estos se pueden clasificar en:
 - Polímeros naturales: a su vez divididos en polisacáridos (celulosa, almidón, dextranos, agar-agar, agarosa, alginatos, quitina, quitosano, etc) y proteínas fibrosas (colágeno, queratina, etc).
 - Polímeros sintéticos: divididos en poliolefinas (como el poliestireno), polímeros acrílicos (poliacrilatos, poliacrilamidas, polimetacrilatos, etc.), y otros tipos (alcohol polivinílico, poliamidas, etc).

Las enzimas se pueden unir a estos soportes mediante enlaces de tipo covalente y no covalente.

1) Unión no covalente a soportes

La unión no covalente a soportes se puede establecer mediante interacciones específicas e interacciones no específicas. Por otra parte, los factores clave que influirán en este tipo de unión van a ser (Figura 11):

- a) Las propiedades físicas del soporte: es conveniente una gran área superficial ($>100 \text{ m}^2/\text{g}$) y un diámetro de poro grande ($>30 \text{ nm}$) para que la enzima y el sustrato puedan penetrar fácilmente.
- b) Las propiedades químicas del soporte: si el soporte está funcionalizado, los grupos funcionales van a determinar el tipo de interacción entre la enzima y el soporte.
- c) En la interacción también influirán las características intrínsecas de la enzima como su carácter hidrofóbico o hidrofílico, o su punto isoeléctrico.
- d) Las características del medio, como el pH o la fuerza iónica.

Introducción

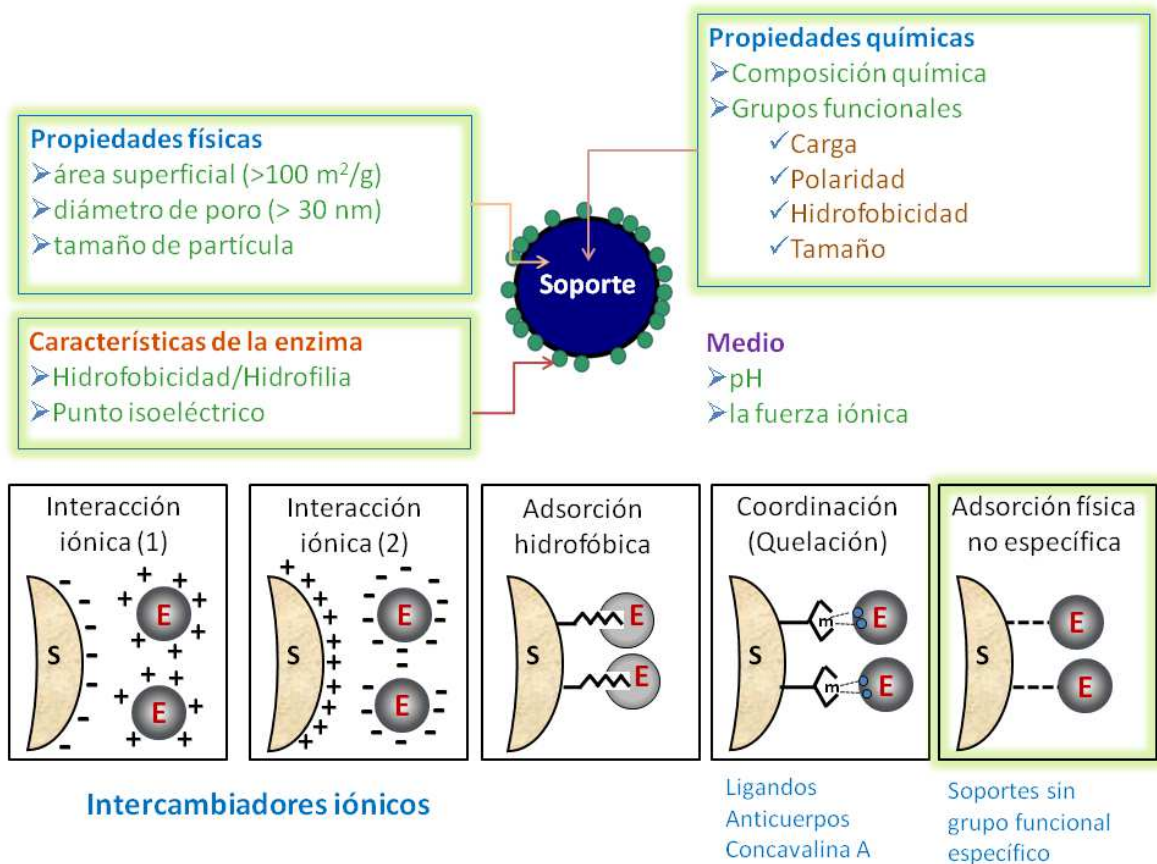


Figura 11: Factores que influyen en la inmovilización no covalente a soportes y tipos de unión.

Teniendo en cuenta estos factores, la unión a soportes mediante interacción no covalente se puede clasificar en:

- Unión por interacción iónica:* entre grupos cargados (negativos o positivos) del soporte con aquellos aminoácidos cargados que posee la enzima a un determinado valor de pH dependiendo del valor de su punto isoeléctrico. Existen muchos soportes modificados a los cuales se les ha introducido grupos susceptibles de estar cargados (grupos ionogénicos). Son los denominados intercambiadores iónicos (catiónicos y aniónicos).
- Unión por adsorción hidrofóbica:* mediante interacción hidrofóbica entre grupos funcionales del soporte (que pueden variar en longitud) con regiones o dominios hidrofóbicos de las moléculas de enzima. Los soportes (polímeros

Introducción

naturales, sintéticos, o inorgánicos) se activan con moléculas hidrofóbicas (cadenas butilo, hexilo, octilo, palmitoilo, titron X-100, etc).

- c) *Unión mediante coordinación o quelación*: se establece una interacción entre un metal de transición fijado al soporte (cobre, níquel, etc.) con determinados aminoácidos en la superficie de la enzima que contienen grupos sulfhidrilo, carboxilo o histidilo como cadena lateral.
- d) *Unión mediante interacción biospecífica*: interacción de diversos ligandos fijados al soporte con zonas complementarias de la enzima. Los principales ejemplos son la unión de anticuerpos al soporte, o de concavalina A que une específicamente enzimas glicosiladas.
- e) *Unión por adsorción física no específica*: el soporte carece del grupo funcional específico responsable de un tipo de interacción específica, pero la enzima se une al soporte por acción de una serie de diversas fuerzas no específicas que pueden coexistir. Las interacciones resultantes se pueden clasificar como de tipo hidrofóbico, hidrofílico e iónico.

2) Unión covalente a soportes

La unión covalente de una enzima a un soporte es quizá el método de inmovilización más interesante desde el punto de vista industrial, y su metodología se basa en la reactividad de grupos químicos existentes en el soporte para que reaccionen con grupos nucleófilos de la enzima expuestos hacia el exterior de la superficie proteica. La lisina, la cisteína, la tirosina y la histidina son los aminoácidos que intervienen en este enlace más comúnmente, y en menor medida la metionina, el triptófano, la arginina y el ácido aspártico y glutámico. Los demás aminoácidos, debido a su carácter hidrófobo, no se encuentran expuestos hacia el exterior de la superficie proteica, y no pueden intervenir en la unión covalente (Arroyo, 1998). En este tipo de inmovilización, no existe ninguna regla que permita seleccionar el mejor soporte para una determinada aplicación industrial. Sin embargo, existen soportes comerciales activados con grupos epóxido (Boller y col., 2002; Fernández-Lafuente, 2009; Katchalski-Katzir y Kraemer, 2000; Mateo y col., 2002) y grupos aldehído (Mateo y col., 2007b; Rodrigues y col., 2011) que han resultado muy eficientes en la

Introducción

inmovilización de enzimas de interés industrial (Fernández-Lucas y *col.*, 2011a; Hormigo y *col.*, 2010; Hormigo y *col.*, 2009; Kunamneni y *col.*, 2008) (Figura 12 A).

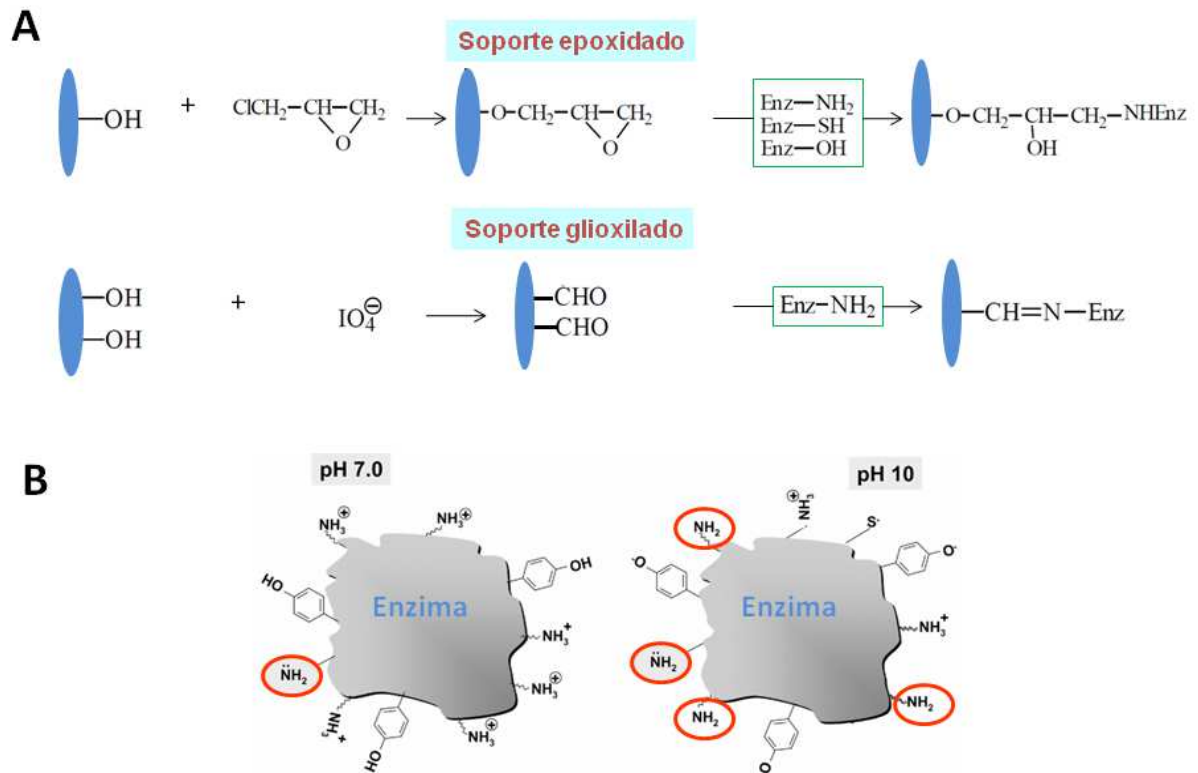


Figura 12: Inmovilización de enzimas por unión covalente a soportes. (A) Unión covalente a soportes epoxidados y glioxilados (B) Efecto del pH en el carácter nucleofílico del grupo ϵ -amino de las lisinas situadas en la superficie de la enzima.

Durante el proceso de acoplamiento, las condiciones de inmovilización deben ser las adecuadas para favorecer la unión covalente de la enzima al soporte. En el caso de que la unión al soporte se establezca preferentemente a través de las lisinas, el pH del tampón de inmovilización debe ser 10 de tal manera que permita que los grupos ϵ -amino de las lisinas estén desprotonados y, por tanto, tengan el carácter nucleofílico necesario para que se establezca la unión covalente (Figura 12 B).

Por otro lado, la fuerza iónica del tampón en algunos casos favorece la adsorción hidrofóbica de algunas enzimas como paso previo al ataque nucleofílico. Por ejemplo, en la unión a soportes epoxidados, es conveniente utilizar un tampón 1M de fuerza

Introducción

iónica para que aumente la concentración efectiva de enzima en la superficie del soporte. Posteriormente los grupos nucleofílicos de la enzima atacarán el anillo oxirano (o epóxido) para dar lugar al enlace covalente.

La unión covalente de enzimas a soportes presenta las siguientes ventajas:

- a) La manipulación de los derivados inmovilizados es muy sencilla;
- b) La carga de enzima permanece constante después de la inmovilización;
- c) Los derivados pueden utilizarse en reactores en continuo, empaquetados, de lecho fluidizado, o tanque agitado.
- d) Una mayor resistencia a la desactivación por el efecto de la temperatura, de los disolventes orgánicos o del pH, al tener estabilizada su estructura terciaria.

Sin embargo, la unión covalente de enzimas a soportes presenta los siguientes inconvenientes:

- a) Es necesario conocer la densidad de grupos activos por unidad de superficie, ya que condiciona el número de uniones enzima-soporte y su geometría, que puede ser distorsionante y conducir a derivados inactivos.
- b) El proceso de inmovilización puede alterar la estructura del centro activo. Para evitar esta posible alteración, se realiza la inmovilización en presencia de un inhibidor que bloquee el centro activo.
- c) La inmovilización covalente no es aconsejable en aquellas enzimas muy sensibles a cambios de pH y/o fuerza iónica.

II) Reticulado o entrecruzamiento de enzimas

El reticulado de enzimas, también denominado entrecruzamiento o *cross-linking*, es una técnica que ha sido ampliamente utilizada en la estabilización de muchas enzimas (Cao y col., 2000; Sheldon, 2007; Wong y Wong, 1992). Este método consiste en el

26

Introducción

uso de reactivos bifuncionales que originan uniones intermoleculares entre las moléculas de enzima; por tanto, la misma enzima es el soporte de inmovilización. Como reactivos bifuncionales se pueden emplear dialdehídos, diiminoésteres, diisocianatos, sales de bisdiazonio e, incluso, diaminas si están activadas con carbodiimida. El agente reticulante de enzimas más empleado es el glutaraldehído (Figura 13). Este reactivo reacciona con las lisinas situadas en la superficie de la enzima dando lugar a una primera base Schiff. El grupo aldehído libre puede establecer otro enlace covalente con otra molécula de enzima. Finalmente se puede reducir opcionalmente el doble enlace de la base de Schiff para obtener los enlaces covalentes sencillos. El resultado del reticulado es un entramado de enzimas con enlaces intermoleculares irreversibles capaces de resistir condiciones extremas de pH y temperatura. La estructura cristalina posee canales microscópicos (20-50 Å) que permiten el paso de sustratos hasta el centro activo de la enzima donde se cataliza la reacción. Las enzimas reticuladas son muy estables ya que contienen enlaces intermoleculares irreversibles capaces de resistir condiciones extremas de pH y temperatura.

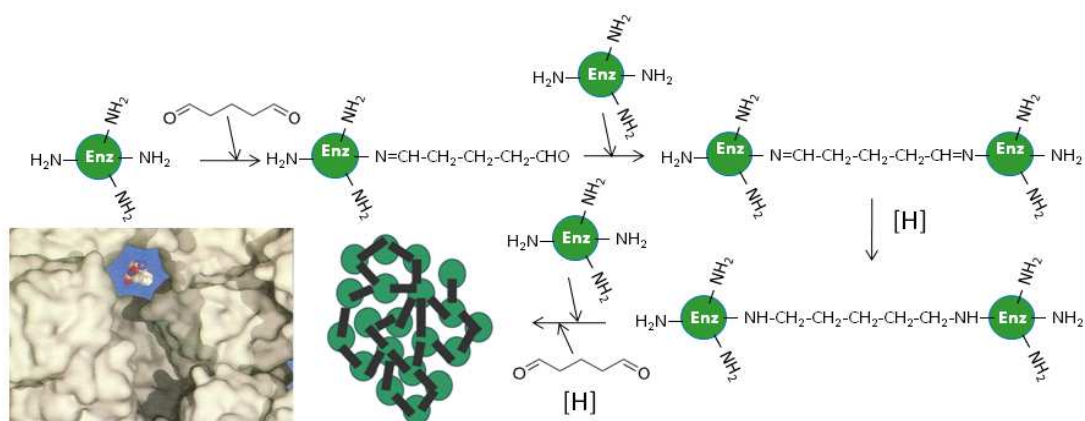


Figura 13: Reticulado de enzimas con glutaraldehído.

Se pueden preparar diferentes enzimas inmovilizadas mediante esta técnica:

- 1) **CLECs** ("Cross-Linked Enzyme Crystals"): En primer lugar se procede a la cristalización de la enzima de tal manera que se forma un entramado cristalino

Introducción

donde las moléculas de proteína se encuentran muy próximas (Roy y Abraham, 2004). Los CLECs poseen una elevada estabilidad mecánica, soportan temperaturas elevadas y valores extremos de pH, así como la acción de proteasas. Una ventaja de este sistema es la ausencia de proteínas contaminantes con otras actividades enzimáticas, ya que los cristales están constituidos por una única enzima. Sin embargo, su preparación es cara ya que requiere soluciones de enzima muy pura que sea fácilmente cristalizable (Margolin, 1996) (Roy y col., 2005) (St. Clair y Navia, 1992).

- 2) **CLEAs** (“*Cross-Linked Enzyme Aggregates*”): más económico que el método anterior, consiste en precipitar la enzima y posteriormente reticular los agregados obtenidos tras la precipitación (Cao y col., 2000; Sheldon y col., 2005). La formación previa de agregados se puede realizar mediante la adición de agentes precipitantes como disolventes (acetona, *t*-butanol), sulfato amónico o polietilenglicol. Los CLEAs son partículas de aproximadamente 50-100 μm de diámetro. A través de sutiles modificaciones en las condiciones de entrecruzamiento se pueden modificar las propiedades de los CLEAs. La coagregación de la enzima con una proteína sin actividad enzimática rica en lisinas como la albúmina de suero bovino (BSA) permite la obtención más eficiente de CLEAs de enzimas que posean grupos ϵ -amino esenciales para la actividad enzimática.
- 3) **Esferezimas** (“*Spherezymes*”): consiste en la formación de una emulsión de agua en aceite donde se encuentra la enzima a inmovilizar, y posterior reticulado. Este tipo de biocatalizador se ha preparado con lipasas (Brady y col., 2008). Las lipasas poseen un bucle en su estructura a modo de tapadera que cierra el centro activo, y que se abre en la interfase de una emulsión. De esta manera, orientan su centro catalítico hacia la fase constituida por el aceite y tras la adición del glutaraldehído, quedarán reticuladas y con el centro activo correctamente orientado para la catálisis.

6.1.2. Ventajas y desventajas de los diferentes métodos de inmovilización

Aunque se han desarrollado y aplicado muchas técnicas de inmovilización a numerosas enzimas, se reconoce que no existe un único método universal válido para inmovilizar. No obstante, gracias a toda la información disponible en la actualidad, se pueden hacer generalizaciones sobre cada método de inmovilización y así, se puede seleccionar el más adecuado para cada aplicación específica. La elección ha de tener en cuenta las condiciones de la reacción biocatalizada, el tipo de reactor que se vaya a utilizar, el tipo de sustrato que tenga que ser procesado y otros factores. En general, los métodos de preparación difícil y de mayor coste proporcionan biocatalizadores más estables y duraderos; en cambio aquellos métodos más sencillos como el atrapamiento o la unión no covalente a soportes, originan derivados inmovilizados que presentan pérdidas de actividad y que deben ser repuestos continuamente. Por ejemplo, las técnicas de unión no covalente a soportes son fáciles de realizar y con costes mínimos. Por otro lado, permiten la recuperación del soporte una vez la enzima se ha desactivado completamente ya que la unión es débil. En el caso de inmovilización covalente, el soporte no se puede reutilizar una vez que la enzima se ha desactivado completamente. Como ventaja, los enlaces enzima-soporte son irreversibles, lo que permite seguir reutilizando el biocatalizador siempre y cuando la enzima siga manteniendo su actividad. Una vez elegido el método más conveniente, los derivados que se preparen deben estar caracterizados según las indicaciones establecidas internacionalmente (The European Federation of Biotechnology, 1983).

7. Efectos de la inmovilización en la actividad y estabilidad de las enzimas

A menudo, la inmovilización altera significativamente el comportamiento de las enzimas, de tal manera que puede haber cambios significativos en su actividad, estabilidad y especificidad de sustrato.

Introducción

7.1. Efecto de la inmovilización sobre la estabilidad enzimática

Generalmente, se observa un incremento en la estabilidad de las enzimas después de su inmovilización, que se debe principalmente a las siguientes razones (Klibanov, 1983):

- a) Se evita la agregación intermolecular al mantener las moléculas de enzima retenidas en una determinada región del espacio.
- b) Se produce una protección frente a las proteasas en el medio. Este caso se ha comprobado que la unión de proteasas a un soporte elimina su capacidad proteolítica, y evita su autólisis.
- c) Existe una alteración del microentorno del enzima debida a la interacción de la enzima con el soporte. Por ejemplo, el soporte puede tener un efecto tamponador de tal manera que mantiene el pH óptimo de la enzima en su microentorno, aunque en la disolución se produzcan cambios importantes de pH.
- d) Aquellas enzimas inmovilizadas en soportes porosos se encuentran protegidas frente a las burbujas de aire que se producen durante la agitación del medio de reacción necesaria para mantener el pH, o por burbujas originadas por el suministro de algún gas necesario para la reacción que producen la desactivación de las enzimas en solución.

El incremento en la estabilidad de las enzimas después de su inmovilización también se debe a una estabilización conformacional en la que la estructura terciaria de la enzima adquiere una mayor rigidez y se hace más resistente a la desactivación térmica o química. Este tipo de estabilización se obtiene únicamente en aquellos métodos en los que intervienen enlaces covalente, como el reticulado o la unión a soportes activados. El grado de estabilización de una enzima por efecto de la inmovilización se estima a través de la medida de la persistencia de actividad catalítica, expresada como porcentaje actividad residual, en unas determinadas condiciones (por ejemplo, a una temperatura elevada). Tras la incubación de la enzima libre o inmovilizada en dichas condiciones, se realiza una medida de actividad y se compara con la actividad original, obteniéndose las denominadas curvas o cinéticas de desactivación térmica. Estas curvas se pueden ajustar a distintos modelos, y permiten calcular la vida media de las enzimas libres e inmovilizadas, es decir el tiempo que

tarda una enzima en perder el 50% de su actividad enzimática. El factor de estabilización es la relación entre ambas vidas medias. Otro efecto de la estabilización es un desplazamiento, hacia valores más elevados, en la temperatura a la cual la enzima presenta máxima actividad.

Se puede generalizar que a mayor grado de rigidez debido a la unión a un soporte, mayor es el incremento de estabilidad (Mateo y *col.*, 2007b). El grado de rigidez se puede variar empleando soportes más o menos activados (Figura 14). En el caso de soportes poco activados, se producen inmobilizaciones de tipo unipuntual, por lo que la enzima se encuentra más flexible, prácticamente como en solución. Por el contrario, la inmobilización covalente multipuntual con soportes muy activados da una mayor rigidez a la estructura de la enzima. Esta estabilización se traduce en una mayor vida media de la enzima inmobilizada con respecto a la enzima libre, y factores de estabilización muy elevados. Por ejemplo, la quimotripsina inmobilizada en soportes glioxilados muy activados ha permitido incrementar 60.000 veces la vida media de la enzima unida unipuntualmente al mismo soporte (Guisan y *col.*, 1991). Los soportes muy activados también permiten la inmobilización de enzimas multiméricas, evitando la separación de las subunidades que en muchos casos conduciría a la desactivación enzimática (Fernández-Lafuente y *col.*, 1999).

Introducción

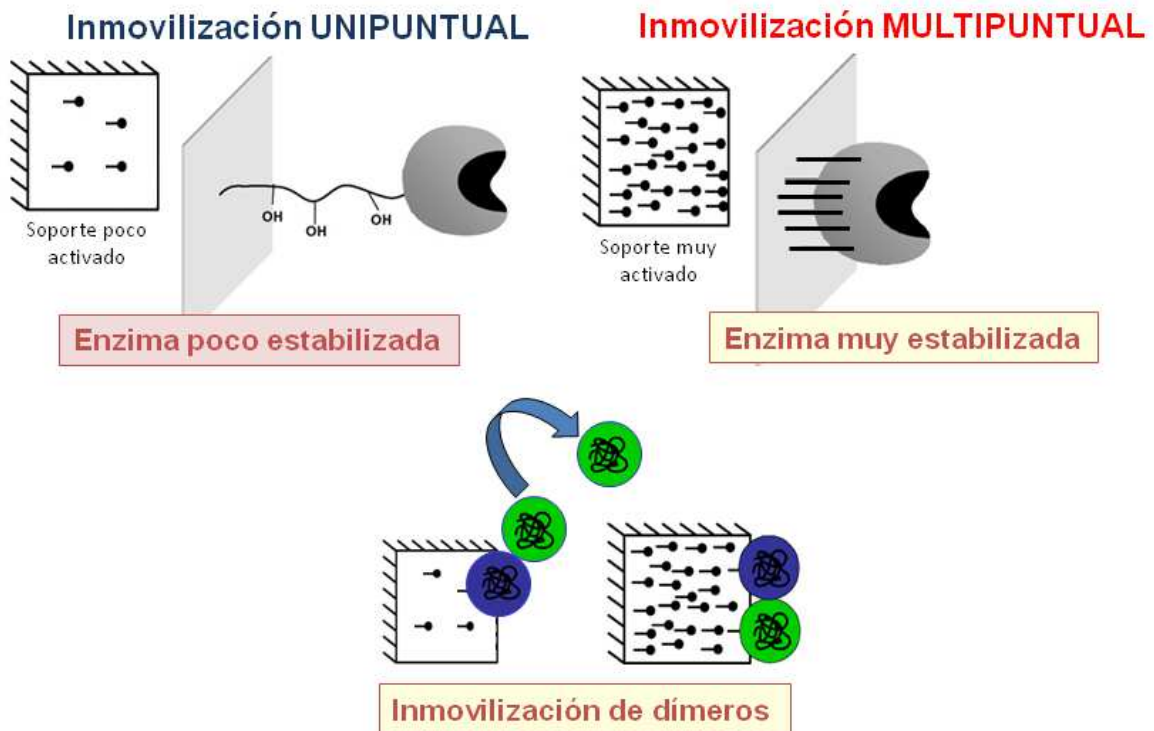


Figura 14: Efecto de la activación del soporte en la estabilización de las enzimas inmovilizadas

7.2. Efectos de la inmovilización sobre la actividad enzimática

Tras una inmovilización, la actividad de la enzima puede disminuir e incluso perderse por diversas razones. Si pierde totalmente la actividad enzimática puede ser debido a diversas razones:

- la unión al soporte se produce de tal forma que el paso del sustrato al centro activo está impedido;
- los grupos reactivos del soporte reaccionan con algún aminoácido que forme parte del centro activo o que sea esencial para la actividad catalítica de la enzima;
- la inmovilización puede originar un cambio conformacional que da lugar a una forma inactiva;
- las condiciones experimentales del proceso causan la desnaturalización o desactivación de la enzima.

Si la pérdida de actividad no es total después de la inmovilización, los cambios (disminución o aumento de la actividad enzimática) se deberán principalmente a efectos difusionales, electrostáticos, estéricos y/o del microentorno.

I) **Efectos difusionales:** Como consecuencia de la inmovilización, la difusión de los sustratos hacia el centro activo de la enzima puede estar impedida por resistencias de tipo externo e interno (Figura 15). Las *resistencias difusionales externas* aparecen en enzimas inmovilizadas en soportes insolubles en el medio de reacción; en estos casos, el sustrato deberá atravesar la película líquida estacionaria (capa de Nernst o de difusión) que rodea el soporte. En las proximidades de un soporte no cargado, la concentración de sustrato es menor que en el resto de la disolución, puesto que existe un gradiente de concentración a través de la zona de difusión. Por tanto, los valores de K_m para las enzimas inmovilizadas son siempre aparentes (K_m^{\wedge}). Por otro lado, las *resistencias difusionales internas* son debidas a la dificultad de los sustratos para atravesar el interior del gel, microcápsula, fibra o poro del soporte donde se encuentra la enzima inmovilizada.

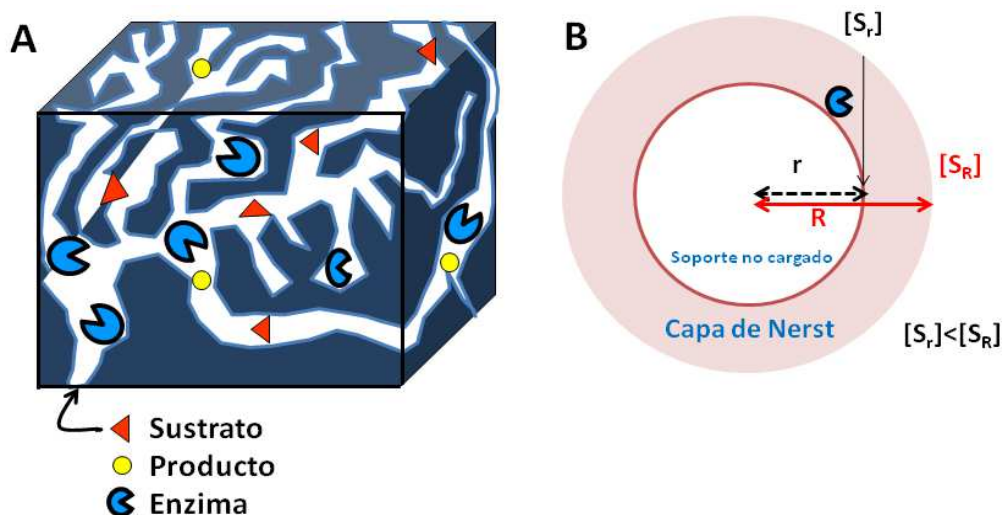


Figura 15: Efectos de difusión del sustrato al centro activo de la enzima inmovilizada. (A) Efectos difusionales internos, (B) efectos difusionales externos.

Introducción

II) Efectos electrostáticos entre el sustrato y el soporte. En el caso de enzimas inmovilizadas en soportes cargados negativamente, si el sustrato también está cargado negativamente, existirá una repulsión mutua, lo que se traducirá en una reducción de la concentración efectiva de sustrato y por tanto de actividad con respecto a la enzima libre. En este caso, el valor de K_m' aparente puede verse reducido hasta varias veces por debajo del obtenido en disolución. Por el contrario, si el sustrato posee carga positiva, habrá una atracción del sustrato hacia el soporte, con lo que aumentará la concentración efectiva de sustrato y por tanto aumentará la actividad enzimática con respecto a la enzima libre.

III) Impedimentos estéricos de sustrato. En un principio, cualquier enzima puede ser inmovilizada sin que haya una pérdida apreciable de su actividad. Este hecho suele ser válido en el caso de que el sustrato sea de bajo peso molecular, pero si se trata de sustratos con pesos moleculares elevados, la actividad de la enzima inmovilizada disminuye drásticamente. Este “efecto estérico” se puede evitar mediante una inmovilización covalente a través de un brazo espaciador enzima-soporte más largo.

IV) Efectos en el microentorno. Cuando una enzima se encuentra unida a un soporte con grupos cargados eléctricamente, la enzima inmovilizada se encuentra en un entorno diferente al habitual (Figura 16). El efecto observado suele ser un desplazamiento en el valor del pH óptimo de la catálisis enzimática y, muchas veces, un mayor intervalo de pH en el cual la enzima presenta máxima actividad. Si se encuentra unida a un soporte cargado positivamente (por ejemplo, DEAE-sephadex), la enzima tendrá en su microentorno una concentración menor de hidrogeniones debido a una repulsión de cargas. Por tanto, el pH del microentorno será mayor que el pH del medio, y como resultado habrá un desplazamiento del pH óptimo de la enzima hacia valores más ácidos. Por el contrario, una enzima unida a un soporte cargado negativamente (por ejemplo, CM-sephadex) tendrá en su microentorno una concentración mayor de hidrogeniones que en el medio de reacción. En este caso, la enzima inmovilizada será más activa a un pH más alcalino.

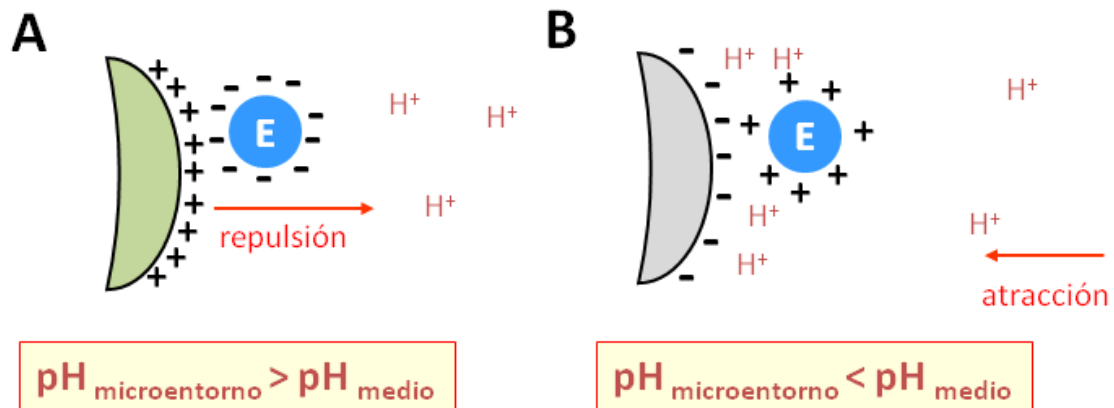


Figura 16: Efectos de la carga del soporte en el microentorno de la enzima inmovilizada. (A) Efectos en soportes cargados positivamente, (B) efectos en soportes cargados negativamente.

8. Inmovilización de enzimas en quitosano

8.1. Quitosano: características, propiedades y aplicaciones

El quitosano es un polímero natural que se obtiene a partir de la quitina, uno de los biopolímeros más abundantes en la Naturaleza. La quitina forma parte de la estructura de soporte de numerosos organismos vivos, tales como artrópodos (crustáceos e insectos), moluscos y hongos. En muchos aspectos, la quitina presenta una función biológica similar a la que presenta el colágeno en los animales superiores, o la celulosa en las plantas. Con una estructura química análoga a la que posee la celulosa (Figura 17), la quitina es un polímero lineal formado por unidades de N-acetil-D-glucosamina (2-acetamido-2-desoxi- β -D-glucosa) unidas por enlace glucosídico β - (1 \rightarrow 4). El quitosano se obtiene mediante desacetilación de la quitina, dejando libre el grupo amino del carbono en posición 2, si bien este proceso nunca llega al 100% (Okuyama y *col.*, 2000). Por esta razón, el quitosano suele ser un copolímero de 2-acetamido-2-desoxi- β -D-glucosa y 2-amino-2-desoxi- β -D-glucosa.

Introducción

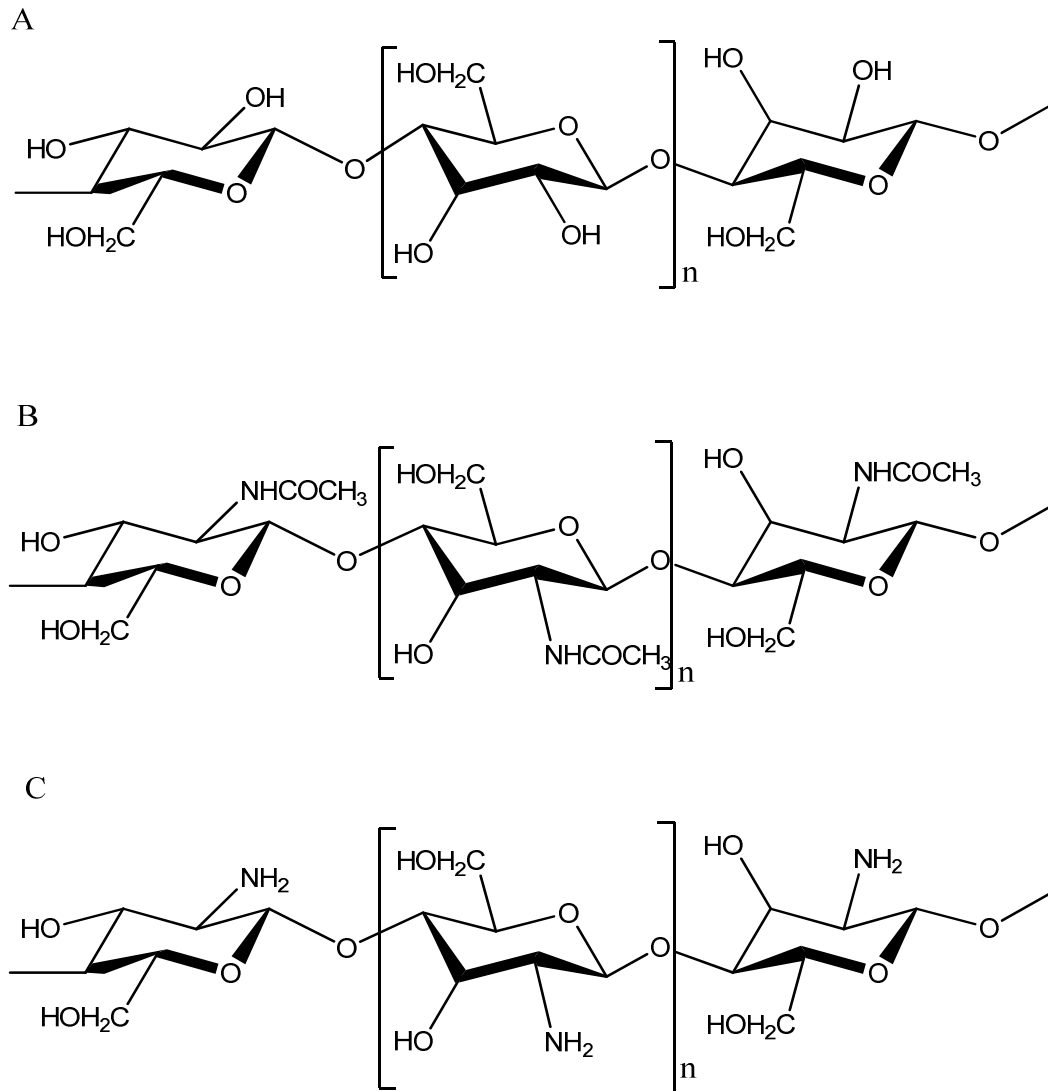


Figura 17: Estructuras de (A) la celulosa, (B) la quitina, y (C) el quitosano.

Comercialmente, la quitina y el quitosano se obtienen a partir de los caparazones de los crustáceos (cangrejos, gambas, langostinos, langostas, camarones, etc.) procedentes de las industrias dedicadas al procesado de marisco. Por ejemplo, las industrias japonesas del sector procesan más de 100.000 millones de toneladas de quitosano por año a partir de cangrejos y camarones (Mendes y *col.*, 2011). El proceso industrial de obtención de la quitina consiste básicamente en la eliminación de las proteínas de los caparazones del marisco con una disolución diluida de hidróxido sódico, y posterior descalcificación con una solución diluida de ácido clorhídrico. La N-

desacetilación de la quitina permite la obtención del quitosano; dicho proceso consiste en un tratamiento termoquímico a 110-115° C con una solución de álcali (normalmente hidróxido sódico) al 40-45%, y posterior purificación del producto obtenido. Los principales factores que afectan al grado de desacetilación (o porcentaje de grupos amino libres en la molécula de quitosano) es la temperatura y el tiempo de reacción, la concentración de la solución de álcali, la relación de quitina/álcali, el tamaño de las partículas de quitina y la presencia de compuestos inhibidores de la despolimerización. Tanto la fuente biológica de quitina como el método de obtención determinan el tamaño (o longitud), y la composición de las cadenas de quitosano. Por este motivo, el grado de desacetilación y el peso molecular promedio son dos parámetros que necesariamente se deben conocer para una completa caracterización de este biopolímero. Además, la cristalinidad, así como el contenido de agua, cenizas y proteínas, son otras características físico-químicas específicas del quitosano que se deben considerar según sea su destino o aplicación concreta. En este sentido, el grado de desacetilación influye en la solubilidad del quitosano, de tal manera que sólo puede llegar a ser soluble cuando dicho parámetro es superior al 80-85% (Acosta y *col.*, 1993). De hecho, los grupos amino libres del quitosano permiten que sea uno de los escasos polielectrolitos catiónicos (cuyo pK_a se aproxima a un valor de 6,5) presentes en la Naturaleza. Debido a esta basicidad, el quitosano se puede disolver fácilmente en soluciones diluidas de ácidos (ácido acético, fórmico, tartárico, cítrico, clorhídrico, etc.) cuyo valor de pH sea inferior a 6,5. En estas condiciones, el quitosano presenta un elevado número de cargas positivas (debido a grupos $-NH_3^+$) que aumentan su capacidad de interaccionar con superficies cargadas negativamente, y de agregar con compuestos polianiónicos. La solubilidad en soluciones ácidas, junto con la mencionada capacidad de agregación con polianiones, confieren al quitosano la propiedad de formar geles.

El quitosano también presenta una serie de propiedades biológicas muy interesantes que han permitido su utilización en diferentes campos como la agricultura, la industria, y la medicina (Dash y *col.*, 2011; Singla y Chawla, 2001). Entre otras, el quitosano es biodegradable, biocompatible, no tóxico, se adhiere a mucosas, forma biopelículas, y promueve la homeostasis. También posee actividades antimicrobiana, antitumoral,

Introducción

anticolesterolémica, y antioxidante (Aranaz y *col.*, 2009). De este modo, el quitosano se ha empleado como agente antiviral en plantas (El Hadrami y *col.*, 2010), y como aditivo en fertilizantes. Asimismo, se ha utilizado en cosmética por su capacidad de formar películas en la piel; y en medicina por su acción estimulante del sistema inmunitario, su capacidad anticoagulante, su acción antibacteriana y antifúngica (Vinsova y Vavrikova, 2011), y por su acción como promotor de la cicatrización de heridas (Minagawa y *col.*, 2007). El quitosano ha encontrado también su aplicación en las industrias alimentaria (Shahidi y *col.*, 1999), papelera y textil, así como en el tratamiento de aguas residuales (Elwakeel, 2010) por su capacidad para eliminar metales pesados, proteínas y colorantes (Gamage y Shahidi, 2007). En la industria farmacéutica, el interés del quitosano radica en su utilización en nuevos sistemas de liberación controlada de fármacos (Panos y *col.*, 2008; Rani y *col.*, 2010). En este sentido, hay que destacar que el hidrocloreto de quitosano fue aprobado por las autoridades sanitarias, e incluido en la cuarta edición de la Farmacopea Europea del año 2002.

8.2. Aplicaciones del quitosano como soporte en inmovilización de enzimas

El quitosano es un soporte natural que se ha empleado con éxito en la inmovilización de muchas enzimas de interés industrial debido principalmente a su bajo coste económico, ya que es fácilmente degradado sin alterar el medio ambiente, a diferencia de otros soportes de tipo sintético. Los métodos para la preparación de soportes de quitosano aptos para la inmovilización enzimática se pueden clasificar en cuatro grupos (Krajewska, 2004):

- 1) Soportes de quitosano obtenidos mediante evaporación del disolvente. Se emplea en la preparación de membranas y películas que vayan a ser destinadas a la fabricación de electrodos enzimáticos. Para ello, una solución ácida de quitosano se seca a una temperatura elevada (aproximadamente 65°C) en el molde correspondiente que dará forma al electrodo. Tras el secado, se neutraliza con una solución diluida de hidróxido sódico, y posteriormente se realiza un

entrecruzamiento o reticulado del polímero (con glicidol, epiclorhidrina, glutaraldehído, genipina, etc.) para evitar que se desintegre en soluciones cuyo pH sea inferior a 6,5 (Figura 18), o que suceda la ruptura del anillo de la 2-amino-2-desoxi- β -D-glucosa por la acción de agentes oxidantes (Vold y Christensen, 2005). Aparte de aumentar la resistencia química del soporte, el entrecruzamiento también reduce la capacidad del quitosano para captar agua. De forma opcional, el agente reticulante se puede añadir a la solución inicial de quitosano antes del secado. Finalmente, la inmovilización de enzimas en estas membranas se puede realizar a través de tres estrategias distintas: (1) adsorción de la enzima a la superficie de la membrana y posterior reticulado para favorecer la unión enzima-soporte; (2) unión covalente de la enzima previa activación química del soporte; y (3) atrapamiento de la enzima en el interior del soporte.

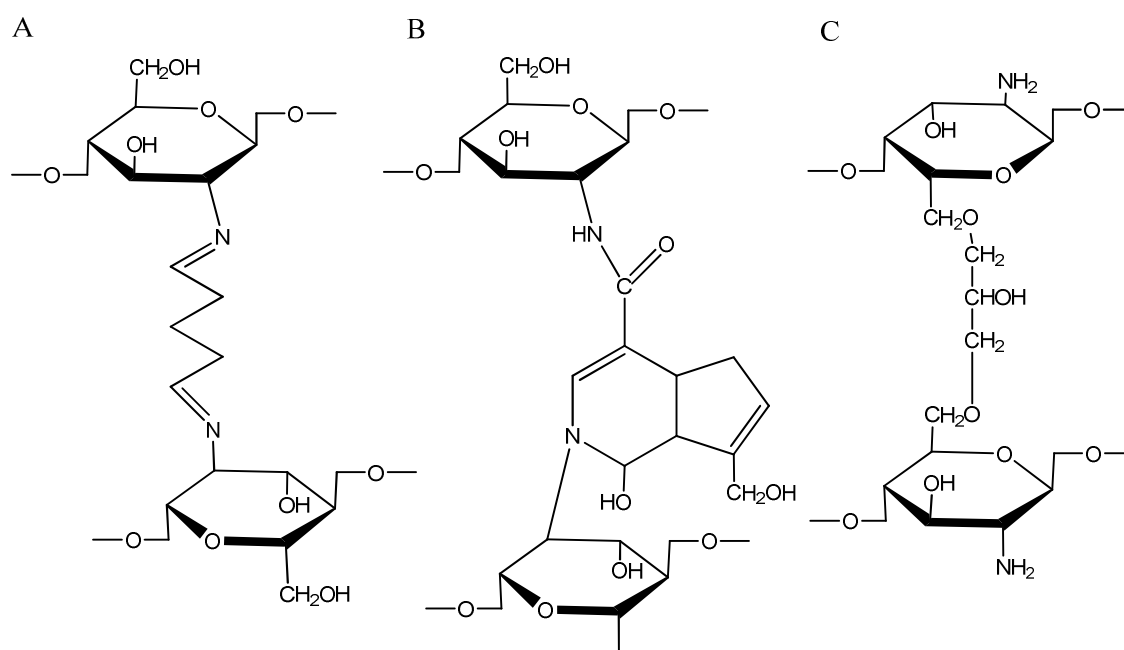


Figura 18: Reticulado de quitosano con: (A) glutaraldehído, (B) genipina, (C) epiclorhidrina.

El secado mediante pulverización o atomización (“spray-drying”) es una variante del método de evaporación que permite conseguir perlas de menor tamaño (Siso y col., 1997).

Introducción

- 2) Soportes de quitosano obtenidos mediante neutralización. Este método se basa en la precipitación del quitosano tras la adición de un álcali y, por tanto, neutralización de la solución ácida donde se encuentra disuelto. De esta manera, se pueden obtener precipitados, membranas, fibras y, sobretodo, perlas esféricas de quitosano que varían en tamaño y porosidad. El proceso consiste en la adición, gota a gota, de la solución de quitosano sobre otra solución de hidróxido sódico, que opcionalmente puede contener etanol, lo que favorece la solidificación de las perlas de quitosano. Una vez filtradas la perlas, se procede a su reticulado para evitar que el biopolímero se desintegre en soluciones ácidas. Las estrategias de inmovilización enzimática son las mismas que las descritas para los soportes obtenidos mediante el método de evaporación.
- 3) Soportes de quitosano obtenidos mediante entrecruzamiento. Se añade directamente un agente reticulante a la solución ácida de quitosano, lo que desencadena el entrecruzamiento, y por tanto, la gelificación del biopolímero. Posteriormente, el gel obtenido se puede triturar o pulverizar a modo de partículas. Si se pretende obtener membranas, la solución de quitosano se dispone en un molde, y posteriormente se sumerge en un baño que contiene el agente reticulante, mientras que si se quieren perlas esféricas se añade por goteo. En el caso de la preparación de electrodos, el entrecruzamiento se realiza tras recubrir la punta con la solución de quitosano. En todos estos casos, no se requiere la activación química del soporte, paso necesario para la inmovilización covalente de enzimas a estos soportes. Este hecho es debido a que el agente reticulante es un compuesto bifuncional (por ejemplo, glutaraldehído, epiclorhidrina, etiléndiamina, N-hidroxisuccinimida, carbodiimidias, entre otros) que produce simultáneamente al entrecruzamiento y a la activación del quitosano.
- 4) Soportes de quitosano obtenidos mediante coacervación. Se trata de un método basado en la gelificación espontánea que sufre el quitosano al entrar en contacto con un polielectrolito de naturaleza aniónica (gelificación ionotrópica), dando lugar a complejos insolubles en agua. Estos polielectrolitos aniónicos pueden ser alginato, carragenato, xantanos, polifosfatos y sulfatos orgánicos, así como las propias enzimas que se quieren inmovilizar. La obtención de perlas sólidas se produce tras la adición, gota a gota, de una solución de polielectrolito sobre la

Introducción

solución ácida de quitosano. La inmovilización enzimática se produce mediante atrapamiento si la enzima se encuentra disuelta en la solución de polielectrolito.

Estos cuatro métodos generales de inmovilización han permitido la obtención de diferentes biocatalizadores enzimáticos con numerosas y múltiples aplicaciones (Tabla 1): preparación industrial de alimentos, descontaminación ambiental de aguas residuales, diseño de biosensores para la detección *in situ* tanto de diferentes compuestos de interés alimentario y clínico como de sustancias contaminantes en efluentes o aguas residuales, control de metabolitos en órganos artificiales, etc.

Tabla 1: Ejemplos de enzimas inmovilizadas en soportes basados en quitosano

Enzima	Aplicación	Referencia
Alanina deshidrogenasa	Determinación de D-alanina	(Kiba y col., 1993)
Alcohol oxidasa	Determinación de etanol	(Tanai y col., 2001)
Aminoacilasa	Producción de L-fenilalanina	(Lee y col., 1992)
β-Amilasa	Producción de jarabes de maltosa	(Noda y col., 2001)
Catalasa	Eliminación de H ₂ O ₂ en alimentos	(Pifferi y col., 1993)
Creatinina desaminasa	Biosensor de creatinina	(Magalhaes y Machado, 2002)
Dextranasa	Hidrólisis de dextrano (en derivados sanguíneos)	(Abdel-Naby y col., 1999a)
Endo-1,4-β-xilanasas	Transformación de la hemicelulosa (industria papelera)	(Abdel-Naby, 1993)
Galactosa oxidasa	Biosensor de galactosa	(Wang y col., 2003)
β-Galactosidasa	Hidrólisis de lactosa (industria láctea)	(Rejikumar y Devi, 2001)

Introducción

Enzima	Aplicación	Referencia
Glucoamilasa	Producción de jarabes de glucosa	(Takahashi y Kayama, 1992)
Glutamato deshidrogenasa	Determinación de glutamato	(Petach y Driscoll, 1994)
Glutamato oxidasa	Biosensor de glutamato	(Wang y col., 2003)
β-Glucosidasa	Hidrólisis de celobiosa	(Briante y col., 2000; Dauria y col., 1996)
Invertasa	Hidrólisis de sacarosa	(Gomez y col., 2000; Hsieh y col., 2000)
Lacasa	Eliminación de fenoles de efluentes	(D'Annibale y col., 1999)
Lactato oxidasa	Biosensor de lactato	(Wei y col., 2003)
Leucina deshidrogenasa	Determinación de L-leucina	(Kiba y col., 1993)
Lipasa	Esterificaciones y transesterificaciones Hidrólisis del aceite de oliva	(Belhaj-Ben Romdhane y col., 2011; Foresti y Ferreira, 2007; Nasratun y col., 2009)
Lisozima	Fabricación de quesos	(Crapisi y col., 1993)
Nucleósido fosforilasa	Determinación fresca de pescados y mariscos	(Okuma y Watanabe, 2002)
Oxalato oxidasa	Tratamiento de la hiperoxaluria Biosensor de oxalato	(Ramakrishnan y col., 1997) (Benavidez y col., 2009)
Papaína	Hidrólisis de colágeno y queratina (cosmética)	(Hayashi y Ikada, 1991; Itoyama y col., 1994)
Pectinasa	Producción de oligosacáridos	(Iwasaki y col., 1998)
Penicilina acilasa	Obtención de ácido 6-amino penicilánico	(Patel y Gaikar, 2004)

Introducción

Enzima	Aplicación	Referencia
Peroxidasa	Biosensor de H ₂ O ₂ Determinación de H ₂ O ₂ Polimerización de la anilina Determinación de Hg(II)	(Miao y Tan, 2000) (Sakuragawa y col., 1998; Taniai y col., 1999) (Jin y col., 2001) (Shekhovtsova y col., 1997)
Proteasa alcalina	Producción de detergentes Síntesis de ésteres y péptidos	(Abdel-Naby y col., 1998) (Kise y Hayakawa, 1991)
Proteinasa neutra	Hidrólisis de proteínas de soja	(Guo y col., 1996)
Pululanasa	Hidrólisis de almidón	(Manolov y col., 1993)
Putrescina oxidasa	Determinación fresca en carnes	(Okuma y col., 2000)
α-L-Ramnopiranosidasa	Aromatización de bebidas y zumos	(Spagna y col., 2001)
Sulfito oxidasa	Biosensor de sulfitos	(Ng y col., 1998; Rawal y col., 2011; Zhou y col., 2008)
Tanasa	Hidrólisis de taninos del té	(Abdel-Naby y col., 1999b; Boadi y Neufeld, 2001)
Tirosinasa	Producción de L-DOPA Detección y eliminación de fenoles	(Carvalho y col., 2000) (Wang y col., 2002; Wu y col., 2001; Yang y col., 2012)
Ureasa	Riñón artificial Biosensor de urea Tratamiento de aguas residuales Eliminación de urea en bebidas y alimentos	(Kayastha y Srivastava, 2001) (Chen y Chiu, 1999) (Krajewska y col., 1990) (Chellapandian y Krishnan, 1998)
Uricasa	Determinación de ácido úrico (medicina)	(Yao y col., 2003)
Xantina oxidasa	Determinación fresca	(Devi y col., 2012)

Introducción

Enzima	Aplicación	Referencia
Xilosidasa	pescado Transformación de la hemicelulosa (industria papelera)	(Abdel-Naby, 1993)

8.3. Inmovilización de enzimas en partículas magnéticas de quitosano

La inmovilización de enzimas en soportes magnéticos es un área de creciente interés ya que los biocatalizadores obtenidos se pueden separar con mayor facilidad de los medios de reacción mediante la simple aplicación de un campo magnético (Huang y Juang, 2011). También esta técnica permite la agitación del biocatalizador en una columna de lecho fluido que emplee un campo magnético, aplicado axial o transversalmente, para controlar el movimiento de las partículas magnéticas dentro de la columna. Todas estas propiedades permiten una reducción de los costes, la automatización, e incluso la miniaturización del proceso. Estas características ventajosas de los derivados inmovilizados en partículas magnéticas de quitosano han suscitado gran interés en la comunidad científica en los últimos años, y es cada vez mayor el número de enzimas de interés biotecnológico, inmovilizadas en este tipo de soportes (Tabla 2).

Tabla 2: Ejemplos de enzimas inmovilizadas en partículas magnéticas basadas en soportes de quitosano

<i>Enzima</i>	<i>Posible aplicación</i>	<i>Referencia</i>
Acilasa	Tratamiento de aguas residuales	(Yeon y col., 2009)
Alcohol deshidrogenasa	Síntesis de intermediarios	(Gui-yin y col., 2010; Li y col.,

Enzima	Posible aplicación	Referencia
α-Amilasa	Hidrólisis del almidón	2008) (Liu y col.; Yang y col., 2010)
Celulasa	Obtención de quitosano de baja masa molecular	(Feng y col., 2006)
Glicerol quinasa	Determinación de triglicéridos	(Chen y col., 2010)
Glicerol-3-fosfato oxidasa	Determinación de triglicéridos	(Chen y col., 2010)
Glucoamilasa	Producción de jarabes de glucosa	(Ghosh y col., 1995; Yang y col., 2010)
β-Galactosidasa	Obtención de lactulosa Hidrólisis de lactosa	(Hua y col., 2010) (Pan y col., 2009)
β-Glucosidasa	Hidrólisis de celobiosa	(Ghosh y col., 1995)
Lacasa	Eliminación de colorantes	(Bayramoglu y col., 2010; Jiang y col., 2005; Kalkan y col., 2012)
Lipasa	Determinación de triglicéridos Síntesis de ésteres (biodiesel)	(Chen y col., 2010) (Kuo y col., 2012)
Invertasa	Hidrólisis de sacarosa	(Ghosh y col., 1995)

Introducción

<i>Enzima</i>	<i>Posible aplicación</i>	<i>Referencia</i>
Papaína	Hidrólisis de proteínas en industria alimentaria, textil, cosmética, etc.	(Liang y Zhang, 2007)
Peroxidasa	Biosensor de H ₂ O ₂	(Lai y col., 2009)
Pululanasa	Hidrólisis del almidón	(Zhang y col., 2009a)
Tirosinasa	Degradación de compuestos fenólicos	(Peniche y col., 2005)
Tripsina	Purificación de aprotinina	(An y col., 2003)
Ureasa	Biosensor de urea	(Kaushik y col., 2009)

Objetivos

OBJETIVOS

Los nucleósidos y sus análogos y derivados son una clase importante de agentes terapéuticos antitumorales y antivirales. Los procedimientos químicos empleados por la industria farmacéutica para producir nucleósidos terapéuticos ópticamente activos llevan consigo múltiples etapas que incluyen protección y desprotección, que conllevan una disminución del rendimiento y mayor coste económico, además de ser más agresivas para el medio ambiente. Dada la importancia económica y social de este tipo de fármacos, representa un logro importante el conseguir una síntesis estereoselectiva y económicamente rentable. En este sentido, la producción en un proceso de un solo paso (*one pot*) y condiciones sostenibles de nucleósidos naturales y no naturales con aplicación terapéutica, mediante el empleo de biocatalizadores enzimáticos, presenta grandes ventajas frente a la síntesis química convencional, ya que consumen menos agua, reactivos de partida, disolventes y energía, lo que minimiza el impacto medio ambiental, además, los productos se obtienen a un menor coste económico, ya que a las ventajas propias de las enzimas se añade una menor probabilidad de contaminación del reactor, y procesos más económicos de purificación del producto final.

La utilización de las nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasas como biocatalizadores en la síntesis de nucleósidos naturales y no naturales presentan la ventaja de llevar a cabo la reacción de síntesis en un solo paso ó *one pot*, mientras que en el caso de las nucleósido fosforilasas se necesitan los dos tipos de enzimas, purína y pirimidina nucleósido fosforilasas. Esto hace que desde el punto de vista de la inmovilización de un biocatalizador sea más factible inmovilizar las 2'-desoxirribosiltransferasas con vistas a su utilización en biorreactores enzimáticos en la síntesis industrial de nucleósidos.

En la actualidad, resulta de gran interés la obtención de nuevas 2'-desoxirribonucleósido transferasas, ya que hasta la fecha solo hay descritas un número limitado de este tipo de enzimas, de las cuales todas son específicas de desoxirribosa, así como abordar estudios de inmovilización para su empleo como biocatalizadores. Por otro lado, resulta interesante la obtención de enzimas de

Objetivos

microorganismos psicrófilos para su utilización como biocatalizadores industriales, ya que puede suponer una ventaja adicional en cuanto a la temperatura del proceso. Hasta la fecha no se ha descrito ninguna 2'-desoxirribonucleósido transferasa de microorganismos psicrófilos.

Por todo ello, se han planteado los siguientes objetivos en el presente trabajo:

1. Clonación y expresión del gen *ndt* de la bacteria psicrófila *Desulfotalea psychrophila* (*DpNDT*) en un microorganismo heterólogo con el fin de lograr niveles de expresión que permitan la aplicación industrial de la misma.
2. Caracterización funcional y estructural de la enzima *DpNDT* producida por el microorganismo recombinante.
 - Producción, aislamiento y purificación de la enzima
 - Caracterización de la actividad NDT: efecto del pH, temperatura, fuerza iónica, cationes mono y divalentes y otros aditivos
 - Caracterización estructural: tamaño de la proteína, composición en subunidades, estructura secundaria
 - Especificidad de sustrato y determinación de parámetros cinéticos.
3. Inmovilización covalente de la *DpNDT* recombinante sobre partículas magnéticas de quitosano.
4. Estudios de termoestabilidad de la enzima libre e inmovilizada
5. Aplicación del biocatalizador libre e inmovilizado en la síntesis de nucleósidos naturales y no naturales.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Reactivos

Para el presente trabajo se utilizaron los reactivos que se recogen en la Tabla 3.

Tabla 3: Lista de reactivos

Reactivos	Compañía
Ácido acético	Sigma Adrich (EEUU)
Acrilamida	Fluka (Alemania)
Agar	Becton Dickinson (EEUU)
Albumina de suero bovino	Serva (Alemania)
Azul de bromofenol	Sigma Adrich (EEUU)
Azul de coomassie G250	Fluka (Alemania)
Bacto Triptona	Becton Dickinson (EEUU)
Cloruro de bario	Merck (Alemania)
Cloruro de calcio	Panreac (España)
Cloruro de cobalto (II) hexahidratado	Sigma Adrich (Alemania)
Cloruro de litio	Sigma Adrich (Alemania)
Cloruro de magnesio hexahidratado	Merck (Alemania)
Cloruro de manganeso tetrahidratado	Sigma Adrich (Alemania)
Cloruro de potasio	Merck (Alemania)
Cloruro de rubidio	Sigma Adrich (Alemania)
Cloruro férrico	Sigma Adrich (Alemania)
Cloruro sódico	Fluka (Alemania)
DNA del fago λ	BioRad (Alemania)
Dodecil sulfato sódico	Sigma Adrich (EEUU)
EDTA	Merck (Alemania)
Epiclorhidrina	Sigma Adrich (EEUU)
Extracto de levadura	Conda Pronadisa (Indonesia)
GelRed TM	Biotium, Inc. California
Glicerol	Merck (Alemania)

Materiales y Métodos

Reactivos	Compañía
Glucosa	Fluka (Alemania)
Glutaraldehído 2,5%	Sigma-Aldrich (EEUU)
IPTG	Sigma-Aldrich (EEUU)
Kanamicina	Sigma-Aldrich (EEUU)
Lisozima	Fluka (Alemania)
Magnetita (Fe ₃ O ₄)	Sigma Adrich (EEUU)
Marcadores de peso molecular de proteína	BioRad (EEUU)
Mercaptoetanol	Fluka (Alemania)
Metanol	Scharlau (España)
NaOH	Sigma Adrich (EEUU)
Persulfato amónico	BioRad (EEUU)
Polietilenglicol	Sigma-Aldrich (EEUU)
Quitosano	Primex (Islandia)
Sulfato amónio	Sigma Adrich (EEUU)
Sulfato de aluminio	Pro-Bys
Sulfato de cobre	Merck (Alemania)
Sulfato de zinc heptahidratado	Merck (Alemania)
Sulfato magnésico	Probus (España)
Sulfato potásio	Sigma Adrich (EEUU)
Sulfato sódico	Merck (Alemania)
Tetrametil etilendiamina	Sigma Adrich (EEUU)
Trizma base	Sigma Adrich (EEUU)

2. Microorganismos y plásmidos.

Los microorganismos empleados en el presente trabajo se recogen en la Tabla 4, El vector utilizado para la clonación y expresión del gen *ndt* de *Desulfotalea psychrophila* ha sido el plásmido pET-24d(+) (Kan^R T7 promotor, T7 terminator *lacI*) de 5,3Kb de Novagen.

Tabla 4: Microorganismos utilizados

Microorganismo	Características genotípicas o fenotípicas destacables	Referencia/Fuente
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	F ⁻ ϕ 80d <i>lacZ</i> Δ M15 <i>endA1 recA1 hsdR17</i> (r _k ⁻ m _k ⁺) <i>supE44 thi-1 gyrA96 relA1</i> Δ (<i>lacaya-argF</i>)U169 λ ⁻	(Hanahan, 1983)
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3)	INVITROGEN
<i>Desulfotalea psychrophila</i> DSM 12343		DSMZ

3. Oligonucleótidos sintéticos

Los oligonucleótidos utilizados fueron sintetizados por el servicio de síntesis de oligonucleótidos Sigma Genosys. En la Tabla 5 se muestran los utilizados para la amplificación del gen *ndt* que codifica para la nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa de *Desulfotalea psychrophila* DSM 12343 y los que se utilizaron para secuenciar.

Tabla 5: Oligonucleótidos utilizados tanto para la amplificación del gen *ndt* como para la secuenciación de los plásmidos recombinantes

Nombre	Secuencia	Tm (C°)
Q6AQBONcoI	5'-CATG CCATGG GATAATTTATCGTTTCAGACCAAATTGTACC-3'	77,0
Q6AQBOHindIII	5'-AA AAGCTT TTAGCTGAGTTTATTATATTTTTGCTGTAACC-3'	69,3
Q6AQBOTYR	5'-AA AAGCTT TTAG TAG AGTTTATTATATTTTTGCTGTAACC-3'	69
T7 Promoter	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'	50.3
T7 Terminator	5'-TATGCTAGTTATTGCTCAG-3'	50.3

En rojo se indica la diana para la enzima de restricción *NcoI* y en azul la diana para la enzima de restricción *HindIII*. En morado el codón que codifica para la Tyr

4. Medios de cultivo

Para los cultivos de las distintas cepas de *E. coli* se ha utilizado el medio: **Luria-Bertani (LB)** constituido por triptona (10 g/L), extracto de levadura (5 g/L) y NaCl (5 g/L) a pH 7,5, y que en el caso de cultivos en medio sólido se le añadió un 2% de agar (Miller, 1972; Sambrook y col., 1989).

La concentración de kanamicina requerida en los medios de cultivo, cuando fue necesario añadirla, fue de 50 µg/mL.

Los medios se esterilizaron en un autoclave JP. SELECTA (España) a 121 °C y una presión de 1 kg/cm² durante 30 minutos. Los suplementos de sales, aminoácidos y antibióticos se esterilizaron mediante filtración con filtros de 0,2 µm de tamaño de poro (Sartorius, España).

5. Revitalización y mantenimiento de las cepas

Los microorganismos utilizados en esta Tesis han sido diferentes cepas de *E. coli*, concretamente las variantes DH5α y BL21(DE3). Los microorganismos fueron conservados a -80°C en un medio glicerolado al 20%. Para revitalizarlos se sembraron en placas Petri que contenían medio LB sólido en el caso de los microorganismos recombinantes se suplementaron con el antibiótico kanamicina a 50 µg/mL.

El mantenimiento de los microorganismos se llevó a cabo mediante dos procedimientos:

1. Mediante su siembra en placa sobre medio sólido. Tras la incubación de las placas durante 24 h en una estufa a 37 °C, se mantuvieron en nevera a 4 °C. Se llevaron a cabo resiembras cada 8 días aproximadamente.
2. Adicionalmente con el fin de establecer y mantener la colección de microorganismos, las cepas revitalizadas se recogieron y se resuspendieron en glicerol al 20 % en suero salino (NaCl 0,9 %), y se almacenaron a -80 °C.

6. Purificación del ADN de *Desulfotalea psychrophila* DSM 12343.

El aislamiento y purificación del ADN cromosómico procedente de *Desulfotalea psychrophila* DSM 12343 fue llevado a cabo por el Dr. P. A. Kaminski de la Unidad de Química Orgánica del Instituto Pasteur de París con el cual se trabaja en colaboración en el marco del proyecto de investigación “Obtención y caracterización de nuevos biocatalizadores para la síntesis industrial de nucleósidos de interés terapéutico”. Proyecto concedido por el **Ministerio de Ciencia e Innovación. Ref CTQ2009-11543**, dirigido por la Dra. Isabel de la Mata Riesco, en el marco del cual se ha desarrollado el presente trabajo.

7. Transformación genética de las cepas de *E. coli*

7.1. Transformación de las cepas.

La transformación de las diferentes cepas de *E. coli* empleadas se llevó a cabo por el método del choque térmico descrito por (Sambrook y col., 1989). Para ello, las células competentes obtenidas mediante el método de RbCl (Hanahan, 1983) se sometieron junto con el ADN plasmídico o la mezcla de ligación plásmido-inserto, a un choque térmico a 37 °C durante 3 minutos, y posterior incubación durante 5 minutos en hielo. Tras el choque térmico, las células se incubaron 1 hora en 1 mL de LB líquido, y posteriormente, se sembraron en placas Petri conteniendo el medio sólido selectivo con el antibiótico correspondiente y se incubaron en estufa a 37 °C durante una noche.

7.2. Método de selección en *E. coli* de los plásmidos recombinantes.

Las cepas de *E. coli* recombinantes se seleccionaron en primer lugar por su crecimiento en presencia de kanamicina en el medio.

Materiales y Métodos

En este caso se procedió a la selección de colonias aisladas con posterior análisis y determinación del tamaño del plásmido mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,8% y finalmente, secuenciación de los mismos

En todos los casos, se llevó a cabo una selección mediante mini-prep de colonias. Este método permite analizar numerosas colonias en poco tiempo, pudiendo observarse la presencia de los plásmidos deseados. Para ello, se tomó una muestra de cada colonia con la punta de un palillo estéril y se depositó en un tubo Eppendorf al que se le adicionó 10 μ l de un tampón compuesto por lisozima (0,5 mg/mL), RNasa (0,1 mg/mL), EDTA 25 mM, Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, glicerol al 10% y azul de bromofenol (2 mg/mL). Tras incubar 15 minutos en ese tampón se añadieron 2 μ l de fenol y tras su centrifugación a 9.000 xg se analizaron los sobrenadantes mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8%.

Las transformaciones positivas se analizaron por purificación del plásmido (Apartado 8 de *Materiales y Métodos*) y análisis de restricción y secuenciación.

8. Purificación del ADN plasmídico de *E. coli*

Las cepas de *E. coli* se crecieron en 4 mL de medio LB con el antibiótico correspondiente a 37 °C durante toda la noche a 200 r.p.m. en un incubador con agitación orbital Unitron Infors HT (Suiza) Para la purificación de los plásmidos de las distintas cepas de *E. coli* se utilizó un sistema de purificación comercial, High Pure Plasmid Kit (Roche, Alemania), según las especificaciones del comerciante.

9. Técnicas electroforéticas de ADN

Las electroforesis analíticas de ADN se llevaron a cabo en geles de agarosa al 0,8 % en tampón TAE (Tris-HCl 40 mM, EDTA 2 mM y ácido acético 20 mM, pH 8.. Las electroforesis se realizaron en un equipo RunOne Electroforesis Cell de EmbiTec (USA) a una corriente constante de 8 V/cm. El tampón de carga empleado para aplicar las muestras de ADN (tampón 5X) está compuesto por azul de bromofenol (0,25 %), cianol (0,25 %) y glicerol en agua (30 %). La detección de las bandas de ADN en el gel se llevó a cabo mediante la utilización de GelRed (10.000X en agua) y posterior

visualización con luz ultravioleta en un Transiluminador UVIPro V1-0 de UVIttec Limited (Inglaterra).

Como marcador de tamaño se empleó un digerido del ADN del fago λ con la enzima de restricción *BstEII*, (MBI Fermentas, Alemania).

10. Secuenciación del ADN

Todas las secuenciaciones del ADN se han realizado en el servicio de secuenciación automática de DNA de Secugen, SL (Sequencing and molecular diagnostics) encargado del servicio de secuenciación del Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC, España).

11. Clonación y expresión del gen *ndt* de *Desulfotalea psychrophila* DSM 12343

Para la clonación y la expresión del gen *ndt* de *Desulfotalea psychrophila* DSM 12343 que supuestamente codifica para la nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa (NDT) se amplificó mediante PCR el marco de lectura abierto (ORF) utilizando los oligonucleótidos Q6AQBONco y Q6AQBOHind (Tabla 5, del apartado 3 de Materiales y Métodos), diseñados según la secuencia del gen *ndt* de *Desulfotalea psychrophila*.

- Q6AQBONco, que corresponde al extremo 5' del gen *ndt* y que presenta una diana de restricción *NcoI*.
- Q6AQBOHind, que corresponde al extremo 3' del gen *ndt* y que presenta una diana de restricción *BamHI* en el extremo 3' e incluye la secuencia TAA como codón stop.

Las amplificaciones de ADN se llevan a cabo mediante la técnica de la PCR (Mullis y col., 1986; Saiki y col., 1985) utilizando un termociclador MasterCycler Personal (Eppendorf, Alemania). En todas las reacciones de amplificación de ADN por PCR en la mezcla de reacción se incluyó cada uno de los dos oligonucleótidos usados como

Materiales y Métodos

cebadores a una concentración de 0,8 μ M y cada uno de los cuatro dNTPs a una concentración de 0,20 mM. Todas las amplificaciones se realizaron en presencia de DMSO al 10% utilizando pfU ADN polimerasa de promega (USA) con los tampones de reacción recomendados por el fabricante. Como controles en las reacciones de amplificación por PCR se llevaron a cabo reacciones con cada uno de los cebadores por separado para observar si la amplificación del gen era o no específica. El programa de amplificación utilizado en las diferentes reacciones de PCR aparece reflejado en la Tabla 6.

Tabla 6: Programa de amplificación por PCR utilizado.

<i>Dp</i> NDT
1. Desnaturalización 2 min a 95 °C.
2. Desnaturalización 30 seg a 95 °C.
3. Hibridación 30 seg a 60 °C.
4. Extensión 1 min a 72 °C.
5. Los pasos 3, 4 y 5 se repitieron 25 ciclos.
6. Extensión 1 min a 72 °C.

Una vez realizada la amplificación del gen *ndt* de *Desulfotalea psychrophila* DSM 12343, se purificó mediante kit de purificación High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Suiza) siguiendo lo indicaciones del fabricante. Una vez purificado, se comprobó mediante electroforesis de ADN en agarosa al 0,8 % y posterior secuenciación como se describe en el apartado 10 de Materiales y Métodos.

A continuación el producto de PCR se digirió con las enzimas *Nco*I y *Hind*III (New England BioLabs, EEUU) en el tampón comercial NEBiolabs 2 (compuesto por 50mM de NaCl, 10m M de Tri/HCl, 10m M de $MgCl_2$ y 1 m M DTT pH 7.9 a 25°C), recomendado por el fabricante, durante 3 horas a 37 °C tras las cuales la reacción se detuvo calentando la mezcla durante 15 minutos a 85 °C. Una vez digerido se realizó una electroforesis en geles de agarosa al 0,8 % y se obtuvo el gen mediante una extracción de banda del gel con el kit de extracción, GENE CLEAN® Kit (Bio101, EEUU). Una vez hecho esto se procedió a insertar el gen *ndt* en el vector pET24d(+),

previamente digerido con las enzimas de restricción *Nco*I y *Hind*III en las mismas condiciones que el fragmento amplificado. A continuación se procedió a la clonación del gen *ndt* el plásmido digerido, para ello 0,5 µg del gen *ndt* digerido y purificado se mezclaron con 0,25 µg del plásmido pET24d(+) digerido (Relación plásmido:inserto 2:1) y se llevó a cabo la reacción de ligación utilizando la enzima T4 ADN ligasa (USB, EEUU) a 4 °C durante toda la noche. La reacción de ligación se llevó a cabo en presencia de ATP, usando un tampón recomendado por el fabricante. La mezcla de ligación pET24*ndt* se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* DH5α, como se describe en el apartado 7 de Materiales y Métodos. Los clones positivos se seleccionaron por su crecimiento en LB suplementado con kanamicina (50 µg/mL), y mediante mini-prep de colonias. Se obtuvo así el clon recombinante *E. coli* DH5α (pET24*ndt*), que posee el plásmido recombinante pET24*ndt*.

Para llevar a cabo la expresión del gen *ndt*, el plásmido recombinante pET24*ndt* fue purificado y secuenciado según se ha descrito anteriormente en los apartados 8 y 10 de Materiales y Métodos, y se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* BL21(DE3), tal y como se ha descrito en el apartado 7 de Materiales y Métodos. Los clones positivos se seleccionaron por crecimiento en medio LB suplementado con kanamicina (50 µg/mL) y mediante mini-prep de colonias. Se obtuvo así el clon recombinante *E. coli* BL21(pET24*ndt*), que posee el plásmido pET24*ndt*. Este plásmido se purificó y secuenció para comprobar que en el proceso de transformación no hubieran ocurrido mutaciones que pudieran cambiar la secuencia del gen.

12. Producción, aislamiento y purificación de la nucleosido 2'-desoxirribosiltransferasa (*Dp*NDT) de *Desulfotalea psychrophila*, producida por *E. coli* BL21(pET24*ndt*)

Para llevar a cabo la producción, aislamiento y purificación de la supuesta NDT de *Desulfotalea psychrophila* se creció el microorganismo recombinante *E. coli* BL21(pET24*ndt*) en un preinóculo de 50 mL de medio LB en un matraz de 250mL suplementado con kanamicina (50 µg/mL) a 37° C, con una agitación de 200 r.p.m. en un incubador termostatzado con agitación orbital Unitron Infors HT (Suiza) durante 18 horas. Seguidamente se procedió a trasvasar el preinóculo a un matraz Erlenmeyer de un litro que contenía 450 mL de LB suplementado con kanamicina (50 µg/mL) y se

Materiales y Métodos

creció en las mismas condiciones hasta observar un densidad óptica entre 0,6 y 0,8, momento en el cual se adicionó IPTG a una concentración final de 0,4 mM y se mantuvo creciendo durante 2 horas y media. A continuación el caldo de cultivo se centrifugó a $3500\times g$ durante 15 minutos a 4 °C y, tras separar el sobrenadante de las células, se procedió a la ruptura de las mismas.

Para ello, las células se lisaron según las siguientes condiciones: 15 ciclos de 10 segundos con una amplitud del 20 % a intervalos de 0,6 segundos. Tras lisar totalmente las células, se centrifugaron a $9000\times g$ durante 30 minutos a 4 °C y se procedió a analizar mediante electroforesis en geles de poliacrilamida tanto los extractos como los precipitados obtenidos, con el fin de determinar si la enzima se expresaba de forma soluble o en forma de cuerpos de inclusión. La cantidad de proteína en el extracto se cuantificó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). La eficacia de la lisis celular se analizó mediante PAGE-SDS como se describe en el apartado 11 de Materiales y Métodos.

Una vez lisadas las células se centrifugaron a $9000\times g$ durante 20 minutos y 4 °C, obteniéndose el extracto celular con el que se procedió a la purificación de la enzima *Dp*NDT recombinante, que se llevó a cabo mediante dos pasos cromatográficos:

a) Cromatografía de intercambio iónico

A la vista de los datos proporcionados por el servidor ExPASy (Expert Protein Analysis System) (Gasteiger y *col.*, 2003) acerca de la estructura y que indica que el punto isoeléctrico (pI) de la proteína es 4.86, se realizó una primera purificación mediante una cromatografía de intercambio iónico, para lo cual se utilizó un intercambiador aniónico **UNOsphere Q Cartridge** (BioRad, EEUU). Este intercambiador aniónico se caracteriza por estar formado por propileno, tener un volumen de lecho de 5 mL, tamaño de poro 1000 Å, y el grupo funcional $-N^+(CH_3)_3$.

Para ello, 8 mL del extracto celular obtenido tal y como se ha detallado anteriormente en el apartado anterior se aplicaron en un cartucho Mini UNOsphere Q Cartridge, (BioRad, EEUU). La cromatografía se llevó a cabo en frío mediante un sistema BioLogic Lp de BIO-RAD. Con un flujo constante de 0,5 mL/min. Seguidamente se llevó a cabo un lavado de la columna con 60 mL de tampón fosfato potásico 10 mM, pH 7, hasta obtener absorbancia cero a una longitud de onda de 280 nm (λ_{280}) en las

fracciones recogidas con el fin de eliminar las proteínas que no se quedaron unidas a la columna.

A continuación, se llevó a cabo la elución de la enzima, *Dp*NDT, mediante un gradiente continuo de 40 mL de 0 a 0,4 M de NaCl en tampón fosfato potásico 10 mM, pH 7 a un flujo de 0,5 mL/min, hasta observar absorbancia cero a 280 nm.

Las absorbancias a 280 nm de las fracciones del perfil cromatográfico fueron medidas en un espectrofotómetro Ultrospec 1100 Pro, Amersham (Suecia). Se realizaron electroforesis SDS-PAGE con el fin de identificar las fracciones que contenían la *Dp*NDT atendiendo a su masa molecular. Se seleccionaron las fracciones más puras que contenían la *Dp*NDT, y se procedió a realizar un segundo paso cromatográfico para conseguir una mayor purificación de la enzima.

b) Cromatografía de penetrabilidad en Superosa 12

Con las fracciones más puras procedentes de la cromatografía de intercambio iónico se llevó a cabo una segunda purificación mediante una cromatografía de penetrabilidad. Para llevar a cabo este tipo de cromatografía se empleó la columna **Superosa 12** 10/300 GL High Performance Columns (General electric GE, Healthcare Europe GmbH, Alemania), la cual está constituida por una matriz reticulada de agarosa, con dimensiones de 10×300-310 mm de base, un volumen de 24mL, un fraccionamiento de proteínas globulares de aproximadamente 2×10^6 , y tamaño de partícula promedio de 11 μ m.

Las fracciones eluidas de la cromatografía de intercambio iónico en las que se detectó la presencia de la nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa mediante electroforesis SDS-PAGE, fueron mezcladas y posteriormente concentradas en un lecho de polietilenglicol (PEG-3500) hasta reducir su volumen a 500 μ L. A continuación, se aplicó este volumen en una columna Superosa 12 previamente equilibrada en tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7.

La cromatografía se llevó a cabo a temperatura ambiente mediante un sistema de cromatografía rápida para proteínas *Fast Performance Liquid Chromatography* (FPLC), Amersham-Pharmacia (Suecia) a un flujo de elución de 0,5 mL/min de tampón fosfato

Materiales y Métodos

potásico 50 mM, pH 7. Igualmente se recogieron fracciones de 500 μ L hasta observar absorbancia cero a 280 nm. Al igual que en el caso anterior, se midió el perfil cromatográfico de proteína 280 nm, y se realizó una electroforesis SDS-PAGE. Se seleccionaron las fracciones más puras que contenían la enzima *Dp*NDT.

13. Cuantificación de la proteína

La determinación de la concentración de proteínas presente en cada muestra se ha llevado a cabo mediante el método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976), utilizando un reactivo comercial (Protein Reagent de la casa Bio-Rad). A 40 μ L de muestra, a la dilución adecuada en tampón fosfato 50 mM, pH 7.0, se añadieron 280 μ L de agua destilada y 80 μ L de reactivo comercial hasta completar un volumen final de 400 μ L. Tras agitación vigorosa, la reacción se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación se midió la absorbancia de las muestras a 595 nm en un lector de placas ELISA (Digiscan Microplate Reader V3.0. ASYS Hitech). La recta patrón se construyó utilizando disoluciones de concentraciones crecientes de albúmina de suero bovino, partiendo de una solución madre de 1 mg/mL. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

14. Técnicas electroforéticas de proteínas

Para los diferentes ensayos realizados con el fin de identificar las proteínas según su masa molecular, se utilizaron las técnicas electroforéticas de proteínas que describimos a continuación.

14.1. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE)

Las electroforesis analíticas de proteínas se realizaron en condiciones desnaturalizantes en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS) al 0,1% (SDS-PAGE),

en geles de poliacrilamida (PAGE), a una concentración del 12,5 % en la zona separadora y del 4% en la concentrante (Laemmli, 1970). Las muestras se calentaron a 95 °C durante 10 minutos en presencia de tampón de ruptura (Tris 250 mM pH 6,8; SDS 2%; β -mercaptoetanol 5 %; glicerol 10 % y azul de bromofenol 0,05 %), y se aplicaron en los pocillos de gel. Las electroforesis fueron realizadas en una cubeta Miniprotean de Bio-Rad (USA), a temperatura ambiente, empleando un tampón de electroforesis Tris 25 mM pH 8, glicina 192 mM y SDS 0,1 %. La tinción de proteínas en el gel se realizó utilizando una mezcla de metanol:acético:agua destilada en proporciones 46:8:46 con un 0,1% (p/v) de azul de Coomassie Brilliant Blue G-250, según lo descrito (Swank y Munkres, 1971). Para destañir el exceso de colorante se hicieron sucesivos lavados en una mezcla de metanol:ácido acético:agua (20:8:73). Como marcadores de masa molecular se utilizaron los patrones preteñidos SDS-PAGE con un intervalo amplio de masas moleculares y patrones no preteñidos SDS-PAGE, ambos de Bio-Rad (USA).

14.2. Electrotransferencia de proteínas a membranas de PVDF y análisis de la secuencia aminoterminal

Para la secuenciación del extremo aminoterminal, se realizó una electroforesis de la enzima pura *Dp*NDT en las condiciones descritas anteriormente y se transfirió a una membrana de PVDF (Immobilon-PSQ de Millipore) en cubetas de transferencia Mini Trans-Blot® (Bio-Rad, EEUU) a 20 mA durante toda una noche en tampón Tris-HCl 10 mM, glicina 10mM, 0,2% de SDS. Al tampón del electrodo superior se le añadió tioglicolato hasta una concentración de 0,1 mM. La detección de proteínas en la membrana se realizó mediante tinción con Negro amido 0,1% (p/v) en ácido acético al 10 % (v/v).

Las bandas de proteína se recortaron para su secuenciación en un secuenciador de proteínas Applied Biosystems del servicio de secuenciación del Centro de Investigaciones Biológicas del C.S.I.C.

15. Caracterización funcional de la enzima *Dp*NDT recombinante

Para llevar a cabo la caracterización funcional de la nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa de *Desulfotalea psychrophila* producida por el microorganismo recombinante *E. coli* BL21(pET24*ndt*) se llevaron a cabo una serie de estudios que se describen a continuación.

15.1. Determinación de la actividad desorribosiltransferasa.

El método elegido para la caracterización funcional de la NDT de *Desulfotalea psychrophila* empleado en este trabajo, fue la valoración de la actividad nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa mediante la cuantificación por HPLC de los productos de la reacción de síntesis de los 2'-desoxirribosilnucleósidos resultantes del intercambio de bases producido en el nucleósido de partida. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

La actividad enzimática se cuantificó mediante el empleo de la unidad internacional (UI) definida como la cantidad de enzima que produce 1 μmol de 2'-desoxirribonucleósido por minuto en las condiciones de ensayo.

El ensayo para determinar la actividad nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa se realizó añadiendo 10 μL de la solución enzimática a una concentración de 1,43 mg/mL (14,3 μg), a 25 μL de una solución de sustratos a concentración 16 mM en tampón MES 50mM, pH 6,5, hasta un volumen total de reacción de 40 μL . La reacción se incubó 20 minutos a 50 °C y a una agitación de 30 r.p.m. en un baño de agua con agitación en vaivén Unitron 250 OR (Selecta, España) y se detuvo mediante la adición de 40 μL de metanol a 4°C y posterior calentamiento a 95 °C durante 5 minutos. Seguidamente la mezcla se centrifugó 5 minutos a 9000 $\times g$ y se recogieron 50 μL de muestra del sobrenadante que se adicionaron a 50 μL de agua milli Q. De esta manera, la muestra quedaba preparada para su análisis en el HPLC. Si la muestra no se analizaba en el momento, se conservaba a -80°C hasta su posterior análisis por HPLC.

La actividad se evaluó cualitativa y cuantitativamente, detectando la presencia del 2'-desoxirribonucleósido sintetizado.

La reacción estándar utilizada en los ensayos de caracterización funcional fue la síntesis 2'-desoxiadenosina a partir de 2'-desoxiuridina (dUri) y adenina (A), salvo en el caso de evaluación de la actividad y estabilidad con el pH, que se utilizó la síntesis timidina a partir de 2'-desoxiuridina (dU) y timina (T).

El sistema de HPLC utilizado fue el modelo Series 1100 (Agilent, EEUU) con una columna Luna 5 μ , C18(2) 250 \times 4,60 mm (Phenomenex, EEUU) bajo las condiciones descritas en el apartado 20 de materiales y métodos.

15.2. Estudio de la influencia del pH sobre la actividad y la estabilidad de la enzima

El tampón utilizado para llevar a cabo los estudios de estabilidad y actividad enzimática en función del pH, fue un sistema de tampones citrato/fosfato potásico 10 mM a fuerza iónica (*I*) constante de 150 mM.

A) Estudio de la influencia del pH sobre la estabilidad de la *Dp*NDT

Se incubaron 14,3 μ g de enzima durante 15 minutos a 4 °C en un intervalo de pH entre 4 y 12. Tras la incubación las soluciones se ajustaron a pH 6,5 mediante la adición de 280 μ L de una mezcla equimolar de nucleósido 2'-desoxiuridina y timina a una concentración de 16 mM respectivamente, en tampón MES 50 mM a pH adecuado en cada caso para conseguir que la mezcla final tuviese un pH resultante de 6,5 y una concentración final de sustratos de 10 mM, seguidamente se incubó la mezcla de reacción bajo las condiciones descritas en el apartado 15 de materiales y métodos.

B) Estudio de la influencia del pH sobre la actividad de la *Dp*NDT

14,3 μ g de enzima se incubaron en las condiciones de ensayo descritas anteriormente (apartado 15 de Materiales y Métodos), utilizando sustratos como 2'-desoxiuridina

Materiales y Métodos

(dUri) y timina (T), en un intervalo de pH comprendido entre 4 y 12. Se eligió timina, debido a que presenta un pKa de 9,7 y además el uracilo presenta un pK de 9,2, de tal forma que tanto sustratos como productos de reacción estaban en forma neutra.

15.3. Estudio de la influencia de la temperatura sobre la actividad y la estabilidad de la enzima

Las temperaturas utilizadas para realizar los estudios de estabilidad y actividad estuvieron comprendidas en un intervalo entre 20 °C y 80 °C. Todos los ensayos se realizaron en tampón MES 50 mM, pH 6,5 utilizando desoxiuridina y Timina como sustratos.

A) Estudio de de la influencia de la temperatura sobre la estabilidad de la *Dp*NDT.

14,3 µg de enzima se incubaron durante 15 min a las diferentes temperaturas en el intervalo comprendido entre 20° y 80° C. A continuación, se incubó la enzima a 4 °C durante 5 min, y se realizó el ensayo de actividad descrito en el apartado 15 de materiales y métodos para determinar la actividad.

B) Estudio de la influencia de la temperatura sobre la actividad de la *Dp*NDT.

14,3 µg de enzima e incubaron con 25 µL de una solución de desoxiuridina y timina a 10 mM concentración final, en tampón MES 50mM, pH 6,5 a diferentes temperaturas comprendidas en el intervalo de 20-80°C. La actividad se determinó mediante el ensayo de actividad estándar descrito en el apartado 15 de Materiales y Métodos.

15.4. Estudio de la influencia de la fuerza iónica sobre la actividad enzimática

La fuerza iónica en una solución es una función de la concentración de todos los iones presentes en ella y definida por la ecuación 1, donde C_i es la concentración molar de iones, Z_i es la carga de cada ion, y el sumatorio se refiere a cada una de las especies iónicas presentes en el medio.

$$I = 1/2 \sum_{i=1}^n C_i \cdot Z_i^2 \quad (\text{ec.1})$$

El estudio del efecto de la fuerza iónica (I) sobre la actividad de la *Dp*NDT se llevó a cabo mediante la determinación de la actividad enzimática a diferentes valores de fuerza iónica en las condiciones estándar recogidas en el apartado 15 de Materiales y Métodos. La variación de la fuerza iónica en cada ensayo se realizó mediante la adición de NaCl hasta la concentración necesaria, en tampón de reacción MES 50 mM, pH 6,5. Para llevar a cabo el ensayo se utilizaron 14,3 μg de enzima en cada reacción y desoxiuridina y timina como sustratos.

15.5. Determinación de los parámetros cinéticos de la *Dp*NDT recombinante.

Los parámetros cinéticos aparentes, K_M , k_{cat} y k_{cat}/K_M , de la enzima NDT de *D. psychrophila* producida por *E. coli* BL21(pET24*ndt*) han sido determinados para desoxiuridina (dUri) y Timina (T) como sustratos mediante el ensayo estándar descrito anteriormente (apartado 15 de Materiales y Métodos). Para ello, 14,3 μg de enzima se incubaron con concentraciones crecientes de dUri (de 0,25 a 30 mM) a concentración fija de T (30 mM), o con concentraciones crecientes de T (de 0,25 a 30 mM) a concentración constante de dUri (30 mM). Los experimentos se han llevado a cabo por triplicado. Los parámetros cinéticos se han determinado ajustando los datos a la ecuación de Hanes-Woolf, (ecuación 2) (Segel, 1975) para lo que se utilizó el programa informático Hiperbolic Regression (<http://homepage.ntleorid.com/jon.easterby/software.html>).

$$\frac{[S]}{V} = \frac{1}{V_{\max}} [S] + \frac{K_M}{V_{\max}} \quad (\text{ec. 2})$$

16. Caracterización estructural de la enzima *Dp*NDT recombinante.

Para llevar a cabo la caracterización estructural de la nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa de *D. psychrophila* (*Dp*NDT) producida por el microorganismo recombinante *E. coli* BL21(pET24*ndt*) se llevaron a cabo una serie de estudios que se detallan a continuación.

16.1. Espectroscopía de absorción UV-visible

El espectro de absorción UV-visible de la enzima *Dp*NDT recombinante fue registrado utilizando un espectrofotómetro Beckman DU 800 con una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico, utilizando una concentración de proteína de 0,2 mg/mL en fosfato potásico 50 mM, pH 7.

16.2. Cálculo del coeficiente de extinción molar

Para obtener el cálculo del coeficiente de extinción molar de la enzima *Dp*NDT recombinante se llevó a cabo mediante la utilización de una solución de enzima pura de 0,7 mg/mL, utilizando el método de Edelhoch (Edelhoch, 1967).

Se midieron las absorbancias a una longitud de onda de 280 nm de la enzima *Dp*NDT nativa, en tampón fosfato potásico 10 mM, NaCl 0,5 M, pH 7,0 y de la enzima desplegada en presencia de cloruro de guanidinio. Para ello, la enzima se incubó durante 3 horas a 37 °C en tampón fosfato potásico 10 mM, NaCl 0,5 M, pH 7,0 que contenía 6M de cloruro de guanidinio. Como blancos se utilizaron los tampones respectivos. Las medidas han sido realizadas en un espectrofotómetro DU-70

(Beckman, USA). Para el cálculo del coeficiente de extinción molar se utilizó la Ecuación 3.

$$\frac{A_{nat}}{A_{des}} = \frac{\epsilon_{nat}}{\epsilon_{des}} \quad (\text{ec. 3})$$

donde A_{nat} y A_{des} son los valores de absorbancia a 280 nm de la proteína nativa y desplegada, respectivamente, y ϵ_{des} es el coeficiente de extinción molar de la proteína desplegada, calculado según la secuencia de aminoácidos de las proteínas con ayuda del programa ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) (Gill y von Hippel, 1989). Tras sustituir estos valores, se pudo calcular ϵ_{nat} correspondiente al coeficiente de extinción molar de la proteína nativa.

16.3. Espectroscopía de fluorescencia

El espectro de fluorescencia de la *Dp*NDT recombinante determinado a 25 °C utilizando un espectrofotómetro (AMINCO.Bowman Series 2 Luminescence spectrometer EEUU). Las cubetas utilizadas fueron de 0,4 cm y 1 cm de paso óptico de excitación y emisión respectivamente. La anchura de rendija empleada fue 5 nm para ambos haces (excitación y emisión), y la velocidad de barrido fue 60 nm/min. Se registraron los espectros de fluorescencia tras excitar a 275 nm, 280 y 295 nm. La concentración de proteína utilizada fue 0,050 mg/mL en tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7.

16.4. Dicroísmo circular

El espectro de dicroísmo circular en el ultravioleta lejano de la *Dp*NDT recombinante se ha obtenido utilizando un dicrógrafo Jasco T-715 (Japón) equipado con un baño termostatzado Neslab RTE-111.

Para ello, se utilizó una cubeta de 0,1 cm de paso óptico. La concentración de enzima utilizada en ambos casos ha sido de 0,35 mg/mL en tampón fosfato potásico 10 mM,

Materiales y Métodos

pH 7. El espectro se realizó a 15 °C, midiéndose la elipticidad molar entre 185 y 260 nm.

También se ha analizado la desnaturalización térmica y el cálculo de la T_m de la enzima *Dp*NDT mediante la medida de la variación de su elipticidad molar a 220 nm en el intervalo de temperaturas comprendiendo entre 15 y 90 °C, a una velocidad de cambio de temperaturas de 20 °C/hora.

A partir de los datos del dicroísmo circular en la región del UV lejano se determinó el contenido en estructura secundaria de la *Dp*NDT recombinante empleando para ello el programa informático CDSpectra Deconvolution Version 2.1. Este programa detecta patrones y correlaciones entre los espectros de dicroísmo circular de una serie de proteínas cuya estructura tridimensional es conocida por cristalografía de rayos X.

Además con el fin de llevar a cabo la predicción de la estructura secundaria en función de la secuencia de aminoácidos de la enzima *Dp*NDT, se han utilizado once programas informáticos diferentes basados en el alineamiento múltiple de las secuencias de las proteínas con otras de estructura conocida. Los métodos empleados son:

- DPM (Deléage y Roux, 1987)
- DSC (King y Sternberg, 1996)
- GOR1 (Garnier y col., 1996)
- GOR3 (Gibrat y col., 1987)
- HNNC (Guermeur y Gallinari, 1997)
- MLRC (Guermeur y col., 1999)
- PHD (Rost y Sander, 1993), <http://cubil.bioc.columbia.edu/predictprotein>
- Predator (Frishman y Argos, 1996)
- SOPM (Geourjon y Deléage, 1995)
- PSI PRED (McGuffin y col., 2000), <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred>
- JPRED (Cole y col., 2008)

16.5. Microcalorimetría diferencial de barrido.

Se determinó la temperatura de desnaturalización (T_m) de la proteína mediante estudios de microcalorimetría diferencial de barrido (DSC). Para ello, se utilizó 600 μ L de proteína a una concentración de 0,2 mg/mL en tampón fosfato potásico 50 mM, pH

7.0, se introdujeron en la celda o célula de referencia y se sometieron a un intervalo de temperatura desde los 20-90 °C. El equipo utilizado fue un Microcalorímetro VP-DSC (*Microcal*, EEUU). El software utilizado para el procesamiento de los datos fue *Microcal Origin*.

16.6. Ultracentrifugación analítica.

Las muestras para la ultracentrifugación analítica fueron preparadas en tampón fosfato potásico 10 mM, pH 7. Para determinar el tamaño de la *Dp*NDT así como su estado de agregación se sometió a experimentos de velocidad y equilibrio de sedimentación utilizando la proteína a las siguientes concentraciones: 1 mg/mL, 0,54 mg/mL y 0,2 mg/mL. Estos estudios fueron realizados en el Consejo de Investigaciones Biológicas (CIB) por el Dr. Carlos Alfonso.

En el experimento de velocidad de sedimentación los datos experimentales de concentración frente al radio obtenidos a lo largo del tiempo fueron analizados mediante el programa SEDFIT para obtener los valores de coeficiente de sedimentación (*S*) frente a la distribución aparente del coeficiente de sedimentación *c(s)*. Esta representación permitió obtener información acerca de la cantidad de especies presentes en una muestra, así como una aproximación a la masa molecular.

En el experimento de equilibrio de sedimentación para la obtención de valores precisos de masa molar se llevaron a cabo estudios donde las muestras se sometieron a campos de fuerza crecientes desde 3.000 a 14.000xg. En estas condiciones, el desplazamiento de las proteínas a lo largo del eje de rotación y la difusión quedan compensados, llegando a un punto de equilibrio. Alcanzado este estado, los datos experimentales se analizaron y se convirtieron a valores de masa molecular boyante (M_b), y se corrigieron posteriormente a masa molecular (M) a través de la fórmula $M_b = M(1 - v_r \rho)$, donde v_r es el volumen específico parcial de la proteína, calculado teóricamente a partir de su composición en aminoácidos, y ρ es la densidad del tampón. Para todos los cálculos se utilizó la herramienta informática HETEROANALYSIS.

16.7. Modelización de la estructura terciaria.

Se ha realizado un modelo de la posible estructura terciaria de la enzima NDT de *Desulfotalea psychrophila* producida por *E. coli* BL21(pET24*ndt*) según su secuencia de aminoácidos. El modelo se ha realizado utilizando el programa HHpred (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred/waiting/6752545>), (Arnold y col., 2006) que compara la secuencia de aminoácidos de una proteína problema con una base de datos que incluye la secuencia de aminoácidos de proteínas con la estructura tridimensional resuelta por rayos X. De esta manera, construye un modelo estructural a partir de la proteína o proteínas que presenten una mayor identidad con la proteína problema. El programa ha utilizado como modelo la NDT de *Lactobacillus leichmannii* formando complejo con 5-metil-2'-desoxipseudouridina (código PDB 1F8Y).

17. Inmovilización de la *Dp*NDT recombinante

La inmovilización de la *Dp*NDT recombinante se llevó a cabo utilizando un soporte biodegradable constituido por partículas magnéticas obtenidas a partir de quitosano y Fe₃O₄ (magnetita). Donde la proteína se une a partículas magnéticas que contienen magnetita en su interior atrapada en quitosano.

17.1. Producción de las partículas magnéticas

Las partículas magnéticas se obtuvieron a partir de un quitosano suministrado por la casa comercial Primex (Islandia) con un peso molecular de 644 kDa y un grado de desacetilación del 90%, y magnetita (Fe₃O₄) suministrada por la casa Sigma Adrich (EEUU). La preparación de las partículas magnéticas de quitosano, y su posterior activación con el fin de favorecer la unión covalente de la enzima, se detallan a continuación:

A 10 mL de solución de quitosano al 3 % (p/v) en ácido acético al 2 % (v/v), se le añadieron 150 mg de magnetita (50 % p/p respecto al polímero), y posteriormente se

dejó agitar a temperatura ambiente hasta que se consiguió la dispersión total de la magnetita en la solución de quitosano. A continuación, 3 mL de la suspensión resultante se añadió mediante goteo a una solución de NaOH 2M (50 mL). Las partículas formadas (de aproximadamente 1,5 mm de diámetro) se mantuvieron en agitación a temperatura ambiente durante 2 horas. Transcurrido este tiempo, las partículas se recogieron mediante filtrado en placa de vidrio poroso y se lavaron dos veces con 50 mL de agua destilada sobre la misma placa. A continuación, se procedió al reticulado del quitosano con el fin de aumentar su estabilidad física y química. Para ello, se dispusieron 2,5 g de partículas en 25 mL de una solución de epiclorhidrina (Sigma) al 2 % (v/v) disuelta en NaOH 1M. Transcurridas 2 horas de incubación a 55 °C y 200 r.p.m. de agitación en la solución de epiclorhidrina, las partículas reticuladas se filtraron en placa de vidrio poroso. Posteriormente se incubaron en 50 mL de etanol frío (80 % v/v) durante 30 minutos a 4 °C con el fin de eliminar restos de epiclorhidrina. Tras retirar el etanol, se procedió a lavar las partículas magnéticas con 50 mL de agua destilada sobre la placa de vidrio poroso con el fin de eliminar los restos de alcohol y otras impurezas. Una vez preparadas, las partículas se activaron con glutaraldehído de tal manera que uno de sus dos grupos aldehído se unió a los grupos amino del quitosano, mientras que el otro quedó libre para unir mediante enlace covalente moléculas de enzima a través de sus grupos ϵ -amino de la cadena lateral de los restos de lisina presentes en su superficie. Dicha activación se realizó de la siguiente manera: 1 g de partículas magnéticas de quitosano se sumergió en 4 mL de una solución de glutaraldehído (Sigma) al 2,5 % (v/v) en tampón fosfato potásico 0.1 M pH 7,0, y se dejó en agitación en dicha solución durante 2 horas a 25 °C. Una vez transcurrido este tiempo de activación, las partículas se filtraron sobre placa de vidrio poroso y lavaron tres veces con 10 mL de agua destilada sobre la misma placa con el fin de eliminar restos de glutaraldehído.

17.2. Unión covalente de la *Dp*NDT a las partículas magnéticas de quitosano

El proceso de inmovilización se llevó a cabo como se detalla a continuación:

La enzima disuelta en tampón fosfato potásico 0,1 M, pH 8,5, en un volumen final de 170 μ l, se incubó en presencia de 50 mg de perlas magnéticas activadas con glutaraldehído, durante 5 h a 25 °C y 250 r.p.m. Se separó la fase sólida de la

Materiales y Métodos

disolución mediante filtración y a continuación se realizaron una serie de lavados con 500 μl de tampón fosfato potásico 10 mM, pH 7. Se realizó la determinación de la cantidad de proteína unida al soporte mediante el ensayo de Bradford (Bradford, 1976) en los diferentes lavados realizados. Se procedió a determinar la actividad retenida del biocatalizador inmovilizado respecto de la enzima libre mediante el ensayo estándar que se describe a continuación en el apartado 17 de Materiales y Métodos. Finalmente, el biocatalizador obtenido se conservó a 4 °C hasta su posterior utilización en la síntesis de los distintos nucleósidos

17.3. Determinación de la actividad de la *Dp*NDT recombinante inmovilizada

Antes de utilizar el biocatalizador para la síntesis de otros nucleósidos no naturales, se determinó su actividad en una reacción estándar de síntesis de 2'-desoxiadenosina a partir de 2'-desoxiuridina y adenina. Para ello, se añadieron 17 mg de biocatalizador inmovilizado (que contenían 24.3 μg de *Dp*NDT inmovilizada) a 174 μL de una solución de 2'-desoxiuridina 16 mM y adenina 16 mM en tampón MES (ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico) 50 mM pH 6.5. La reacción se mantuvo en agitación a 40 °C y 350 r.p.m. durante 20 minutos. Una vez finalizado el tiempo de reacción, se tomó un alícuota de 50 μL del medio de reacción a la cual se añadió 50 μL de metanol frío a 4°C. La mezcla se calentó a 95 °C durante 5 minutos y tras su posterior centrifugación a 9,000 \times g durante 2 minutos, se procedió a analizar cuantitativamente los productos de síntesis (2'-desoxiadenosina y uracilo), localizados en el sobrenadante, mediante HPLC. En estas condiciones de reacción, una unidad internacional de actividad (UI) se define como la cantidad de biocatalizador que produce 1 μmol de 2'-desoxiadenosina por minuto.

La reacción se detectó cuantitativa y cualitativamente mediante HPLC. El sistema de HPLC utilizado fue el modelo Series 1100 (Agilent, EEUU) con una columna Luna 5 μ , C18(2) 250 x 4,60 mm (Phenomenex, EEUU) bajo las condiciones descritas en el apartado 24 de Materiales y Métodos. La actividad se evaluó cualitativa y cuantitativamente, detectando la presencia del 2'-desoxirribonucleósido sintetizado.

17.4. Estudio de la influencia del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática de derivado inmovilizado

Se sometieron 17 mg de biocatalizador que contenían aproximadamente 24,3 µg de enzima inmovilizada a las condiciones de ensayo descritas en el apartado 17 de Materiales y Métodos, en un intervalo de pH comprendido entre 4 y 12. El tampón utilizado para llevar a cabo los estudios de estabilidad y actividad de variación de pH fue un sistema de tampones citrato/fosfato potásico 10 mM a fuerza iónica (*I*) constante 150 mM. De igual manera, se determinó la actividad enzimática a distintas temperaturas entre 20 y 90 °C.

Todos los experimentos se han llevado a cabo por duplicado

18. Estudios de termoinactivación de la *Dp*NDT recombinante libre e inmovilizada

Se han llevado a cabo estudios de desactivación térmica tanto de la enzima libre como del derivado inmovilizado.

Respecto a la *Dp*NDT recombinante, alícuotas de 14,3 µg de proteína se incubaron a diferentes temperaturas (40, 50, 60 y 70 °C), durante 72 h. Tras incubar la enzima 5 minutos a 4 °C, se llevó a cabo el ensayo de actividad estándar descrito en el apartado 15 de Materiales y Métodos.

En el caso de derivado inmovilizado 17 mg de biocatalizador que contenía 24,3 µg de *Dp*NDT inmovilizada se incubó a diferentes temperaturas (40, 50, 60 y 70 °C) durante un intervalo de tiempo que varió entre 0 y 72 h. A continuación la enzima inmovilizada se mantuvo 5 minutos a 4 °C, y se efectuó el ensayo de actividad estándar descrito en el apartado 17.3 de Materiales y Métodos. Los ensayos se llevaron a cabo por duplicado.

19. Síntesis de nucleósidos naturales y no naturales catalizada por *Dp*NDT recombinante libre e inmovilizada

Se determinó la actividad tanto de la enzima recombinante libre como del derivado inmovilizado en reacciones de síntesis con diferentes nucleósidos y bases naturales. Para ello, se mantuvieron las condiciones de los ensayos estándar descritas en los apartados 15.1 y 17.3. de Materiales y Métodos.

En el caso de reacciones de síntesis de nucleósidos no naturales, la concentración de sustratos utilizada fue mayor que en el caso de la síntesis de nucleósidos naturales y, los tiempos de reacción fueron más largos. Ya que al no ser los sustratos naturales de la enzima, el reconocimiento de los mismos por parte de la enzima es más difícil.

Todos los experimentos se han realizado por duplicado.

20. Métodos analíticos para la determinación de la actividad enzimática

Para detectar la actividad de la *Dp*NDT se analizaron los productos de reacción mediante Cromatografía Líquida de alta resolución (HPLC). El equipo utilizado fue un **Agilent series 1100 (Agilent, EEUU)** con 4 módulos de trabajo (unidad desgasificadora, sistema multibomba, inyector automático y detector de diodo array). La columna utilizada en los diferentes análisis de síntesis de nucleósidos fue una columna **LUNA 5 μ , C18(2) 250 \times 4,60 mm (Phenomenex, EEUU)**.

Fase móvil: Se utilizó un gradiente que va del 100 % al 90 % acetato de Trimetilamonio durante 10 min y un gradiente que va de 0 % a 10 % de acetonitrilo, además un gradiente de 90 % a 100 % de acetato de Trimetilamonio durante 20 min y a un gradiente de 10 % a 0 % de acetonitrilo

Flujo: 0,9 mL/min

Presión: 180 barr λ = 230, 240, 254 y 260 nm.

Los tiempos de retención fueron los siguientes:

a) Compuestos naturales

Bases: Ac. úrico: 3,50 min; Adenina: 10,14 min; Citosina: 4,14; timina: 9,13; Guanina: 8 min; Hipoxantina: 7,34 min; Timina: 9,00 min; Uracilo: 5,41 min; Xantina: 8 min.

Nucleósidos: 2'-desoxiadenosina: 15,5 min; 2'-desoxiuridina: 9,16 min; 2'-deoxicitidina : 8,22 min; 2'-desoxiguanosina: 13 min; 2'-desoxiinosina: 10,95 min, 2'-desoxitimidina: 13,25 min; 2'-desoxixantosina: 13,23 min

b) Compuestos no naturales:

Bases: 2,6-diaminopurina: 8,71 min; 5-bromouracilo: 10,28 min; 5-clorouracilo: 8,71 min; 5-etiluracilo: 14,5 min; 5-fluoro-2-metoxi-4(1*H*) pirimidinona: 8,47 min; 5-fluorocitosina: 8,71 min (Igual que uracilo); 5-fluorouracilo: 5,94 min; 5-iodouracilo:13,10 min; 5-metilcitosina:7,14 min; 6-mercaptopurina: 8,85 min; 7-deaza-hidroxipurina: 10,5 min; azacitosina: 3,2 min; benzimidazol: 24,26 min; benzoiladenina: 18,6 min; trifluorotimina; 12,6 min.

Nucleósidos:

2,6-diaminopurina-2'-desoxirribosa:14,29 min; 2'-fluoro -2'-desoxiinosina: 14,5 min; 2'-fluoro -2'-desoxitimidina :15 min; 2'-fluoro -2'-desoxiuridina: 10,3 min; 2'-fluoro; 2'-desoxiadenosina: 16,07 min; 2'-fluoro-2'-desoxicitidina: 8,7 min; 5-aza-2'-desoxicitidina: 7,3 min; 5-bromo-2'-desoxiuridina: 15,7 min; 5-cloro-2'-desoxiuridina: 13,3 min; 5-etil-2'-desoxiuridina: 17,5 min; 5-fluoro-2'-desoxiadenosina: 19,5 min; 5-fluoro-2'-desoxicitidina: El mismo que 2'-desoxuridina; 5-fluoro-2'-desoxiuridina: 9,8 min; 5-fluoro-2-metoxi-4(1*H*)pirimidinona-2'-desoxirribosa: 13,42 min; 5-iodo-2'-desoxiuridina: 17,73 min; 5-metil-2'-desoxicitidinacitosina: 11,6 min; 6-mercaptopurina-2'-desoxirribosa: 11,96 min; 7-deaza-hidroxipurina-2'-desoxirribosa: 17 min; ara-adenina: 13,14 min; ara-citosina: 7,3 min; ara-timina: 11,25 min; ara-uracilo: 8,68 min; benzimidazol-2'-desoxirribosido: 28,95 min; benzoil-2'-desoxirribosa: 25 min; trifluorotimidina: 18,5 min.

21. Reutilización de la enzima inmovilizada

El biocatalizador inmovilizado (17 mg de derivado que contenía aproximadamente 24,3 µg *Dp*NDT inmovilizada) fue sometido a ciclos consecutivos de síntesis de diferentes nucleósidos, en concreto:

- Síntesis de 2'-desoxiguanosina (dGua) a partir 2'-desoxiuridina (dUri) y guanina (G).
- Síntesis de 2'-desoxixantosina (dXan) a partir 2'-desoxiuridina (dUri) y fluoroadenina (X).
- Síntesis de 5-Fluoro-2-metoxi-4(1*H*)pirimidinona 2'-desoxirribosa a partir de 2'-desoxiuridina y 5-Fluoro-2-metoxi-4(1*H*)pirimidinona.
- Síntesis de 2'-desoxi 5-iodouridina (d5IU) a partir de 2'-desoxiuridina (dUri) y 5-iodouracilo (5-IU).

Las condiciones de reacción fueron las mismas descritas para las respectivas reacciones en el apartado 17 de Materiales y Métodos. Entre cada ciclo de reutilización se lavó el biocatalizador inmovilizado con tampón MES 50 mM, pH 6,5.

Todas las determinaciones se han llevado a cabo por duplicado

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Obtención de la nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa recombinante de *Desulfotalea psychrophila* DSM 12343

1.1. Amplificación, clonación y secuenciación del gen *ndt* de *Desulfotalea psychrophila* DSM 12343

La clonación del gen *ndt* que supuestamente codifica la NDT de *D. psychrophila* se realizó a partir de la secuencia descrita en el genoma de esta bacteria y disponible en el NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Se llevó a cabo la amplificación del gen *ndt* por PCR y se añadieron las dianas para las enzimas de restricción *Nco*I y *Hind*III en los extremos del gen. Para ello, se diseñaron los oligonucleótidos cebadores Q6AQBONcoI y Q6AQBONHindIII descritos en la Tabla 5 teniendo en consideración la secuencia de la posible 2'-desoxirribosiltransferasa de *Desulfotalea psychrophila* DSM 12343 (tal y como se describe en el apartado 11 de Materiales y Métodos).

La amplificación por PCR permitió la obtención de un fragmento de aproximadamente 453 pb que concuerda con el tamaño del gen *ndt* que supuestamente codifica para la síntesis de la NDT de *D. psychrophila* DSM 12343.

Una vez realizada la purificación de dicho fragmento, se clonó en *E. coli* DH5 α utilizando como vector el plásmido pET24d(+), tal como se describe en el apartado 11 de Materiales y Métodos y esquematizado en la figura 19. Los clones positivos se seleccionaron por su crecimiento en LB suplementado con kanamicina y posterior miniprep de colonias. Las posibilidades de religación del plásmido pET24d(+) no son posibles al haber sido digerido con dos enzimas de restricción diferentes que generan extremos cohesivos, y solo puede haber crecimiento de clones no recombinantes si no hay una digestión completa del plásmido antes de la ligación. Por tanto, prácticamente todos los clones seleccionados eran recombinantes (contenían el plásmido pET24*ndt*).

Resultados y Discusión

Una vez purificados se analizaron los plásmidos recombinantes y se observó que presentaban el gen *ndt* (Figura 20).

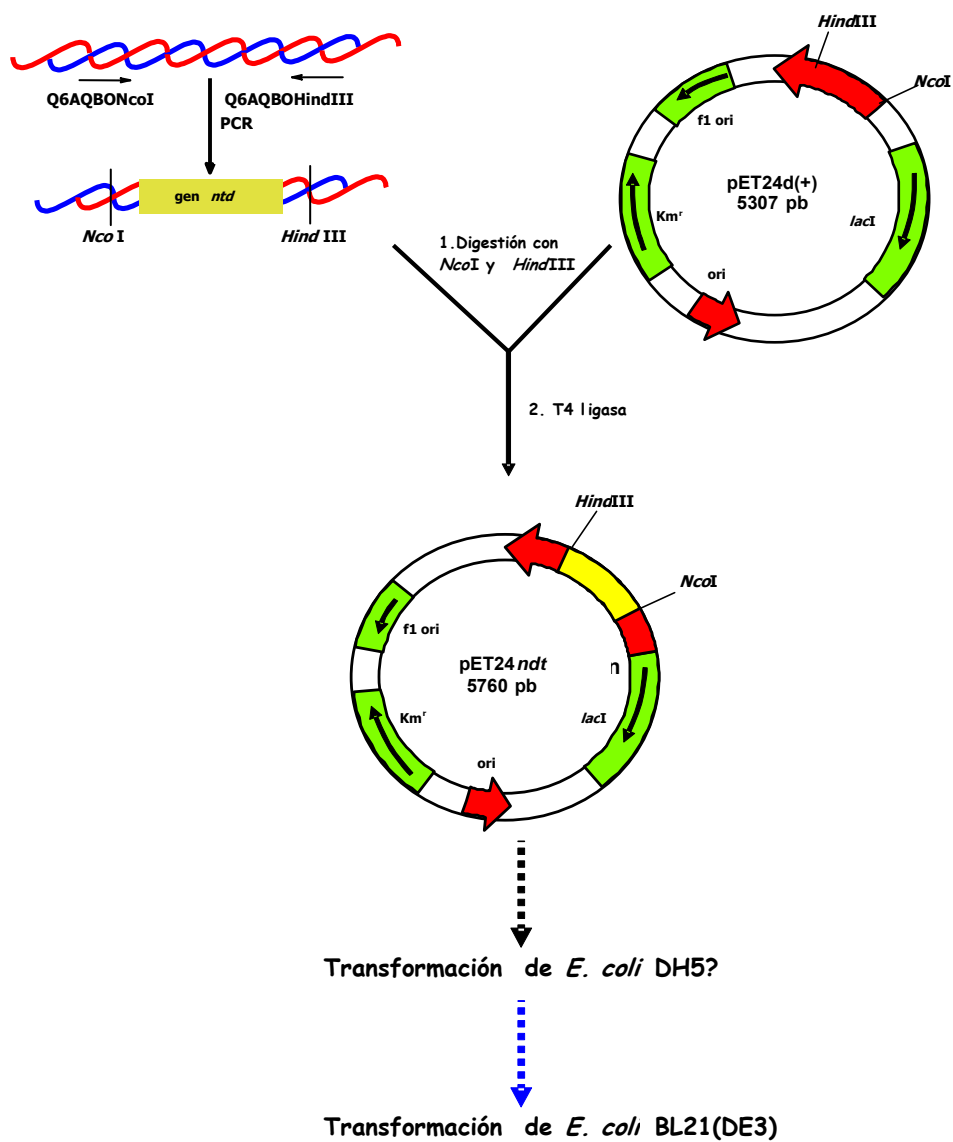


Figura 19: Amplificación y clonación del gen *ndt* de *Desulfotalea psychrophila* DSM 12343.

Resultados y Discusión

	M	D	N	L	S	F	R	P	K	L	Y	L	A
1	ATG	GAT	AAT	TTA	TCG	TTC	AGA	CCA	AAA	TTG	TAC	CTA	GCA
	A	P	L	F	N	E	A	E	K	E	S	N	R
14	GCA	CCA	CTG	TTT	AAT	GAG	GCT	GAA	AAA	GAG	AGT	AAT	CGC
	N	I	R	D	S	L	I	D	C	C	D	V	F
27	AAT	ATC	AGG	GAT	AGC	CTA	ATT	GAT	TGT	TGT	GAT	GTG	TTT
	L	P	Q	E	D	G	L	L	L	D	E	L	V
40	CTG	CCA	CAA	GAA	GAT	GGA	TTA	CTT	CTC	GAT	GAG	CTT	GTC
	S	L	G	T	P	L	K	V	A	E	K	S	I
53	TCC	CTA	GGC	ACT	CCT	CTA	AAA	GTA	GCC	GAA	AAA	TCA	ATT
	Y	E	A	D	I	S	A	M	K	N	A	D	I
66	TAT	GAG	GCG	GAC	ATT	TCA	GCG	ATG	AAA	AAC	GCT	GAT	ATT
	L	L	A	V	L	D	G	A	C	I	D	D	G
80	TTA	TTG	GCT	GTT	TTA	GAT	GGG	GCC	TGT	ATT	GAT	GAT	GGA
	V	A	F	E	L	G	Y	A	K	A	I	N	K
93	GTT	GCA	TTT	GAG	CTT	GGT	TAT	GCA	AAA	GCC	ATT	AAT	AAG
	V	C	L	G	F	Q	T	D	V	R	R	Q	A
106	GTT	TGT	CTT	GGT	TTT	CAA	ACT	GAT	GTC	AGG	CGA	CAG	GCA
	P	T	G	N	N	P	M	I	E	C	S	C	E
119	CCA	ACG	GGA	AAT	AAC	CCA	ATG	AAT	AGA	TGC	TCC	TGC	GAA
	E	I	F	S	D	L	G	S	L	K	K	W	L
132	GAA	ATA	TTT	TCT	GAT	TTA	GGG	TCG	CTG	AAA	AAA	<u>TGG</u>	<u>TTA</u>
	Q	Q	K	Y	N	K	L	S	-				
145	CAG	CAA	AAA	TAT	AAT	AAA	CTC	AGC	TAA				

Figura 20: Secuencia de nucleótidos y de los aminoácidos deducidos del gen *ndt* de *Desulfohalaea psychrophila*. En amarillo aparecen marcados el codón iniciador de traducción, que codifica para una metionina, y el codón stop de la traducción.

Se procedió al análisis del gen *ndt* mediante la utilización del servidor ExPASy (Gasteiger y col., 2003). La enzima *Dp*NDT es una proteína formada por 151 aminoácidos, de los cuales el 10,6 % son residuos básicos (R + H + K), el 15,9 % son residuos ácidos (D + E), el 21,9 % son residuos polares (S+ T+ C + N + Q) y el 51,7 % son residuos apolares (A + G + I+ L + M + P + V + F + W +Y), de los que un 7,3 %

Resultados y Discusión

corresponderían a residuos aromáticos (F + W + Y). Estos porcentajes son muy parecidos a los de otras 2'-desoxirribosiltransferasas descritas (Tabla 7). La enzima presenta 24 residuos cargados negativamente (ácido aspártico y glutámico), y 16 residuos cargados positivamente (arginina y lisina), lo cual hace que esta proteína muestre un valor teórico de punto isoeléctrico de 4,56. Este valor es similar a los calculados para otras nucleósidos 2'-desoxirribosiltransferasas, concretamente 4,65 para la NDT de *Lactobacillus leichmannii* (LNDT), 4,79 para la NDT de *Lactobacillus helveticus* (LhNDT) y 4,93 para la PDT de *Lactobacillus helveticus* (LhPDT).

Tabla 7: Composición de aminoácidos de las 2'-desoxirribosiltransferasas de *Desulfotalea psychrophila* (DpNDT), *Lactobacillus reuteri* (LrNDT), y *Lactobacillus leichmannii* (LNDT) y *Lactobacillus helveticus* (LhNDT y LhPDT)

Aminoácidos		Número de residuos (frecuencia, %)				
		DpNDT	LrNDT	LNDT	LhNDT	LhPDT
Ala	A	13 (8,6)	10 (6,2)	8 (5,1)	10 (6,3)	13(7,8)
Arg	R	5 (3,0)	4 (2,5)	3 (1,9)	2 (1,3)	6 (3,6)
Asn	N	9 (6,0)	11 (6,9)	12 (7,6)	12 (7,6)	9 (5,4)
Asp	D	13 (8,6)	13 (8,19)	14 (8,9)	11 (7,0)	13 (7,8)
Cys	C	6 (4,0)	1 (0,6)	0 (0)	1 (0,6)	2 (1,2)
Gln	Q	5 (3,3)	5 (3,1)	4 (2,5)	3 (1,9)	4 (2,4)
Glu	E	11 (7,3)	11 (6,9)	11 (7,0)	14 (8,9)	11 (6,6)
Gly	G	8 (5,3)	12 (7,5)	12 (7,6)	12 (7,6)	13 (7,8)
His	H	0 (0,0)	2 (1,2)	2 (1,3)	3 (1,9)	3 (1,8)
Ile	I	9 (6,0)	8 (5,0)	9 (5,7)	9 (5,7)	11 (6,6)
Leu	L	21 (13,9)	10 (6,2)	13 (8,3)	15 (9,5)	9 (5,4)
Lys	K	11 (7,3)	10 (6,2)	13 (8,3)	14 (8,9)	11 (6,6)
Met	M	3 (2,0)	8 (5,0)	6 (3,8)	5 (3,2)	7 (4,2)
Phe	F	6 (4,0)	6 (3,8)	6 (3,8)	5 (3,2)	11 (6,6)
Pro	P	6 (4,0)	8 (5,0)	8 (5,1)	7 (4,4)	11 (6,6)
Ser	S	10 (6,6)	8 (5,0)	5 (3,2)	6 (3,8)	7 (4,2)
Thr	T	3 (2,0)	6 (3,8)	6 (3,8)	4 (2,5)	9 (5,4)
Trp	W	1 (0,7)	3 (1,9)	3 (1,9)	3 (1,9)	1 (0,6)
Tyr	Y	4 (2,6)	11 (6,9)	12 (7,6)	13 (8,2)	7 (4,2)
Val	V	7 (4,6)	13 (8,1)	10 (6,4)	9 (5,7)	9 (5,4)

Aminoácidos	Número de residuos (frecuencia, %)				
	<i>Dp</i> NDT	<i>Lr</i> NDT	<i>L</i> NDT	<i>Lh</i> NDT	<i>Lh</i> PTD
Total	151	157	157	158	167

1.2. Sobreexpresión del gen *ndt* de *Desulfotalea psychrophila*

Una vez conseguida la clonación del gen *ndt* de *Desulfotalea psychrophila* DSM 12343 en *E. coli* DH5 α se procedió a optimizar la expresión del mismo utilizando *E. coli* BL21(D3) como hospedador.

Para ello, tras purificar el plásmido recombinante pET24*ndt* de *E. coli*, se procedió a transformar *E. coli* BL21(DE3) con dicho plásmido obteniéndose el microorganismo recombinante *E. coli* BL21(pET24*ndt*). Tras comprobar que no se había producido ninguna mutación que pudiera afectar a la estructura y/o la actividad de la enzima, se procedió a realizar los estudios de expresión de la nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa de *Desulfotalea psychrophila* en el microorganismo recombinante *E. coli* BL21(pET24*ndt*) (Figura 19).

Para abordar la sobreexpresión de la *Dp*NDT por el microorganismo recombinante *E. coli* BL21(pET24*ndt*), se llevaron a cabo en primer lugar estudios de expresión inoculando 5 mL de medio LB suplementado con kanamicina con el microorganismo recombinante, tanto en presencia como en ausencia de inductor IPTG 0,4 mM, a 30 y 37 °C durante 12 horas (apartado 12 de Materiales y Métodos). Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a la ruptura celular por sonicación y se procedió a analizar mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) tanto los restos celulares, como los extractos solubles con el fin de determinar si la *Dp*NDT se expresaba en el extracto soluble o lo hacía como cuerpos de inclusión. Los resultados mostraron que la *Dp*NDT no se expresaba como cuerpos de inclusión, confirmando la presencia de la *Dp*NDT en el extracto soluble (Figura 21). En la figura no se muestra los controles del microorganismo *E. coli* BL21(DE3) salvaje, ya que está descrito que no presenta 2'-desoxirribosiltransferasas (Fernández-Lucas y col., 2010). Como se puede observar la *Dp*NDT presenta un peso molecular aparente en torno a los 16-18 kDa por monómero, y se expresa tanto a 30 como 37 °C, en presencia y en ausencia de IPTG, siendo el nivel de expresión claramente superior en presencia de IPTG, y parece que presenta ligeramente mejor expresión a 37 °C.

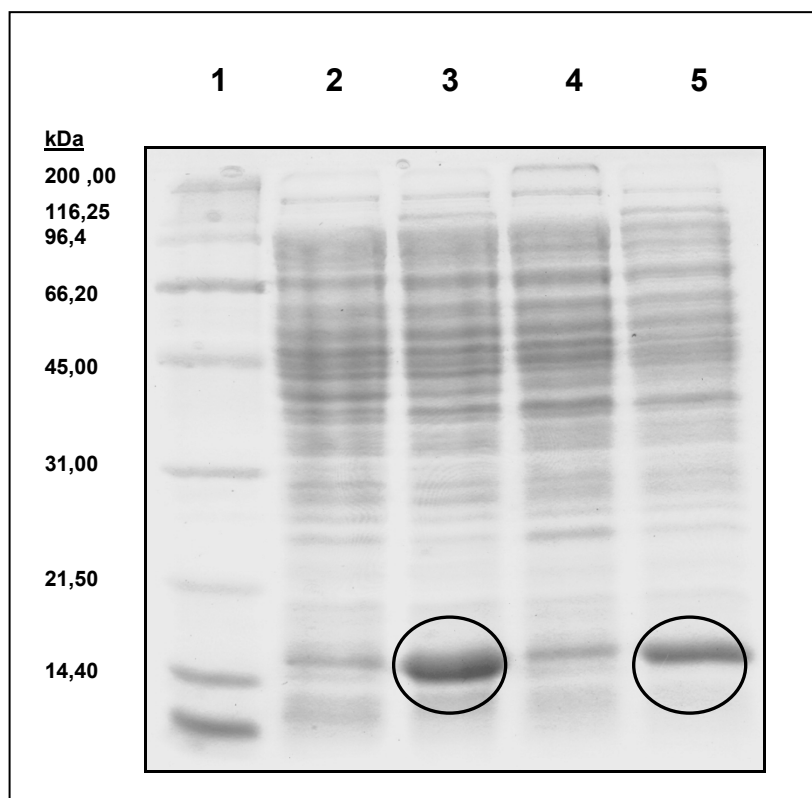


Figura 21: Electroforesis de los extractos celulares de *E.coli* BL21(pET24NDT_{Dp}) tras la ruptura celular. Las células se crecieron a distintas temperaturas y en ausencia o presencia de IPTG 0,4mM. **Calle 1:** Marcadores de peso molecular de Bio-Rad. **Calle 2:** *E. coli* BL21(pET24NDT_{Dp}) crecidas a 37 °C, sin IPTG. **Calle 3:** con IPTG . **Calle 4:** *E. coli* BL21(pET24NDT_{Dp}) crecidas a 30 °C, sin IPTG., **Calle 5:** con IPTG.

2. Aislamiento y purificación de la nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa recombinante de *Desulfotalea psychrophila*.

Una vez definidas las condiciones de producción de la DpNDT por *E. coli* BL21(pET24ndt) se procedió a la puesta a punto de un método de purificación que permitiera la obtención de la enzima pura a partir de los caldos de producción, con el fin de llevar a cabo posteriores estudios de caracterización.

Para ello, se creció el microorganismo recombinante en 500 ml de LB suplementado con kanamicina a 37 °C y, tras inducirlo con IPTG a concentración 0,4 mM durante 2 horas y media, se detuvo la fermentación y se separaron las células de los caldos de

cultivo por centrifugación a $3500\times g$. Posteriormente se resuspendieron las células en tampón fosfato potásico 10 mM, pH 7, se lisaron por sonicación (según el protocolo descrito en el apartado 12 de Materiales y Métodos) y se procedió a separar el extracto libre de células del sedimento celular mediante centrifugación a $9000\times g$ a 4 °C. Una vez obtenido el extracto libre de células, se abordó la purificación de la *Dp*NDT, que se llevó a cabo mediante dos pasos cromatográficos:

2.1. Cromatografía de intercambio iónico

10 ml de extracto libre de células en tampón fosfato potásico 10 mM, pH 7 se aplicaron en un intercambiador aniónico UNOsphere Q Cartridge (BioRad, EEUU) previamente equilibrado en tampón fosfato potásico 10 mM, pH 7. Tras el lavado con 60 ml del mismo tampón, se procedió a la elución de las proteínas retenidas utilizando un gradiente continuo de NaCl entre 0 y 0,4 M, seguido de una elución isocrática con NaCl 0,4 M en el mismo tampón. Se tomaron fracciones de 600 μ L y se midió la absorbancia de las fracciones a 280 nm obteniéndose el perfil que se muestra en la Figura 22.

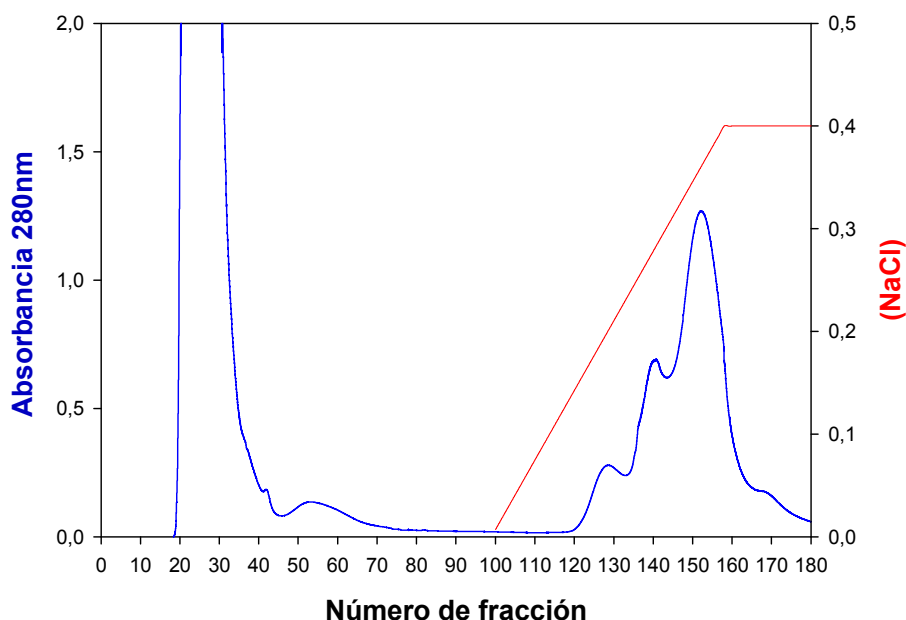


Figura 22: Purificación de la *Dp*NDT producida por *E. coli* BL21(pET24*ndt*). Cromatografía de intercambio iónico UNOsphere Q Cartridge: — absorbancia a 280 nm, — gradiente de NaCl.

Resultados y Discusión

Debido a que *E. Coli* BL21 (DE3) presenta actividad nucleósido fosforilasa la presencia de la *Dp*NDT se detectó mediante el análisis de las fracciones por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) (Figura 24). La selección de las fracciones se realiza en base al tamaño molecular de la proteína. De las fracciones que presentaron una absorbancia mayor que 0,2 (fracciones de la 54 a la 86) se seleccionaron aquellas que mostraron mayor grado de pureza.

2.2. Cromatografía de penetrabilidad en Superosa 12.

Las fracciones más puras procedentes de la elución de la cromatografía de intercambio iónico, en las que se detectó la presencia de la nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa, se juntaron y fueron concentradas en un lecho de PEG-35.000. A continuación, la muestra concentrada se sometió a una cromatografía de penetrabilidad en Superosa 12 equilibrada en tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7 (apartado 12 a) de Materiales y Métodos), cuyo perfil de elución se muestra en la Figura 23. Al igual que en el paso de purificación anterior, el análisis de las fracciones se llevó a cabo mediante electroforesis SDS-PAGE, seleccionando aquellas fracciones (de la 16 a la 21) que presentaron un mayor grado de pureza (Figura 24).

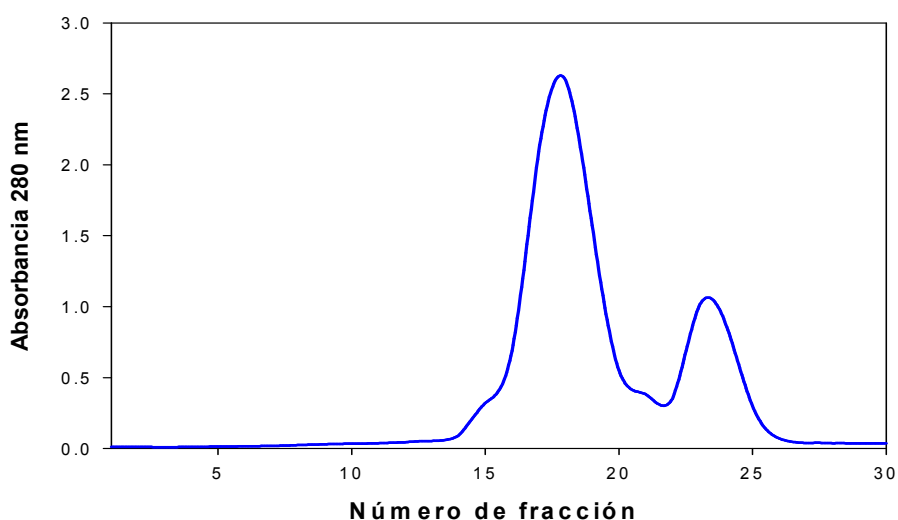


Figura 23: Purificación de la *Dp*NDT producida por *E. coli* BL21(pET24*ndt*). Cromatografía de penetrabilidad en Superosa 12 para la purificación la *Dp*NDT recombinante: — absorbancia a 280 nm

Como se puede observar en la Figura 24 la proteína mostró una masa molecular en torno a los **16 kDa**, valor que concuerda con el deducido de su secuencia de aminoácidos (apartado 1 de Resultados y Discusión).

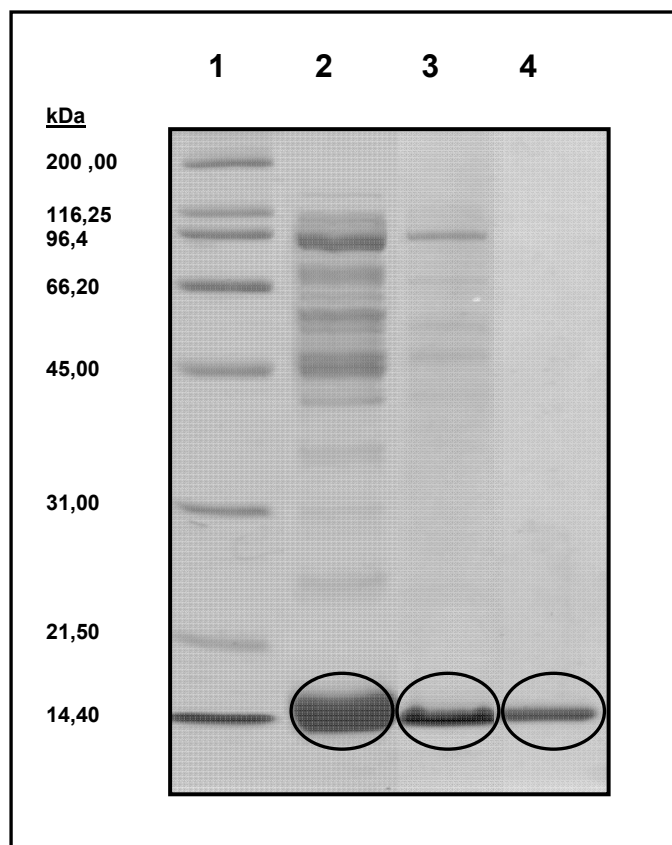


Figura 24: Electroforesis en SDS-PAGE de distintas fracciones de la cromatografía de intercambio iónico UNOsphere Q Cartridge. **Calle 1:** Marcadores de masa molecular conocida de BioRad; **Calle 2:** Fracciones que contienen la *DpNDT* recombinante procedentes de la cromatografía de intercambio iónico UNOsphere Q Cartridge, BioRad (EEUU); **Calle 3:** Fracciones que contienen la *DpNDT* recombinante procedentes de la cromatografía de penetrabilidad en Superosa 12. **Calles 4:** Fracciones que contienen la proteína pura.

Con las fracciones obtenidas que no eran del todo puras se repitió el protocolo de purificación con el objetivo de obtener la mayor cantidad de proteína y con la mayor pureza posible obteniéndose hasta un total de 7mg de enzima *DpNDT* por cada litro de cultivo.

Resultados y Discusión

2.3 Análisis de la secuencia aminoterminal

Para comprobar que la proteína purificada, era efectivamente el producto de expresión del gen *ndt* de *Desulfotalea psychrophila* se procedió a la determinación de la secuencia aminoterminal para comprobar que se había llevado a cabo correctamente la clonación y purificación de la proteína deseada. Para ello, tras electroforesis (Figura 24), la proteína pura se transfirió a una membrana de PVDF (Immobilon-PSQ de Millipore) según el protocolo descrito en el apartado 14.2 de Materiales y Métodos.

La banda de proteína se recortó para su secuenciación y se analizó en un secuenciador de proteínas Applied Biosystems del servicio de secuenciación del Centro de Investigaciones Biológicas del C.S.I.C. El resultado obtenido (Tabla 8) confirmó que se trataba de la *Dp*NDT.

Tabla 8: Secuencia amino terminal de la *Dp*NDT recombinante

	Secuencia amino terminal
<i>Dp</i>NDT	MDNLSFRPKLY

3. Determinación de la actividad de la *Dp*NDT recombinante

Una vez purificada y cuantificada la *Dp*NDT recombinante, se procedió a determinar su actividad 2'-desoxirribosiltransferasa sobre diferentes sustratos para poner de manifiesto si realmente se trata de una 2'-desoxirribosiltransferasa, y clasificar a que tipo pertenece según su actividad. En este sentido indicar que las **2'-desoxirribosiltransferasa tipo I** o **PDTs**, intercambian exclusivamente bases púricas entre 2'-desoxirribonucleósidos, mientras que las **2'-desoxirribosiltransferasa tipo II** o **NDTs**, intercambian bases púricas y/o pirimidínicas entre 2'-desoxirribonucleósidos.

Además se procedió a comprobar la actividad de la enzima sobre ribonucleósidos con objeto de descartar la presencia de trazas de nucleósido fosforilasas, habitualmente presentes en *E. coli*. Para ello se realizaron reacciones con ribo y 2'-desoxirribonucleósidos según las condiciones descritas en el apartado 15.1 de Materiales y Métodos. La enzima recombinante es capaz de catalizar el intercambio de

bases, tanto púricas como pirimidínicas, entre 2'-desoxirribosiltransferasa (Tabla 9). Lo que permite afirmar que la nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa de *Desulfotalea psychrophila* DSM 12343 es una nucleósido **2'-desoxirribosiltransferasa tipo II (DpNDT)**. Además se puede descartar la presencia de trazas de nucleósido fosforilasas en la disolución de la proteína, ya que no realiza la reacción utilizando ribonucleósidos como sustrato.

Tabla 9: Reacciones para determinar el tipo de actividad 2'-desoxirribosiltransferasa de la DpNDT recombinante^a.

	dUri+ A	dAdo+Hip	dUri+Tim	Ino+A	Uri+A
2'-desoxirribosiltransferasa	+	+	+	-	-

^a Condiciones de reacción: [sustratos] = 10 mM, en tampón MES 50 mM, pH 6,5, a 40 °C, 5 min y 30 r.p.m. Se utilizaron 14,3 µg de proteína en un volumen ensayo de 40 µl.

(+) = presencia de actividad,

(-) = ausencia de actividad

Estos resultados son muy novedosos, ya si bien ha había descrito la presencia de 2'-desoxirribosiltransferasas en microorganismos psicrófilos (Fernández-Lucas y *col.*, 2007), no se había llevado a cabo hasta el momento la purificación de una 2'-desoxirribosiltransferasa procedente de un microorganismo psicrófilo.

4. Caracterización funcional de la DpNDT recombinante

Con el fin de llevar a cabo una caracterización funcional exhaustiva de la DpNDT recombinante, se han realizado estudios de estabilidad y actividad de la enzima en función del pH y la temperatura, así como estudios de la actividad enzimática respecto a la fuerza iónica.

La reacción elegida para llevar a cabo todos los ensayos de caracterización funcional de la DpNDT recombinante ha sido la síntesis de 2'-desoxiadenosina a partir de 2'-

Resultados y Discusión

desoxiuridina y adenina según las condiciones descritas en el apartado 15.1 de Materiales y Métodos, en las cuales se asegura que la enzima se encuentra en condiciones saturantes de sustrato.

4.1. Estudio de la influencia del pH sobre la estabilidad y actividad enzimática.

En primer lugar, se llevó a cabo el estudio de la influencia del pH del medio sobre la estabilidad de la enzima *Dp*NDT recombinante. Para ello, se incubó la proteína a distintos valores de pH en un intervalo comprendido entre 4 y 12. Las incubaciones se realizaron durante 15 minutos a 4 °C en un sistema de tampones citrato/fosfato potásico 10 mM, a una fuerza iónica (*I*) constante de 150 mM. A continuación, se ajustó el pH de la solución enzimática a pH 6,5 tal como se describe en el apartado 15.2 de Materiales y Métodos, y seguidamente se determinó la actividad según el ensayo estándar. Se puede observar que la enzima es estable en todo el intervalo de pH desde 4 hasta 11, (Figura 25 A). Estos valores difieren ligeramente con lo descrito en la bibliografía para otras nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasas (Short *y col.*, 1996); Fernández-Lucas *y col.*, 2011) que no son estables a valores de pH superiores a 8.

Respecto a la determinación de pH óptimo de actividad de la enzima, se llevó a cabo mediante la reacción estándar (apartado 15.1 Materiales y Métodos) a distintos valores de pH comprendidos entre 4 y 12. En este caso el ensayo de actividad utilizado fue la reacción de síntesis de timidina a partir 2'-desoxiuridina y timina, ya que la timina presenta un valor de pka del N1 de 9.7 frente al valor de 4.8 del pka de N1 de la adenina, lo que interferiría en la reacción, ya que no se podría atribuir la posible variación de la actividad a un cambio en los estados de protonación-desprotonación de los residuos de la enzima implicados en catálisis.

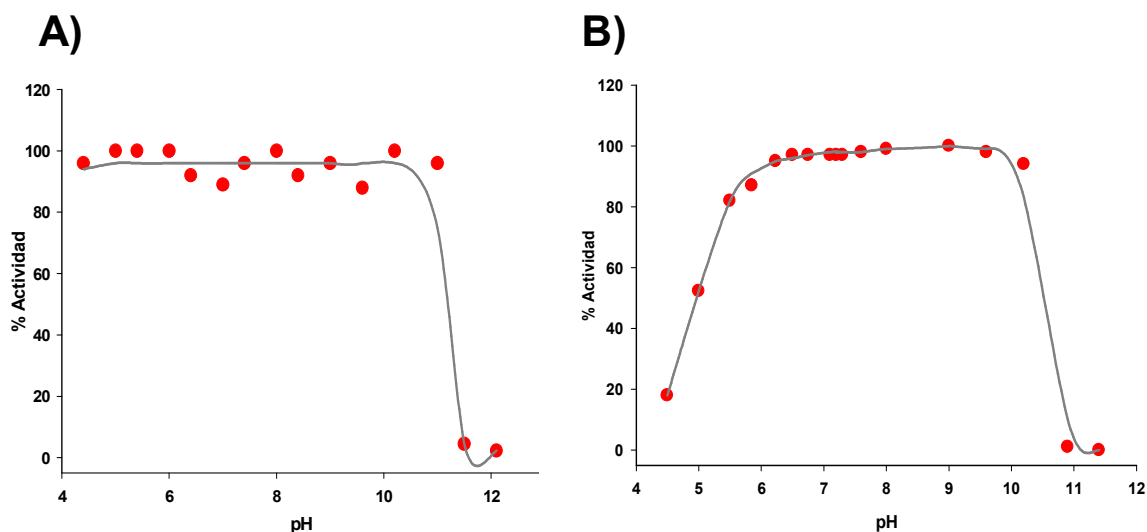


Figura 25: Estudio de la influencia del pH sobre la estabilidad y la actividad de la enzima. **A)** Efecto del pH sobre la estabilidad de la *Dp*NDT, tiempo de incubación 15 minutos, 4 °C. **B)** Efecto del pH sobre la actividad de la *Dp*NDT. **Condiciones de reacción:** 14,3 μ L de enzima se incubaron en un volumen de reacción de 40 μ L que contenía [dUri]=[T]=10 mM en tampón MES 50 mM, pH 6,5, a 50 °C durante 20 min y 30 r.p.m.

Sorprendentemente la *Dp*NDT recombinante no presenta un único valor de pH óptimo de actividad sino que la actividad se mantiene entre el 90-100 % en un intervalo de pH entre 6 y 10 (Figura 25 B).

El hecho de que la *Dp*NDT presente su máxima actividad en un intervalo muy amplio de valores de pH, concretamente entre 6,5 y 10, y que también muestre una elevada estabilidad en un amplio intervalo de pH comprendido entre 4 y 10, es una gran ventaja desde el punto de vista de su aplicación industrial en la síntesis de nucleósidos ya que puede operar en un intervalo amplio de pH sin una disminución significativa de la actividad. Además, esta alta tolerancia de la enzima frente a valores elevados de pH sugiere la posibilidad de que puede ser interesante su uso como biocatalizador para la síntesis de nucleósidos utilizando bases púricas como guanina y xantina que son bases poco solubles en tampones acuosos, y necesitan elevados valores de pH (9-12) para su disolución.

Resultados y Discusión

4.2. Estudio de la influencia de la temperatura sobre la actividad y estabilidad enzimática de la *Dp*NDT recombinante

El estudio de la influencia de la temperatura sobre la estabilidad de la *Dp*NDT recombinante se llevó a cabo incubando la enzima a distintas temperaturas, en un intervalo comprendido entre 20 °C y 80 °C, en tampón fosfato potásico 10 mM, pH 7, tal como se describe en el apartado 15 de Materiales y Métodos. Finalizada la incubación a las diferentes temperaturas, las soluciones enzimáticas se incubaron 5 minutos en hielo, y posteriormente se realizó el ensayo estándar para la determinación de actividad, (descrito en el apartado 15.1 de Materiales y Métodos). Todos los ensayos de actividad se realizaron en tampón MES 50 mM, pH 6,5. Los resultados se muestran en la Figura 26 A. Respecto a la temperatura óptima de actividad de la enzima, su determinación se realizó llevando a cabo la reacción estándar (descrito en el apartado 15.1 de Materiales y Métodos) a diferentes valores de temperatura (Figura 26 B).

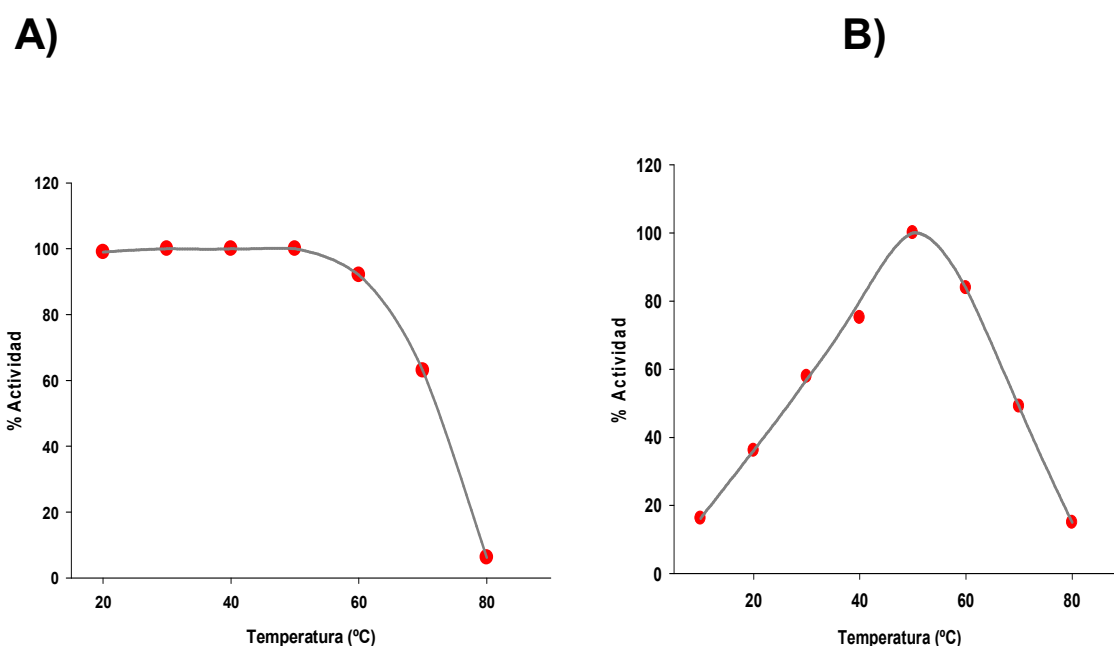


Figura 26: Estudio de la influencia de la temperatura en la actividad de la *Dp*NDT. **A)** Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la *Dp*NDT; tiempo de incubación 15 minutos. **B)** Efecto de la temperatura sobre la actividad de la *Dp*NDT. **Condiciones de reacción:** 14,3 µg de enzima se incubaron en un volumen de reacción de 40 µL que contenía [dUri]=[A]=10 mM en tampón MES 50 mM, pH 6,5, a 50 °C durante 20 min y 30 r.p.m.

Con respecto al efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la enzima, se observa que la *Dp*NDT recombinante mantiene su actividad al 100% durante al menos 15 minutos cuando es incubada a temperatura por debajo de 55°C. y disminuye drásticamente su actividad por encima de 60°C. Por otro lado, la enzima presenta máxima actividad a 50°C, y valores superiores a esta temperatura reducen considerablemente su actividad debido posiblemente a su desnaturalización térmica.

A la vista de los resultados de los experimentos realizados para comprobar el efecto del pH y de la temperatura en la estabilidad y la actividad de la *Dp*NDT, se establecieron como condiciones óptimas de reacción, una temperatura de 50 °C y un valor de pH comprendido entre 6 y 10. Estos resultados son cuanto menos sorprendentes, ya que tratándose de un psicrófilo, no se esperaba que la temperatura óptima de actividad de la enzima tuviera un valor tan elevado. Estos valores concuerdan con la estabilidad que muestra la *Dp*NDT frente al aumento de temperatura, y además son confirmados, como veremos más adelante, por los resultados obtenidos en los experimentos de desnaturalización térmica de la proteína (T_m , 58 °C). Además, estos valores están en concordancia con los descritos para la isocitrato deshidrogenasa de *Desulfotalea psychrophila* (Fedoy y col., 2007), lo que indica que se trata en ambos casos de enzimas con una inusual estabilidad frente a valores de temperatura elevados, más propios de enzimas procedentes de microorganismos mesófilos. Todo ello nos indica que *Desulfotalea psychrophila* es un microorganismo psicrotolerante, dado el inusual estabilidad térmica que presentan estas enzimas (Fedoy y col., 2007).

4.3. Estudio de la actividad de la enzima *Dp*DNT frente a Fuerza iónica.

El estudio del efecto de la fuerza iónica (I) sobre la actividad se ha llevado a cabo utilizando el ensayo de actividad estándar (apartado 15.1 de Materiales y Métodos). La variación de la fuerza iónica en cada ensayo se realizó por adición de cantidades crecientes de NaCl hasta una concentración de 1M, en tampón de reacción MES 50 mM, pH 6,5. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 27, en la que se observan un ligero descenso de la actividad a medida que aumenta la fuerza iónica. Con valores de concentración de NaCl en el medio de reacción comprendidos entre 0 y

Resultados y Discusión

0,5 M vemos que existe un ligero descenso gradual de actividad hasta lograr un 80% de la actividad inicial que presenta la enzima en ausencia de NaCl. Finalmente, valores de concentración de NaCl superior a 0,5 M no producen una disminución mayor de la actividad, manteniéndose un descenso del 20% en la actividad en presencia de 1 M de NaCl en el medio de reacción.

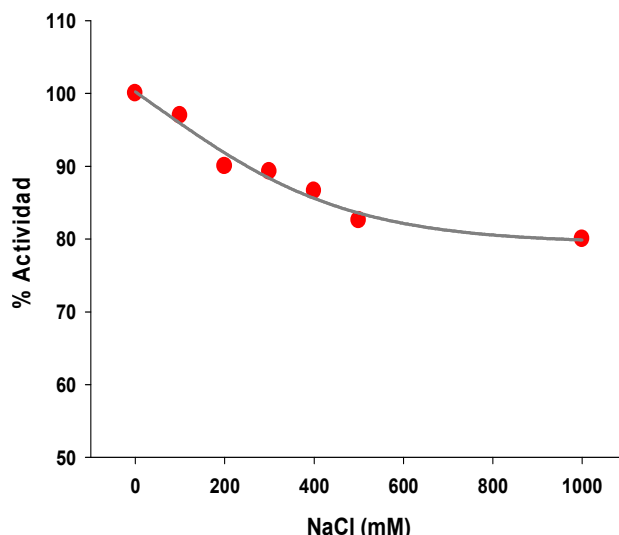


Figura 27: Efecto de la fuerza iónica (I) sobre la actividad de la *DpNDT*. Condiciones de reacción: 14,3 μg de enzima se incubaron en un volumen de reacción de 40 μl que contenía $[\text{dUri}] = [\text{A}] = 10 \text{ mM}$ en tampón MES 50 mM, pH 6,5, a 50 $^{\circ}\text{C}$ durante 20 minutos y 30 r.p.m.

4.4. Efecto de diferentes aditivos sobre la actividad de la *DpNDT*

Una vez determinadas las condiciones óptimas de actividad y estabilidad de pH y temperatura de la *DpNDT*, se procedió a evaluar el efecto que producía la presencia de cationes monovalentes y divalentes en la actividad de la misma. Asimismo, también se evaluó la actividad de la enzima en presencia de otro tipo de compuestos como, por ejemplo, agentes quelantes (EDTA) o agentes desnaturizantes (2-mercaptoetanol y DTT) (Tabla 11).

Tabla 10: Estudio del efecto de la presencia de diferentes cationes en la actividad de la *Dp*NDT^a.

Aditivo		Actividad Relativa <i>Dp</i> NDT (%)
Cationes Monovalentes		
K ₂ SO ₄	(1,25 mM)	101
KCl	(1,25 mM)	101
LiCl	(1,25 mM)	99
Na ₂ SO ₄	(1,25 mM)	101
NaCl	(1,25 mM)	110
RbCl	(1,25 mM)	107
Cationes Divalentes		
BaCl ₂	(1,25mM)	106
CaCl ₂	(1,25mM)	105
CaCl ₂	(10mM)	68
CoCl ₂ ·6H ₂ O	(1,25mM)	101
CuSO ₄	(1,25mM)	30
Mg SO ₄	(1,25mM)	96
MgCl ₂	(1,25mM)	107
MgCl ₂	(10mM)	81
MnCl ₂	(1,25mM)	106
MnCl ₂	(10mM)	55
Zn SO ₄	(1,25mM)	100
Zn SO ₄	(10mM)	0,5
CONTROL		100

^a Condiciones reacción: [dUri]=[A]=10 mM en MES 50 mM, pH = 6,5 a 50 °C, t= 20 min, 30 r.p.m.

Resultados y Discusión

Tabla 11: Estudio del efecto de la presencia de diferentes aditivos en la actividad de la *DpNDT*^a.

Aditivo		Actividad Relativa <i>DpNDT</i> (%)
(NH ₄) ₂ SO ₄	(1,25 mM)	101
2-mercaptoetanol	(1,25 mM)	100
Al ₂ (SO ₄) ₃ ·18H ₂ O	(1,25 mM)	89
EDTA	(1,25 mM)	87
	(10 mM)	58
FeCl ₃	(1,25 mM)	102
	(10 mM)	37
DTT	(1,25 mM)	104
	(10 mM)	130
CONTROL		100

^a Condiciones reacción: [dUri]=[A]=10 mM en MES 50 mM, pH = 6,5 a 50 °C, t= 20 min, 30 r.p.m.

Como se puede observar en la Tabla 10, la presencia de cationes monovalentes y divalentes no afecta a la actividad de la enzima significativamente a una concentración de 1,25 mM, lo cual concuerda con lo descrito en la bibliografía para la nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa de *Lactobacillus reuteri* (*LrNDT*) (Fernández-Lucas y col., 2010) y la nucleósido 2'--desoxirribosiltransferasa de *Lactococcus lactis subsp. Lactis* (Miyamoto y col., 2007). Sin embargo, se puede apreciar un descenso significativo de la actividad de la enzima cuando la concentración utilizada fue 10 mM. Respecto al efecto de la adición de agentes quelantes como el EDTA y de agentes reductores como el 2-mercaptoetanol o el DTT como se puede observar en la Tabla 11, no se produce un descenso de la actividad a 1,25 mM, aunque sin embargo se produce una disminución significativa a 10 mM. En el caso de DTT se observa que un incremento de la concentración del mismo, no produce una disminución de la actividad, lo cual nos indica que dado que hay 6 cisteínas por monómero, o bien se encuentran todas libres, o bien

si se encuentran formando puentes disulfuro, estos no son esenciales para la actividad de la enzima.

4.5. Determinación de los parámetros cinéticos de la *Dp*NDT recombinante.

Se han determinado los parámetros cinéticos, K_M , k_{cat} y k_{cat}/K_M , aparentes de la *Dp*NDT recombinante para el ensayo estándar (apartado 15.5 de Materiales y Métodos). Los parámetros cinéticos se han calculado mediante el ajuste de los datos a la ecuación de Hanes-Woolf (Segel, 1975). De esta manera, se obtienen los resultados reflejados en la Tabla 12.

Tabla 12: Parámetros cinéticos aparentes de *Dp*NDT recombinante.

Sustrato	K_M ap. (mM)	k_{cat} ap. (s ⁻¹)	k_{cat} ap. / K_M ap. (mM ⁻¹ s ⁻¹)
2'-desoxiuridina	33,8	0,36	0,010
Timina	7,5	0,062	0,008

El mecanismo cinético que siguen este tipo de enzimas es un mecanismo de tipo “ping-pong bi-bi” según la literatura (Danzin y Cardinaud, 1974). Como se puede observar en la Tabla 12 la K_M aparente para el nucleósido es mayor que para la de la base, lo que está de acuerdo con los resultados descritos en la bibliografía para esta reacción catalizada por este tipo de enzimas (Fernández-Lucas y col., 2010), con la salvedad de que presenta una eficacia catalítica (k_{cat}/K_M) mucho menor que la mostrada por este tipo de enzimas. Este hecho podría ser atribuible a la falta del residuo de Tyr 151, que forma parte del centro activo en este tipo de enzimas (Fernández-Lucas y col., 2010) y está implicado en el reconocimiento de la base.

5. Caracterización estructural de la *Dp*NDT recombinante

La mayor parte de las nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasas descritas proceden del género *Lactobacillus*. Son enzimas homohexaméricas (Armstrong y col., 1996; Fernández-Lucas y col., 2010; Kaminski, 2002) de aproximadamente 109-118 kDa, constituidas por unidades monoméricas de 18-20 kDa de masa molecular.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, se ha llevado a cabo la caracterización estructural de la *Dp*NDT recombinante, no descrita hasta la fecha.

5.1. Espectroscopía de absorción UV-visible

El análisis del espectro de absorción UV-visible de la *Dp*NDT recombinante muestra que la enzima presenta un máximo de absorción en torno a 278 nm (Figura 28), como vemos muy próximo a 280 nm, longitud de onda característica a la que se produce el máximo de absorción de los residuos enzimáticos de proteínas.

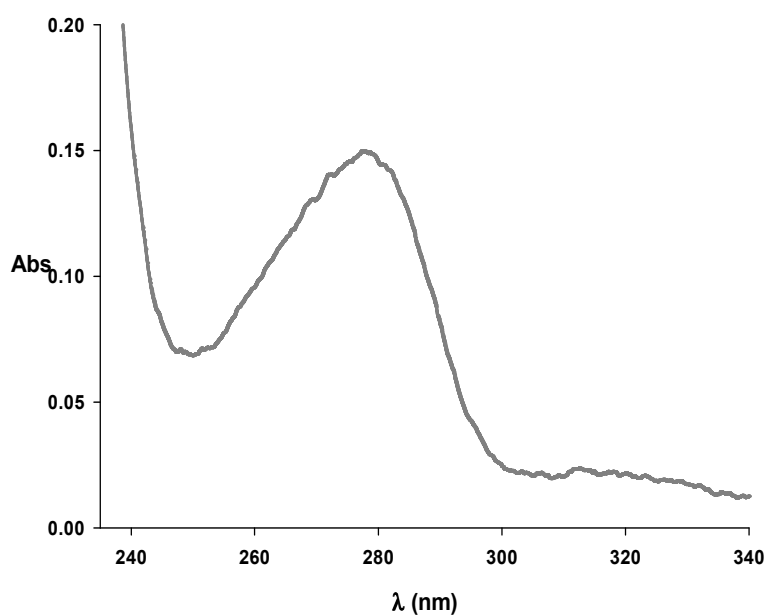


Figura 28: Espectro de absorción UV-vis de la *Dp*NDT recombinante. La concentración de proteína utilizada fue 0,20 mg/mL en tampón fosfato sódico 50 mM, pH 7.0.

5.2. Cálculo del coeficiente de extinción molar de la *Dp*NDT

La determinación del coeficiente de extinción molar (ϵ) de la *Dp*NDT recombinante se ha llevado a cabo según el método de Edelhoch (Edelhoch, 1967), para lo cual se ha determinado la absorbancia de la proteína a 280 nm en solución, así como desplegada en presencia de cloruro de guanidinio 6 M. El coeficiente de extinción molar de la *Dp*NDT se ha calculado de acuerdo a la ecuación mostrada en el apartado 16.2 de Materiales y Métodos, en función de sus valores de absorbancia a 280 nm y del coeficiente de extinción molar teórico de la enzima desplegada calculado en base a su secuencia de aminoácidos que se obtuvo consultando el servidor informático de proteómica ExPASy (ProtParam) (Gasteiger y *col.*, 2003). El valor de ϵ obtenido es $\epsilon_{280} = 11.835 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y que no difiere mucho del valor teórico que es de $12.308 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

5.3. Espectroscopía de fluorescencia

Se han realizado los espectros de fluorescencia de la *Dp*NDT recombinante utilizando dos longitudes de onda de excitación ($\lambda_{\text{excitación}}$): a 295nm, donde se consigue exclusivamente la excitación de los triptófanos, y a 280nm donde se consigue la excitación de las tirosinas y los triptofanos. Los espectros de fluorescencia obtenidos muestran dos máximos de emisión, uno a 337 nm correspondiente a la excitación a 295 nm y otro a 332 nm correspondiente a la excitación a 280 nm (Figura 29).

Resultados y Discusión

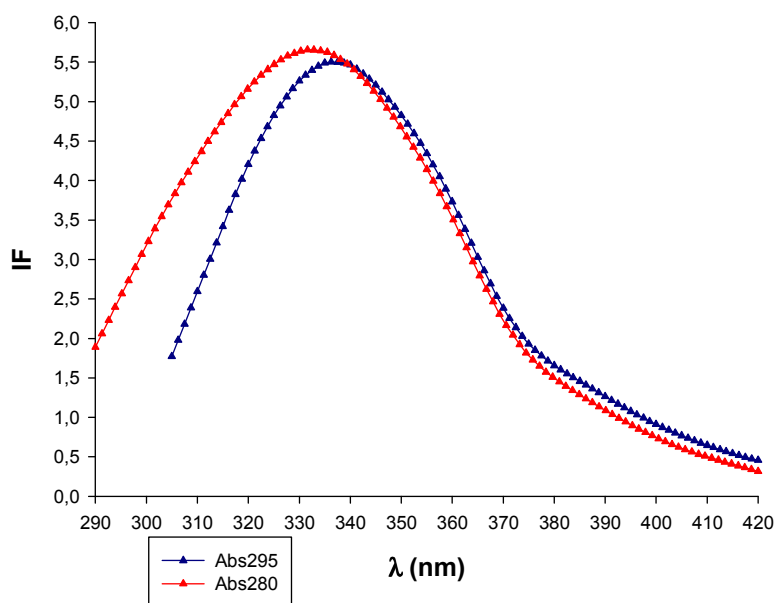


Figura 29: Espectro de fluorescencia de la *Dp*NDT, a diferentes λ_{exc} : (▲) 280nm, (▲) 295nm, a una concentración de proteína de 0.050 mg/mL en tampón fosfato potásico 50 mM, pH7.

Generalmente, la emisión de fluorescencia de una proteína, tras su excitación a 280 nm, está dominada por la fluorescencia debida al triptófano. En el caso de la *Dp*NDT, los espectros de fluorescencia obtenidos tras la excitación a 280 nm y 295 nm son ligeramente diferentes, lo que significa que no toda la fluorescencia debido a las tirosinas se encuentra desactivada por el único triptófano que contiene la enzima. En este sentido es posible que la orientación de las tirosinas no sea lo suficientemente próxima al triptófano para que se produzca la transferencia de excitación y, por tanto, la contribución al espectro no es exclusivo del triptófano. En el caso de la *Lr*NDT los espectros de fluorescencia a 280 nm y 295 nm coinciden debido a una transferencia completa de la excitación de las 11 tirosinas de esta enzima a los 4 triptófanos (Fernández-Lucas *y col.*, 2010).

Finalmente, el ligero desplazamiento del máximo de emisión hacia la zona del azul (332 nm) obtenido en el espectro de fluorescencia correspondiente al triptófano indica que la proteína está plegada.

5.4. Espectro de dicroísmo circular

Se procedió a determinar la estructura secundaria de la *Dp*NDT recombinante, mediante dicroísmo circular (DC). Para ello, se llevó a cabo el espectro de DC en el ultravioleta lejano de la *Dp*NDT recombinante (Figura 30). Podemos deducir que la proteína presenta dos mínimos de elipticidad molar a 209 y 220 nm.

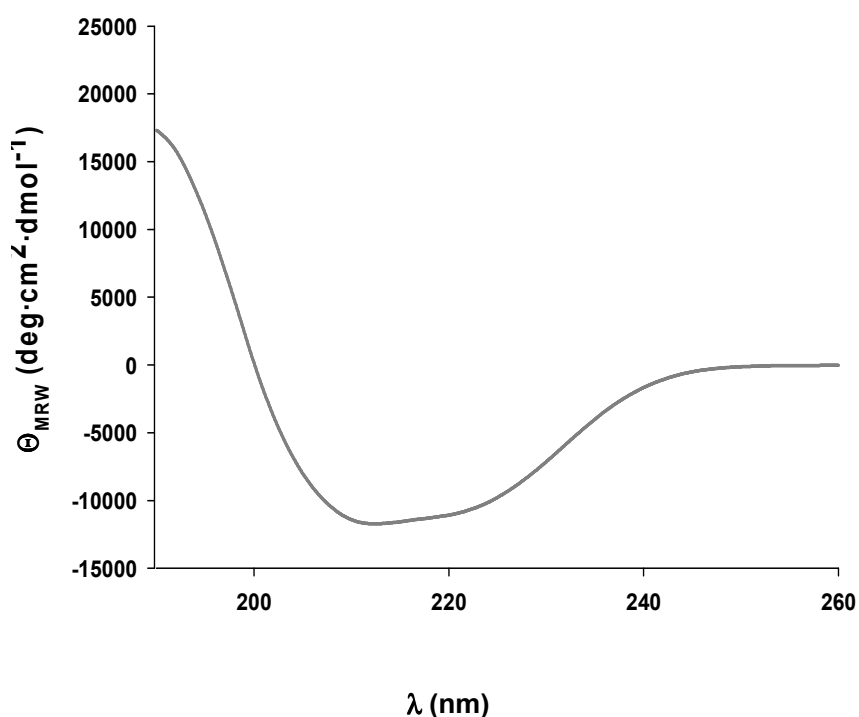


Figura 30: Espectros de dicroísmo circular de la *Dp*NDT a diferentes temperaturas en el UV-lejano. La concentración de proteína utilizada fue 0,21 mg/mL en tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7.

A partir de los datos obtenidos del espectro de dicroísmo circular se ha determinado el contenido en cada uno de los elementos de estructura secundaria: α -hélice, β lámina, antiparalela, giros β , y estructura aperiódica mediante el programa informático CDSpectra Deconvolution Version 2.1 (Dalmas y *col.*, 1994). El análisis de los datos de

Resultados y Discusión

dicroísmo circular nos muestra que la proteína presenta un 31,0 % de α -hélice, 19,9 % de β -lámina y 48,8% de estructura aperiódica. (Tabla 13).

Paralelamente, se realizó la predicción de la estructura secundaria de la enzima a partir de su estructura primaria, para lo que se han utilizado los programas DPM, DSC, GOR3, GOR1, HNNC, MLRC, PHD, Predator, SOPM, PSI PRED y JPRED, tal como se indica en el apartado 16.4 de Materiales y Métodos. Mediante los resultados obtenidos, se elaboró una predicción consenso que reflejase los datos obtenidos por los servidores informáticos. Los resultados de la predicción de estructura secundaria aparecen reflejados en la Tabla 13.

Tabla 13: Predicción de la estructura secundaria de *Dp*NDT en función del espectro de dicroísmo circular (DC) y en función de su secuencia de aminoácidos. Los resultados están reflejados en porcentaje (%).

Elemento estructural	Método de predicción	
	Basado en el espectro de DC a 20°C	Basado en la secuencia de aminoácidos
	Secuencia DC	Consenso
α -hélice	31	33,7
β -lámina	19,9	12,6
Giros- β	17,3	-
Aperiódica	31,5	59

Para la predicción de los elementos de estructura secundaria de la *Dp*NDT recombinante a partir de su secuencia de aminoácidos se han considerado únicamente sólo aquellos residuos en los que coinciden al menos el mismo elemento estructural en tres de los métodos empleados y que presentan una fiabilidad mayor de 6 según el programa, o lo que es lo mismo mayor del 85% (Saiz y col., 2002) (Figura 31). La estructura consenso obtenida tiene un contenido de 33,7 % en α -hélice, 12,6 % de β -lámina y 53,7 % de estructura aperiódica. Este resultado como es bastante similar a los datos obtenidos a partir de análisis de los datos experimentales de dicroísmo circular, 31,0 % en α -hélice, 19,9 % de β -lámina y 48,8% de estructura aperiódica.

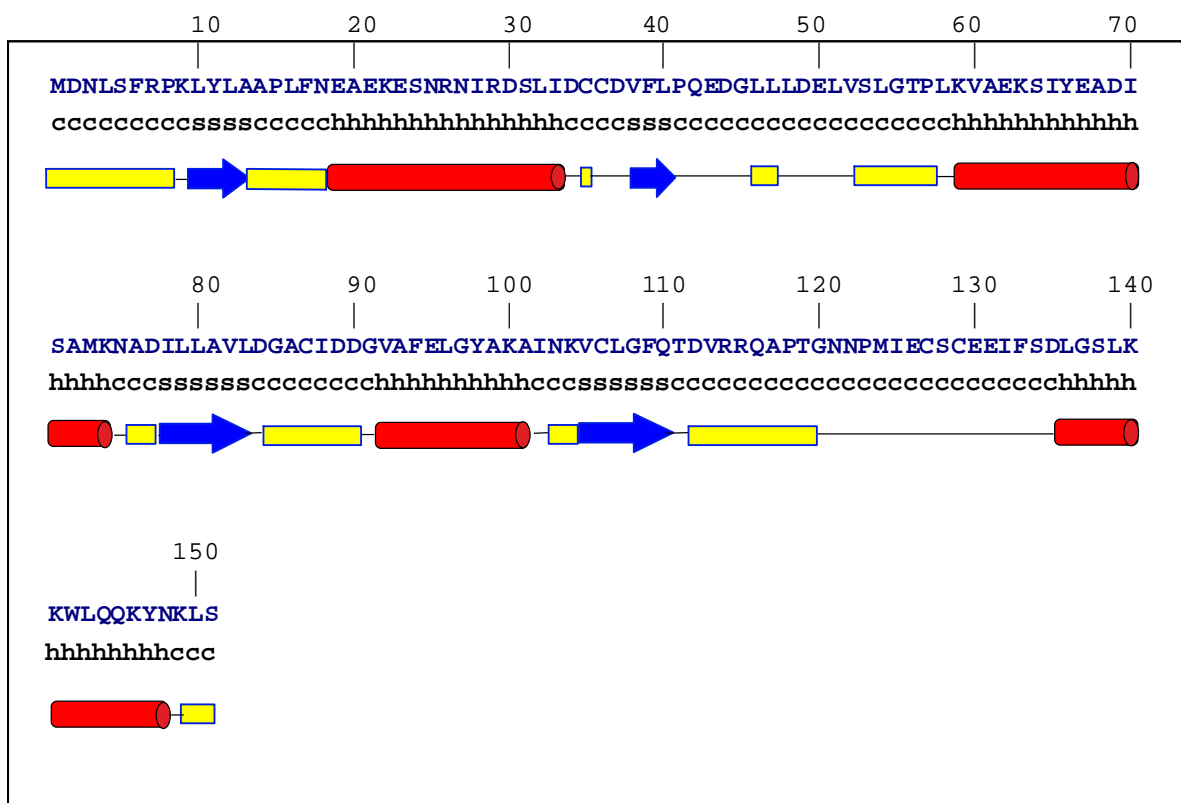


Figura 31: Predicción de estructura secundaria mediante el análisis de la secuencia de aminoácidos. Se muestran los elementos de estructura secundaria en diferentes colores: en rojo α -hélice (h), en azul β -lámina (s) y estructura aperiódica en amarillo (c). En línea continua se muestran las zonas en las que la fiabilidad de la predicción no alcanzó el 85%.

Al comparar estos resultados con los descritos hasta la fecha para otras nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasas cuya estructura tridimensional ya ha sido resuelta por difracción de rayos X, se pueden observar diferencias en el contenido de estructura secundaria: 44 % en α -hélice, 15 % de β -lámina y 41 % de estructura aperiódica para la nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa cristalizada de *Lactobacillus leichmannii* (LNDT) acomplejada con 5-metil-2'-desoxiuridina (código PDB 1F8Y), o por ejemplo 32 % en α -hélice, 18 % de β -lámina y 50 % de estructura aperiódica para la 2'-desoxirribosiltransferasa de *Lactobacillus helveticus* (LhPDT) acomplejada con bromopurina (código PDB 1S2I). Al comprobar estos resultados tan dispares entre las nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasas pertenecientes al mismo género, *Lactobacillus*, es lógico que la DpNDT muestre diferencias en su contenido en estructura secundaria comparado con el que posee LNDT y LhPDT. Si el resultado de la DpNDT se compara

Resultados y Discusión

con la única nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa cristalizada que no proviene del genero *Lactobacillus*, la 2'-desoxirribosiltransferasa de *Trypanosoma brucei* (TrNDT) cuyo contenido es 37 % en α -hélice, 13 % de β -lámina y 50 % de estructura aperiódica vemos que presenta mayor similitud.

5.5. Determinación de la temperatura de desnaturalización

La determinación de la temperatura de desnaturalización (T_m) de la DpNDT recombinante se ha determinado mediante experimentos de dicroísmo circular (DC), y calorimetría diferencial de barrido (DSC) en las condiciones descritas anteriormente (apartados 16.4 y 16.5 de Materiales y Métodos). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 32.

La curva de desnaturalización térmica obtenida mediante dicroísmo circular se puede analizar suponiendo un modelo de dos estados en el proceso de desnaturalización en el que sólo se encuentran presentes un estado inicial nativo y un estado final desnaturalizado. Este tipo de modelo se produce debido a la existencia de cooperatividad en el proceso de desplegamiento de la proteína (una vez que la molécula empieza a desplegarse se desencadena el desplegamiento rápido de todas las demás moléculas) y a la baja estabilidad de los intermedios de desplegamiento (Van Mierlo y Steensma, 2000).

Como se puede observar la enzima presenta un valor de temperatura de transición mediante dicroísmo circular (T_m) de 59 °C muy similar al obtenido mediante calorimetría diferencial de barrido (58°C).

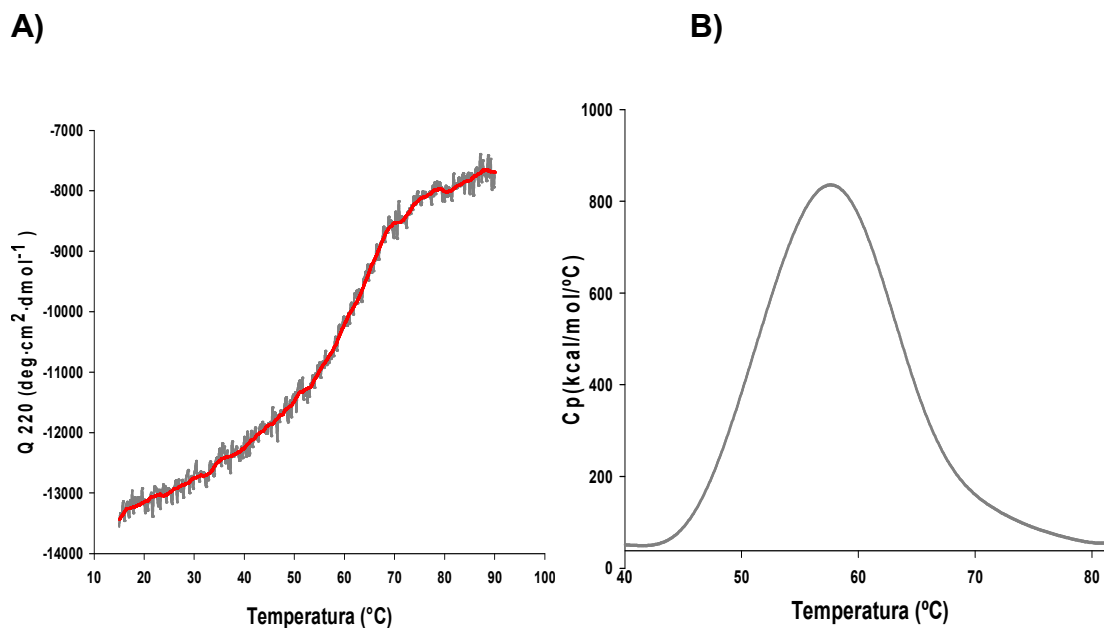


Figura 32: Temperatura de desnaturalización (T_m) de la *Dp*NDT estimada por: A) dicroísmo circular (DC) y B) calorimetría diferencial de barrido (DSC) La concentración de proteína utilizada fue 0,35 mg/ml en tampón fosfato potásico 10 mM, pH 7 en el caso de DC y de 0,2mg/mL en el caso de DSC.

En la bibliografía sólo existe un precedente de cálculo de la T_m de este tipo de enzimas y es la nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa de *Lactobacillus reuteri* (*Lr*NDT), enzima que presenta un valor aproximado de T_m de 64 °C una cifra elevada al proceder de un microorganismo mesófilo. Analogamente, la *Dp*NDT posee también un valor elevado de T_m , 58 °C, ya que la enzima procede de un microorganismo psicrófilo. Por otro lado, este valor de T_m está en concordancia con los datos obtenidos al evaluar el efecto de la temperatura en la actividad y la estabilidad de la *Dp*NDT recombinante (apartado 15.3 de Materiale y Métodos), en los que se observa que la enzima es muy inestable cuando se incuba a valores superiores a 60°C lo que concuerda con los resultados del estudio del efecto de la temperatura sobre la actividad, que disminuye paulatinamente a temperaturas superiores a 50°C, debido proceso de desnaturalización termica. Como ya se indicó al evaluar el efecto de la temperatura en la actividad y la estabilidad de la proteína (apartado 15.3 de Materiale y Métodos) se puede observar que la *Dp*NDT es una enzima con una inusual estabilidad frente a valores de temperatura elevados, más propios de enzimas procedentes de microorganismos mesófilos, lo cual indica que

Resultados y Discusión

Desulfotalea psychrophila podría ser un microorganismo psicrotolerante mas que un microorganismo psicrófilo.

5.6. Ultracentrifugación analítica.

Con el fin de determinar tanto el peso molecular como el estado de agregación de la proteína se han llevado a cabo experimentos equilibrio de sedimentación en ultracentrifuga analítica (Apartado 16.6 de Materiales y Métodos). Según el tamaño de las formas observadas a concentraciones más bajas, se deduce que la proteína es un tetrámero con un peso molecular $68.6 \pm 4,5$ kDa. Paralelamente se realizaron experimentos de velocidad de sedimentación en los que se ve que la proteína se comportó de forma homogénea. No se observa la presencia de partículas de mayor tamaño al de la proteína mayoritaria que puedan poner de manifiesto la formación de agregados. Al aplicar un coeficiente de sedimentación correspondiente a una proteína globular, el valor del mismo correspondió al equivalente a una proteína tetramérica como especie mayoritaria (16.747 Da por monómero). Los ensayos fueron normalizados al correspondiente ensayo en tampón fosfato 50 mM, pH7, 20 °C. Según a estos resultados se puede afirmar que la *Dp*NDT recombinante es una proteína homotetrámérica, donde el peso molecular por monómero es de 16.747 Da. Como vemos estos resultados difieren con los de las otras nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasas publicadas hasta la fecha, que corresponden a proteínas hexaméricas, con la excepción de la 2'-desoxirribosiltransferasa de *Lactococcus lactis* (*Llc*NDT), que es una proteína tetramérica (Miyamoto y col., 2007) como la *Dp*NDT.

5.7. Predicción de la estructura terciaria de la *Dp*NDT recombinante.

Se ha realizado el modelo de la estructura terciaria del monómero de la *Dp*NDT a partir de su secuencia de aminoácidos (Apartado 16.7 de Materiales y Métodos). Para elló se utilizó como modelo la nucleósidos 2'-desoxirribosiltransferasa cristalizada de *Lactobacillus leichmanni* acomplejada con 5-metil-2'-desoxipseudouridina (PDB 1F8Y), con la que presenta una similitud estructural del 100 % según el servidor informático HHPRED (Arnold y col., 2006) (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred/waiting/6752545>). Este servidor compara la

secuencia de aminoácidos de una proteína problema con una base de datos que incluye la secuencia de aminoácidos de proteínas con la estructura tridimensional resuelta por difracción de rayos X. Los modelos propuestos se representan en la Figura 33.

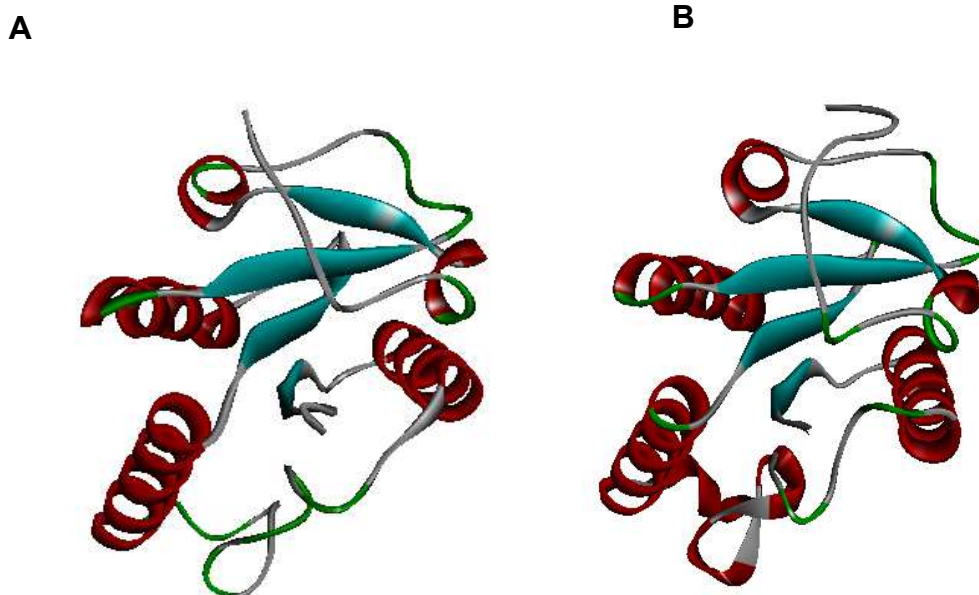


Figura 33: **A)** Estructural terciaria de la NDT recombinante de *Desulfotalea psychrophila*. **B)** Estructura de la NDT de *Lactobacillus leichmannii* (código PDB 1F8Y). En color rojo se representan las α -hélices y en azul las β -láminas.

Como se puede observar en la Figura 33 ambos modelos presentan 5 de α -hélices principales y 4 β -láminas situadas en la misma disposición y orientación espacial. El modelo presenta una similitud estructural del 100% con la NDT de *Lactobacillus leichmannii* (PDB 1F8Y) al igual que se ha observado con otras NDTs descritas (Anand y col., 2004; Fernández-Lucas y col., 2010). Así mismo, este modelo se corresponde con la estructura secundaria deducida a partir de la secuencia de aminoácidos mediante los métodos de predicción de estructura secundaria.

Resultados y Discusión

5.8. Predicción del centro activo de la *Dp*NDT recombinante

Con el fin de dilucidar el centro activo de la *Dp*NDT recombinante se llevó a cabo un alineamiento de la estructuras primaria de la *Dp*NDT con otras nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasas descritas (Figura 34) (Apartado 16.4 de Materiales y Métodos).

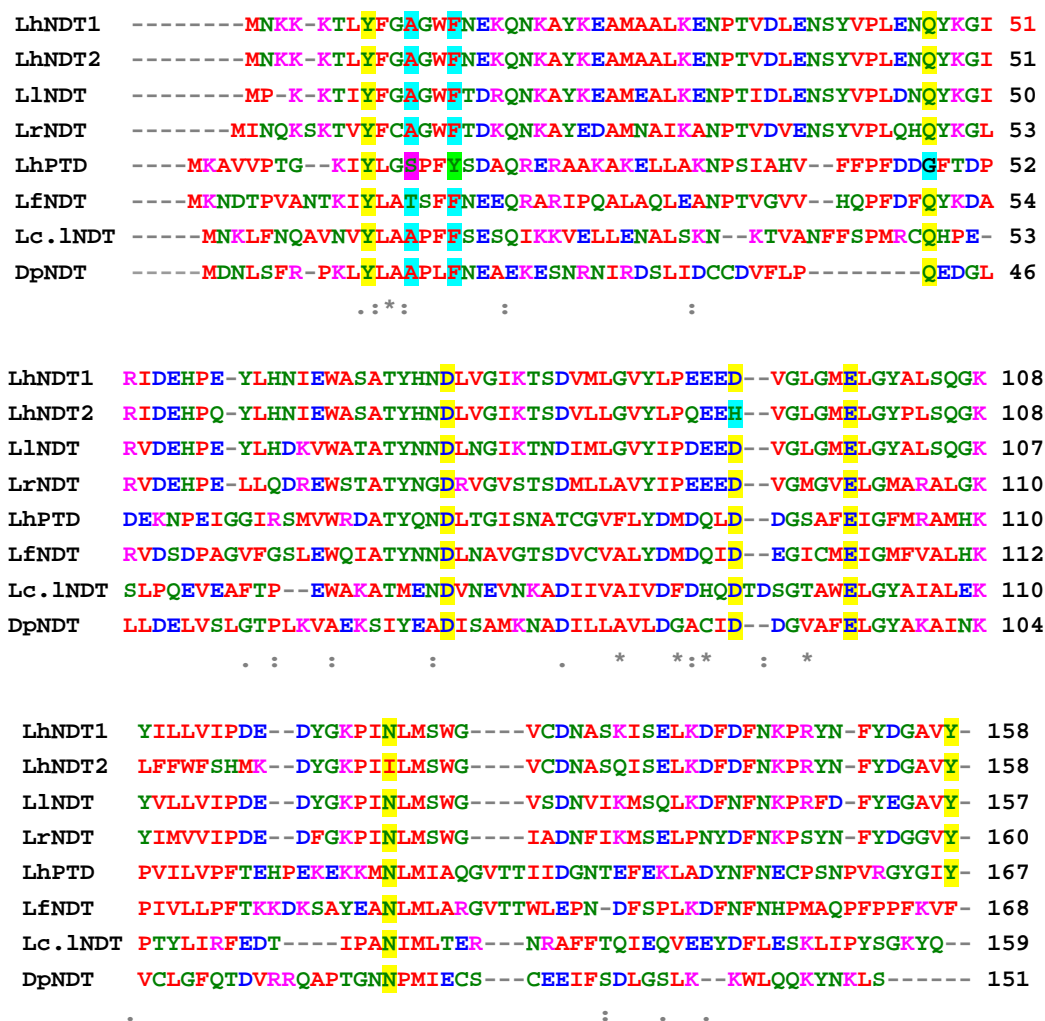


Figura 34: Alineamiento de las diferentes secuencias de aminoácidos de 2'-desoxirribosiltransferasas de *Lactobacillus* utilizando el programa CLUSTALW2. *Lh*NDT₁, *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 (Código de acceso GeneBank gi 20336339); *Lh*NDT₂, *Lactobacillus helveticus* ATCC 8018 (gi 9279801), *Ll*NDT, *Lactobacillus leichmannii* (PDB:1F8Y); *Lr*NDT, *Lactobacillus reuteri* CECT 925 (gi 5188639); *Lh*PDT *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 (gi 47168984), *Lf*NDT, *Lactobacillus fermentum* (gi 52000748), *Lc.l*NDT, *Lactococcus lactis subsp lactis* (gi 281490987) *Dp*NDT, *Desulfothalea psychrophila producida por E. coli* BL21(DE3). (*) indica residuos individuales totalmente conservados (:) indica conservación de la naturaleza de los grupos, (.) indica conservación parcial de grupos. Enmarcados en amarillo se encuentran los

aminoácidos implicados en el centro activo de NDT descritas. En el caso de *Dp*NDT corresponde a los aminoácidos Tyr 11, Gln 42, Asp 69 y 89, Glu 95 y Asn 122 (N).

Como se puede observar, la *Dp*NDT recombinante no muestra elevada identidad con las otras 2'-desoxirribosiltransferasas descritas (Figura 34), si bien se puede apreciar una elevada similitud estructural (Apartado 5.7 Resultados y Discusión). Analizando con detalle la secuencia de aminoácidos, se observa que la *Dp*NDT presenta conservados aquellos aminoácidos descritos como parte del centro activo de las 2'-desoxirribosiltransferasas (Kaminski, 2002; Porter y *col.*, 1995a; Porter y Short, 1995a; Short y *col.*, 1996) (indicados en amarillo). En el caso de la NDT de *Lactobacillus leichmannii*, los residuos Tyr 7, Asp71, Asp 91, Glu 98 y Asn 122 intervienen en el reconocimiento de la 2'-desoxirribosa siendo el Glu 98 el residuo determinante de la actividad catalítica (Kaminski, 2002; Porter y *col.*, 1995a; Porter y Short, 1995a; Short y *col.*, 1996), mientras que los residuos Glu 45, Asp 71 y Tyr 157 participan en la el reconocimiento de la base. Como se puede observar en la secuencia de aminoácidos (Figura 34), la *Dp*NDT presenta estos residuos conservados, si bien cabe destacar la ausencia de Tyr C-terminal. Este hecho podría explicar los bajos valores de actividad que presenta la *Dp*NDT, así como su baja eficacia catalítica (k_{cat}/K_M) con respecto a otras NDTs (Fernández-Lucas y *col.*, 2010; Kaminski, 2002).

Por otro lado, existen algunas diferencias entre las desoxirribosiltransferasas tipo II (NDT) y la desoxirribosiltransferasa tipo I (PDT) de *Lactobacillus helveticus*. En concreto, el residuo Tyr 17 (enmarcado en verde en la Figura 34), involucrado en el reconocimiento del grupo hidroxilo del C5', está reemplazado por fenilalanina en las enzimas NDT. El residuo Ser 14 (en rosa) está reemplazado por un residuo de alanina excepto en el caso de *Lactobacillus fermentum* donde está reemplazado por treonina (Kaminski, 2002; Porter y *col.*, 1995a; Porter y Short, 1995a; Short y *col.*, 1996).

En la Figura 35 se muestra una aproximación del posible centro activo de la *Dp*NDT recombinante, diseñado según la similitud de la secuencia de la misma con la *L*NDT, en el que se muestran los residuos mencionados anteriormente como responsables del mecanismo del centro activo. En la bibliografía está descrito que el centro activo de estas enzimas está formado por los aminoácidos de dos subunidades del homohexámero como es en el caso de la nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa de *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 y *Lactobacillus leichmannii*. De esta manera, cada monómero forma parte del centro activo de la anterior subunidad y de la posterior, y por

Resultados y Discusión

tanto, existirían 6 centros activos por homohexámero. En el caso de la *Dp*NDT, al igual que ocurre en la nucleósido 2'-desoxirribosiltransfera de *Lactococcus lactis subsp. lactis*, la estructura cuaternaria de la proteína es homotetrámerica, y por tanto, tendría 4 centros activos.

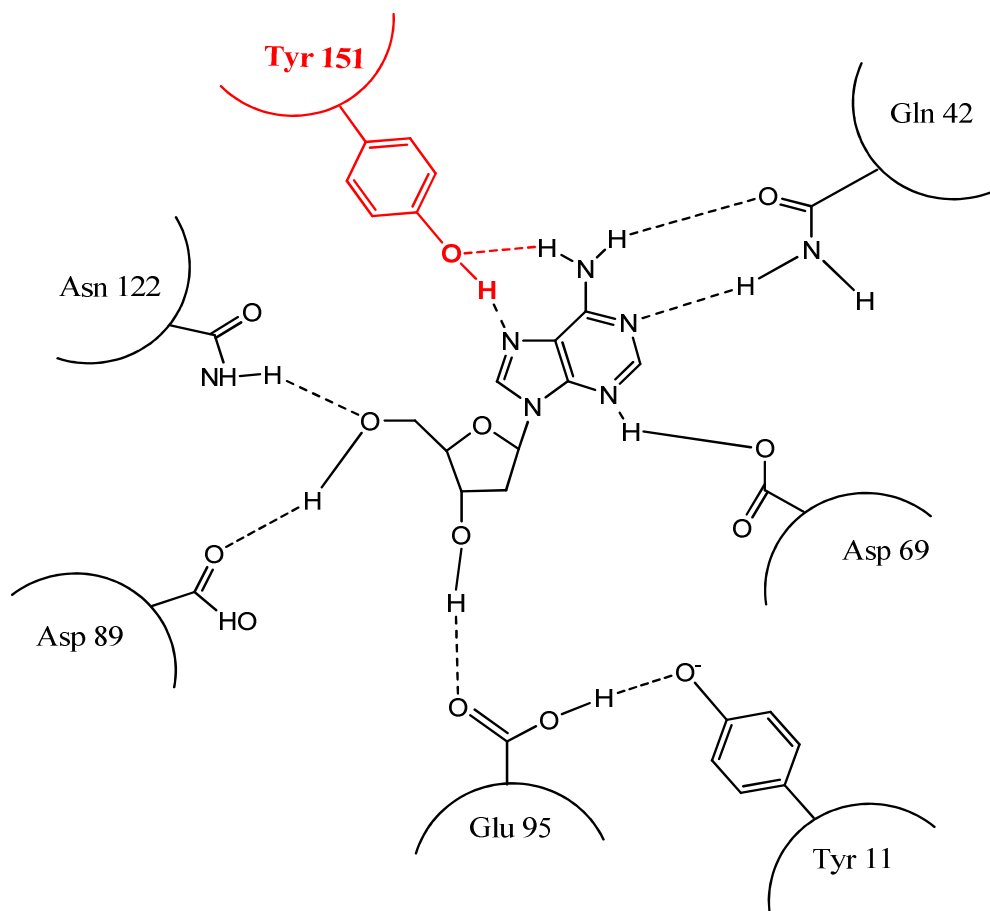


Figura 35: Aproximación del centro activo de la *Dp*NDT en el reconocimiento de la adenina. Representación gráfica de los aminoácidos de la *Dp*NDT que intervienen en el reconocimiento del sustrato en este caso adenina: Tyr 11, Gln 42, Asp 69 y 89, Glu 95 y Asn 122. En rojo se muestra el residuo Tyr 151, añadido mediante mutagénesis dirigida.

5.9. Estudio de la implicación del residuo C-terminal en la actividad de la *Dp*NDT recombinante mediante mutagénesis dirigida

Con el objetivo de profundizar en el estudio de la actividad de la *Dp*NDT recombinante, se han realizado experimentos de mutagénesis dirigida para comprobar el papel del residuo Tirosina C-terminal en la actividad de las nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasas.

Se llevó a cabo el experimento de mutagénesis dirigida del gen *ndt* utilizando los oligos Q6QBONcol y Q6AQBOTYR (Tabla 5, apartado 3 de Materiales y métodos), bajo las mismas condiciones utilizadas previamente en la amplificación del gen *ndt* (Apartado 11 de Materiales y métodos) utilizando como DNA molde el plásmido recombinante pET24*ndt*. Posteriormente se procedió a la transformación de *E. coli* BL21(DE3) con el nuevo plásmido recombinante mutado, pET24*ndt** obteniéndose el microorganismo recombinante *E. coli* BL21(pET24*ndt**) según las condiciones descritas en el apartado 7.1 de Materiales y métodos, para finalmente proceder a la sobreexpresión y purificación de la proteína mutada (*Dp*NDT*) utilizando las mismas condiciones que en el proceso llevado a cabo para la obtención de la *Dp*NDT recombinante (Figura 36).

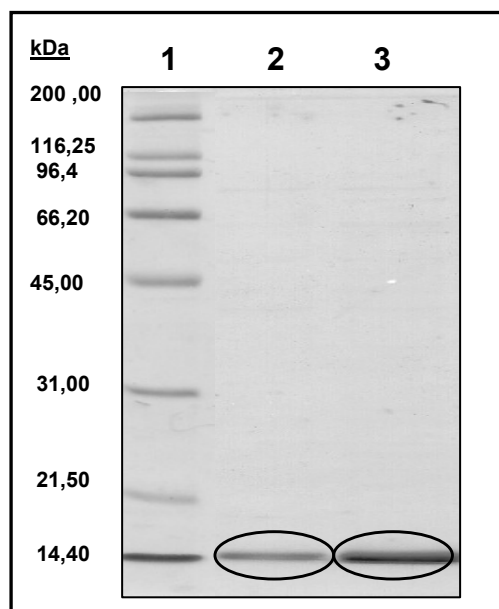


Figura 36: Electroforesis en SDS-PAGE de distintos fracciones procedentes de la purificación de proteínas. **Calle 1:** Marcadores de masa molecular conocida de BioRad; **Calle 2:** Fracciones que contienen la *Dp*NDT* recombinante pura; **Calle 3:** Fracciones que contienen la *Dp*NDT recombinante pura.

Resultados y Discusión

Finalmente una vez obtenida pura se ha procedido a determinar la actividad de la *Dp*NDT* recombinante, mediante la reacción estándar (apartado 15.1 Materiales y Métodos), observándose que el valor de actividad prácticamente triplica el descrito en el caso de la *Dp*NDT recombinante (Tabla 14).

Tabla 14. Determinación de la actividad mediante la *Dp*NDT* recombinante.

		A.E.E. (U.I./mg)	
Estos	<i>Dp</i> NDT	0,14	datos
	<i>Dp</i> NDT*	0,38	

refrendan la hipótesis descrita en el apartado anterior, de que la baja actividad mostrada por la *Dp*NDT con respecto a otras NDTs descritas (Fernández-Lucas *y col.*, 2010; Kaminski, 2002), se deba en parte a que su centro activo se observa la ausencia de un residuo de Tyr, que está presente en el reconocimiento de la base.

6. Inmovilización de la *Dp*NDT recombinante

Como se ha descrito en la introducción tanto las nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasas (NDT) como las nucleósido fosforilasas (NP) catalizan el intercambio de bases entre nucleósidos, existen diferencias en cuanto a la especificidad de sustrato de ambas. La primera y fundamental es el reconocimiento del azúcar; así, las NDTs reconocen única y exclusivamente 2'-desoxirribosa, mientras que las NPs reconocen ribo y 2'-desoxirribonucleósidos. La segunda es que, mientras que las NPs reconocen exclusivamente o bien purinas (purin nucleósido transferasas, PNP) o bien pirimidinas (pirimidin nucleósido transferasa, PyNP), las NDTs pueden reconocer indistintamente ambos tipos de bases. Por ello, en el caso de las nucleósido fosforilasas (PNP y PyNP) la síntesis de nucleósidos púricos a partir de nucleósidos pirimidínicos o viceversa, requiere del uso de 2 enzimas, como se muestra en la figura 37, mientras que en el caso de las NDT sólo requiere el uso de una enzima.

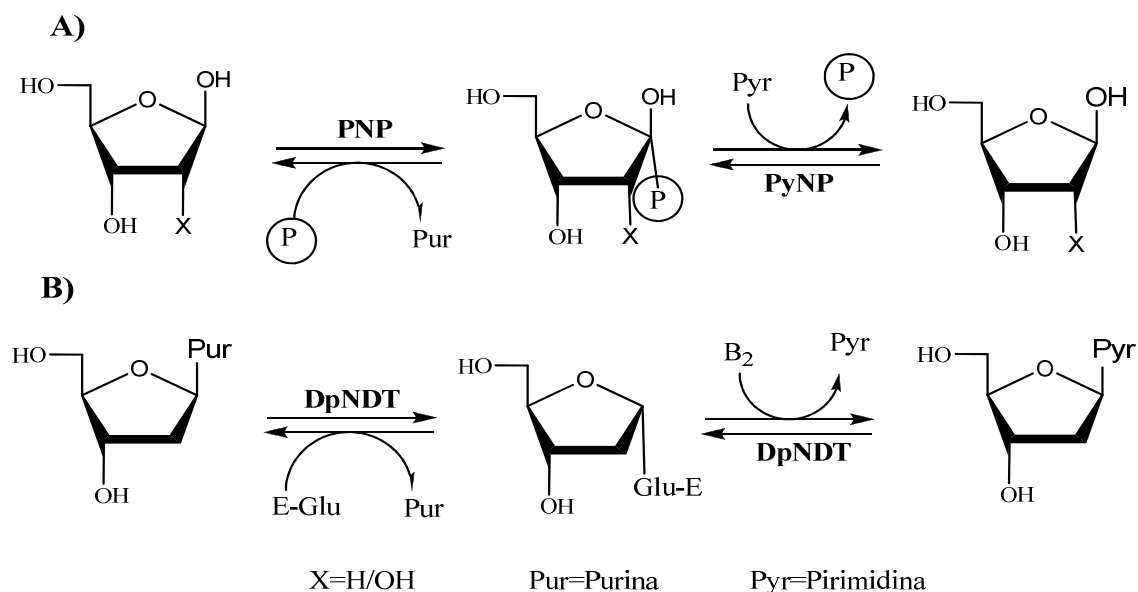


Figura 37: Síntesis de nucleósidos catalizada por: **A)** nucleósido fosforilasas y **B)** nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasas

Esto genera problemas a la hora de diseñar un proceso de escalado, ya que es requisito indispensable la inmovilización, para su posterior reutilización, con vistas a obtener un biocatalizador que opere de manera eficaz el mayor número posible de ciclos. En este sentido la inmovilización de las nucleósido fosforilasas resulta menos eficaz que la inmovilización de las nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasas, ya que en numerosas ocasiones requiere de la coimovilización de ambos tipos de nucleósido fosforilasas (PNP y PyNP), originándose problemas con respecto a la homogeneidad del biocatalizador obtenido (Fernández-Lucas y *col.*, 2011A) (Figura 38). Esto conlleva el problema añadido, de que el proceso de síntesis es menos eficaz y como consecuencia el escalado a nivel industrial se complica, aumentando el coste final del proceso. Por el contrario, en el caso de las nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasas al tratarse de una única enzima, el proceso de inmovilización es más efectivo, obteniéndose un biocatalizador homogéneo con lo que se consigue evitar todos los problemas de heterogeneidad del biocatalizador, obteniéndose un biocatalizador mucho más eficaz, sencillo y con costes menores.

Resultados y Discusión

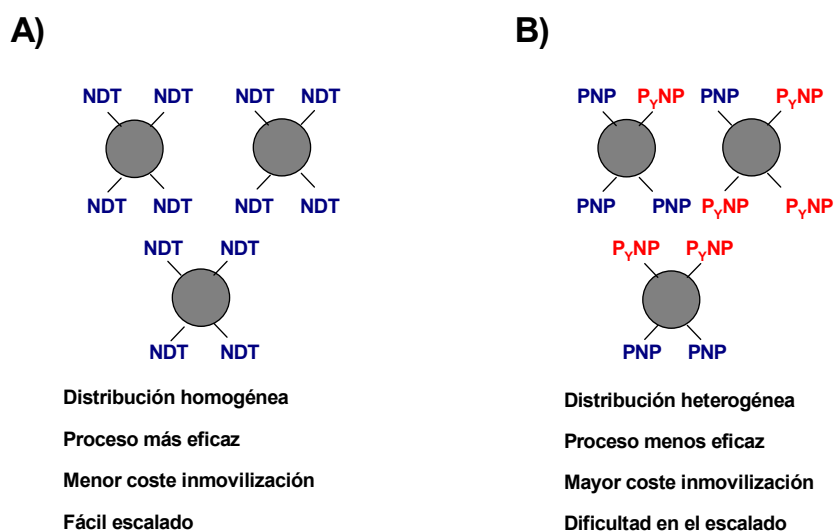


Figura 38: Representación gráfica del proceso de Inmovilización de: **A)** nucleósido fosforilasas, **B)** nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasas.

Se ha llevado a cabo la inmovilización de la *Dp*NDT recombinante en soportes biodegradables constituidos por Fe_3O_4 (magnetita) atrapada en quitosano. Dicho quitosano es posteriormente activado mediante glutaraldehído, un agente entrecruzante que favorece la formación de enlaces covalentes de tipo base de Schiff entre los grupos activados del soporte y los grupos ϵ -amino de las lisinas situadas en la superficie de la enzima.

Para ello se probaron diferentes tipos de quitosano a diferentes concentraciones de epíclorhidrina (2 y 5 %) y de Fe_3O_4 (0, 25 y 50 %) con el fin de encontrar un derivado inmovilizado que tuviera la máxima carga posible de biocatalizador y la mayor actividad posible. El ensayo de actividad elegido fue la síntesis de 2'-desoxiadenosina a partir de 2'-desoxiuridina y adenina, en las condiciones descritas en el apartado 17.3 de Materiales y Métodos. Como se puede observar en la Tabla 15, a medida que aumentaba la concentración de epíclorhidrina se observa un descenso en la actividad del biocatalizador, debido a un mayor grado de entrecruzamiento que dificulta la posible difusión de los sustratos a la enzima inmovilizada.

Tabla 15: Estudios de actividad de los diferentes derivados inmovilizados

Reacción ^a	% ^b
Quitosano-EPI 2%	100
Quitosano-EPI 5%	70
Quitosano-EPI 2%-Fe ₃ O ₄ 25%	100
Quitosano-EPI 5%-Fe ₃ O ₄ 25%	80
Quitosano-EPI 2%-Fe ₃ O ₄ 50%	100
Quitosano-EPI 5%-Fe ₃ O ₄ 50%	70

^a Condiciones reacción: [dUri]=[A]=10 mM en MES 50 mM, pH = 6,5 a 50 °C, t= 20 min, 350 r.p.m.

^b Actividad relativa al soporte que presenta la máxima actividad

A partir de estos resultados se eligieron los soportes de quitosano con Fe₃O₄ que presentasen un menor grado de reticulación, es decir menor concentración de epíclorhidrina, para continuar con la optimización del proceso de inmovilización con el fin de aumentar tanto la carga enzimática del derivado inmovilizado como su actividad retenida (o porcentaje de actividad que presenta la enzima inmovilizada con respecto a la misma cantidad en solución). (Tabla 16).

Tabla 16: Estudios de optimización de carga del biocatalizador en quitosano reticulado con epíclorhidrina a diferentes concentraciones de Fe₃O₄ (25 y 50 %).

Reacción	µg _{prot} añadida	% inmov	Actividad (µmol/min)	A.E.E. (U.I./mg)	A.E.E. _{der} (U.I./g _{der})	Activ. Retenida %
Enzima libre^a	14.3	-	1.7×10^{-3}	0.120	-	-
	28.6	-	3.4×10^{-3}	0.120	-	-
Fe₃O₄ 25%^b	14.3	100	1.0×10^{-3}	0.070	0.06	58
	28.6	94	2.1×10^{-3}	0.073	0.12	61
Fe₃O₄ 50%^b	14.3	91	1.2×10^{-3}	0.084	0.07	70
	28.6	85	2.4×10^{-3}	0.085	0.14	71

^a Condiciones reacción: [dUri]=[A]=10 mM en MES 50 mM, pH = 6,5 a 50 °C, t= 20 min, 30 r.p.m.

^b Condiciones reacción: [dUri]=[A]=10 mM en MES 50 mM, pH = 6,5 a 50 °C, t= 20 min, 350 r.p.m.

Resultados y Discusión

Como se puede observar en la tabla 16 se obtuvieron los mejores resultados con el derivado obtenido en el soporte preparado con 2% de epicloridrina y 50% de magnetita (**QDpNDT**), que fue el elegido para continuar con su caracterización funcional. Se ha obtenido un biocatalizador con una carga de **0.14 U.I./g** biocatalizador y con una **actividad retenida del 71 %** con respecto a la misma cantidad de enzima pura en solución. Esta disminución de actividad en comparación con la enzima libre podría ser debido a efectos de difusión de sustrato hasta el centro activo de la enzima inmovilizada sobre el soporte.

6.1. Caracterización funcional de la *Dp*NDT inmovilizada

Respecto a la caracterización funcional del derivado inmovilizado QDpNDT, se han realizado estudios de actividad de la enzima en función del pH y la temperatura, así como estudios de desactivación del mismo a diferentes temperaturas.

6.1.1. Estudio de la influencia del pH sobre la actividad de la *Dp*NDT inmovilizada

Con el fin de conocer el pH óptimo de ensayo del derivado inmovilizado QDpNDT, se determinó la actividad a distintos valores de pH comprendidos entre 4 y 12. Al igual que en la determinación de la actividad de la enzima libre (apartado 4.1 Resultados y Discusión), el ensayo de actividad consistió en la síntesis de timidina a partir 2'-desoxiuridina y timina, por las razones descritas anteriormente. Como se muestra en la Figura 39, el derivado QDpNDT mantiene prácticamente la máxima actividad (> 90%) en el intervalo de pH comprendido entre 6 y 9, observándose un descenso notable de la actividad a valores de pH fuera de ese intervalo. Estos valores concuerdan con lo descrito para la enzima libre, la cual presenta máxima actividad (90-100 %) en el intervalo de pH comprendido entre 4 y 11. Por otro parte, se puede indicar que, la tolerancia a valores de pH básicos es ligeramente inferior en el caso de la enzima inmovilizada en comparación con la enzima libre en solución.

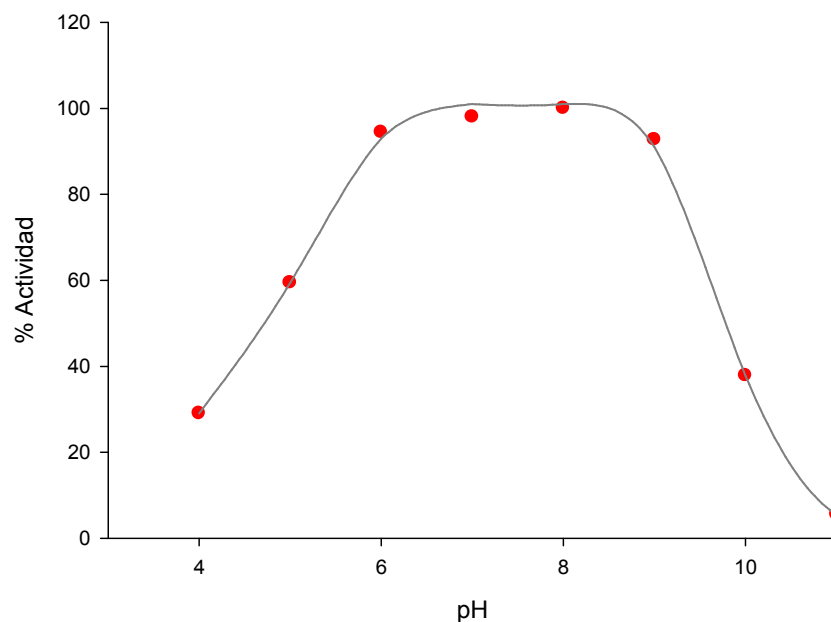


Figura 39: Efecto del pH sobre la actividad del derivado inmovilizado QDsNDT . Condiciones de reacción: 24.31 μg de enzima inmovilizada se incubaron a diferentes valores de pH en un volumen de reacción de 100 μl que contenía $[\text{dUri}] = [\text{T}] = 10 \text{ mM}$, 50 $^{\circ}\text{C}$ durante 30 min y 350 r.p.m.

6.1.2. Estudio de la influencia de la temperatura sobre la actividad y estabilidad de la *Dp*NDT inmovilizada

El estudio de la influencia de la temperatura sobre la actividad de la *Dp*NDT inmovilizada se ha llevado a cabo mediante la determinación de la actividad enzimática del derivado *QDp*NDT en la síntesis de 2'-desoxiadenosina a partir de 2'-desoxiuridina y adenina en un intervalo de temperatura comprendido entre 20 $^{\circ}\text{C}$ y 90 $^{\circ}\text{C}$ (tal como se describe en el apartado 17.4 de Materiales y Métodos). La Figura 40, muestra que el derivado *QDp*NDT presenta un máximo de actividad claramente definido en el intervalo de temperatura comprendido entre 50 y 60 $^{\circ}\text{C}$, si bien la actividad es superior al 80% en el intervalo comprendido entre 40 y 70 $^{\circ}\text{C}$. Aunque estos resultados son similares a la enzima libre donde su máximo de actividad se encontraba a 50 $^{\circ}\text{C}$, en el caso de la enzima inmovilizada no hay un máximo definido. Este hecho indica que el derivado inmovilizado es operativo en un intervalo más amplio de temperaturas que la enzima libre, debido a la estabilización del biocatalizador por efecto de la unión al soporte.

Resultados y Discusión

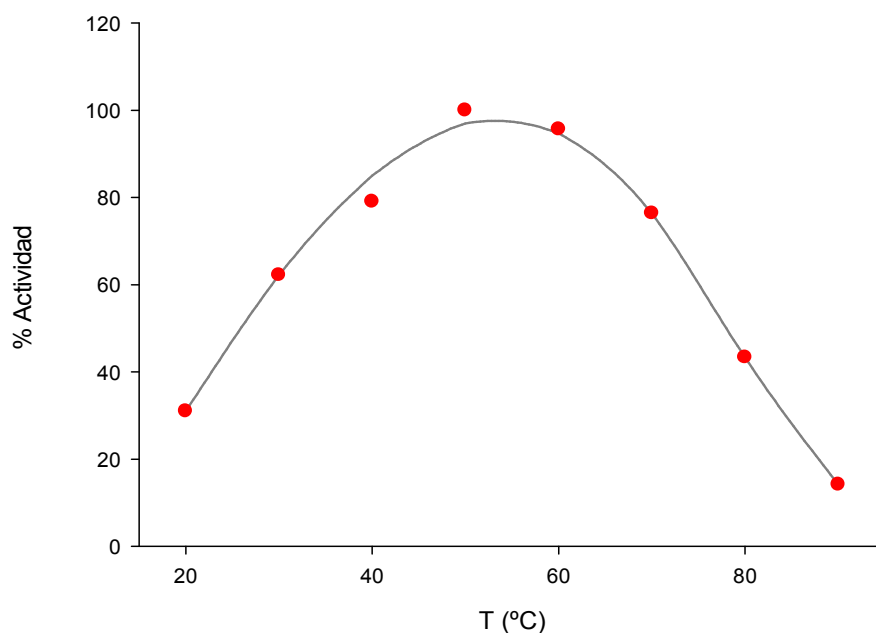


Figura 40: Efecto de la temperatura sobre la actividad en el derivado inmovilizado QDsNDT. Condiciones de reacción: 24.31 μg de enzima inmovilizada se incubaron a diferentes temperaturas en un volumen de reacción de 100 μl que contenía $[\text{dUri}] = [\text{Tim}] = 10 \text{ mM}$ en tampón MES 50 mM, pH 6,5, durante 30 min y 350 r.p.m.

7. Estudios de termoinactivación de la *Dp*NDT libre e inmovilizada

Se ha estudiado la termoinactivación de la *Dp*NDT libre e inmovilizada a diferentes valores de T y pH. Para ello diferentes alícuotas de enzima tanto libre como inmovilizada, se incubaron a 40, 50 y 60 °C (Apartado 18 de Materiales y Métodos) durante distintos tiempos valores de incubación. Una vez transcurridos dichos tiempos, las muestras se introdujeron en hielo y se determinó la actividad según el ensayo de actividad estandar (Apartado 15 de Materiales y métodos). Los resultados obtenidos aparecen reflejados en la Figura 41.

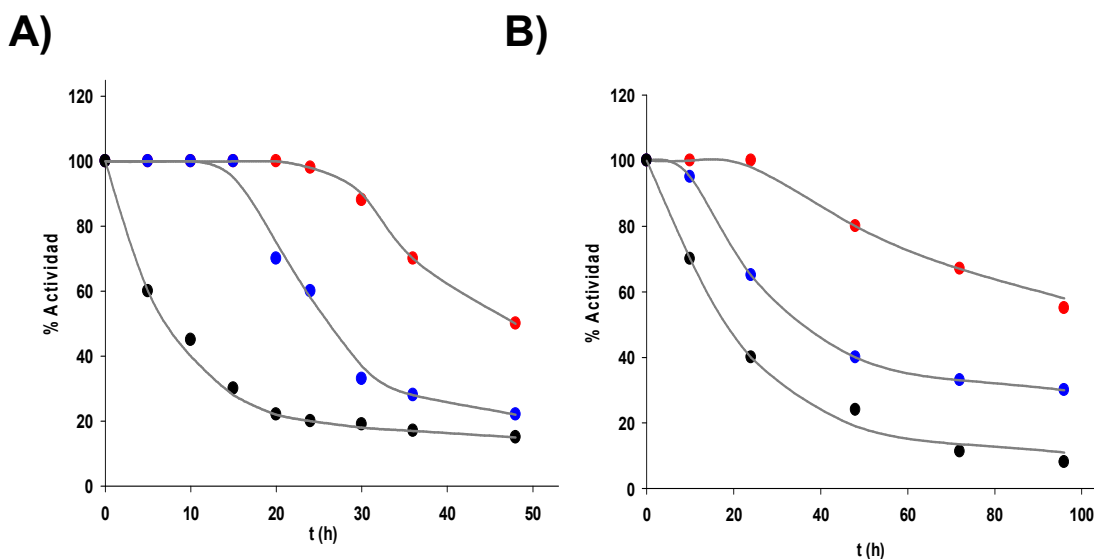
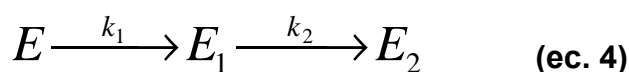


Figura 41: Estudios de desactivación con la temperatura de: A) la *Dp*NDT libre, B) el derivado inmovilizado *QDp*NDT. Temperaturas de incubación: ● 40 °C, ● 50 °C y ● 60 °C.

Como se puede observar, las curvas de desactivación de la *Dp*NDT libre e inmovilizada incluyen un tiempo o periodo “de gracia” (t_g), en el cual la actividad no sufre disminución alguna. A 40 °C este valor de t_g es de 20 horas para la *Dp*NDT soluble, mientras que e el caso del derivado *QDp*NDT es de 24 horas. Por otro lado, a 50 °C tanto la *Dp*NDT soluble como derivado *QDp*NDT presentan un valor de t_g de 10 horas. Transcurrido este periodo de gracia, la enzima tanto en su forma soluble como el biocatalizador inmovilizado, se inactiva siguiendo un patron de inactivación exponencial simple. Este patrón de inactivación tan especial se ajusta al modelo propuesto por Sadana (Sadana, 1982) que incluye diferentes estados enzimáticos (E_1, E_2, \dots, E_d) donde k_1, k_2, \dots, k_d son los coeficientes de inactivación, tal y como se indica en la ecuación 4:



Según este modelo, la actividad del estado intermedio (E_1) es la misma que la del estado inicial (E), tanto en la enzima libre como en la inmovilizada. En el estado final (E_d), la enzima ha perdido la totalidad de su actividad. Los resultados de las Figuras 41 A) y 41 B) han permitido determinar las constantes de desactivación térmica tanto de la *Dp*NDT soluble como del derivado *QDp*NDT a 40 y 50 °C, teniendo en cuenta que la constante k_2 puede ser calculada a partir del periodo de gracia ($t_g = 1/k_2$) y que la

Resultados y Discusión

constante k_1 puede ser obtenida de la representación semilogarítmica de la actividad frente al tiempo una vez finalizado el periodo de gracia (Sadana, 1982). Asimismo los tiempos de vida media ($t_{1/2}$) a 40 y 50 °C se han calculado añadiendo al periodo de gracia el tiempo en el cual la enzima ha perdido el 50 % de su actividad. (Tabla 17).

Tabla 17: Parámetros de la termoinactivación de la *Dp*NDT soluble e inmovilizada (*QDp*NDT).

	40 °C				50 °C				60 °C	
	k_1 (h ⁻¹)	k_2 (h ⁻¹)	t_g (h)	$t_{1/2}$ (h)	k_1 (h ⁻¹)	K_2 (h ⁻¹)	t_g (h)	$t_{1/2}$ (h)	K_d (h ⁻¹)	$t_{1/2}$ (h)
<i>Dp</i> NDT ^a	0,024	0,050	20	48,5	0,061	0,1	10	21,4	0,064	10,8
<i>QDp</i> NDT ^b	0,083	0,042	24	107,5	0,018	0,1	10	48,5	0,032	21,7

^a Condiciones reacción: [dUri]=[A]=10 mM en MES 50 mM, pH = 6,5 a 50 °C, t= 20 min, 30 r.p.m.

^b Condiciones reacción: [dUri]=[A]=10 mM en MES 50 mM, pH = 6,5 a 50 °C, t= 20 min, 350 r.p.m.

A tenor de los resultados, la inmovilización sobre las partículas magnéticas de quitosano estabiliza de forma significativa la *Dp*NDT recombinante a 40 °C, incrementando ligeramente el periodo de gracia de 20 a 24 horas, así como la vida media del biocatalizador ($t_{1/2}$). En este sentido el valor de ($t_{1/2}$) del derivado *QDp*NDT a 40 °C es de 107,5 horas, mientras que la vida media de la *Dp*NDT soluble es de 48,5 horas. De forma análoga, se observa una estabilización menos acusada a 50 °C donde el periodo de gracia muestra un valor de aproximado de 10 h tanto en la enzima soluble, como en la inmovilizada. Sin embargo en la segunda fase del proceso, la enzima inmovilizada se desactiva más lentamente que la enzima libre. De hecho, la vida media del derivado *QDp*NDT a 50 °C es de 48,5 horas mientras que la de la enzima libre es de 21,4 horas.

Sin embargo el perfil de termoinactivación a 60 °C tanto del derivado inmovilizado como de la enzima libre se ajusta en ambos casos a una inactivación exponencial simple. En este caso, el patrón de desactivación incluye solo dos estados enzimáticos (E y E_d), donde k_d es el coeficiente de desactivación como se indica en la ecuación 5.



El coeficiente de desactivación a 60 °C de la enzima inmovilizada ($k_d= 0,032 \text{ h}^{-1}$) es ligeramente inferior que el presentado por la enzima libre ($k_d= 0,044 \text{ h}^{-1}$), indicando que

el proceso de inmovilización es capaz de estabilizar térmicamente a la *Dp*NDT incluso a valores de temperatura bastante elevados, incrementando el valor de $t_{1/2}$ de la *Dp*NDT (10,8 h), hasta prácticamente el doble (21,7 h). Este hecho parece sugerir que la enzima podría encontrarse unida covalentemente al soporte a través de varios puntos de unión.

Estos resultados indican que el proceso de inmovilización incrementa la estabilidad térmica de la enzima permitiendo la incubación del derivado inmovilizado a las temperaturas mencionadas durante un período de tiempo mucho más prolongado que en el caso de la enzima libre.

8. Síntesis de nucleósidos catalizada por la *Dp*NDT recombinante libre e inmovilizada

Como se ha indicado anteriormente, en la actualidad los nucleósidos modificados son moléculas de gran interés en la industria farmacéutica ya que presentan actividad antiviral y antitumoral, y también pueden ser utilizados como sustratos de partida en la síntesis de oligonucleótidos antisentido (Robak *y col.*, 2010; De Clerq, 2010). Los efectos adversos de los análogos de nucleósidos disponibles en la actualidad así como la aparición de resistencias debido a su utilización prolongada, ha suscitado el interés por el desarrollo de nuevos análogos de nucleósidos con propiedades terapéuticas mejoradas. Los más conocidos son el aciclovir, el AZT, la ddI, la ribavirina, etc. (Elion *y col.*, 1977; Garg *y col.*, 1999; Keller *y col.*, 1981; Panchagnula *y Patel*, 1997; Schmid *y col.*, 2002; Utagawa, 1999), pero cada vez van surgiendo nuevos análogos de nucleósidos con aplicaciones terapéuticas como por ej. la 5-aza-2'-desoxicitidina (Decitabina), la 5-iodo-2'-desoxiuridina (idoxuridina), Trifluorotimidina (trifluridina) (Christman, 2002; Lantry *y col.*; 1999 Seth *y col.*, 2005; Brady *y col.*, 2004).

La síntesis convencional de este tipo de productos requiere numerosos pasos, entre los que se incluyen etapas de protección-desprotección de grupos funcionales, con lo que se disminuye el rendimiento global del proceso. Además en el proceso se producen mezclas de isómeros configuracionales y subproductos de reacción, con lo cual una vez finalizado el proceso de síntesis se hace necesario un proceso complejo de purificación

Resultados y Discusión

y refinamiento del producto. Si a todo ello le añadimos, que este tipo de síntesis se suelen llevar a cabo mediante catalizadores químicos y en presencia de disolventes orgánicos, explica en parte la dificultad que se encuentra para la implementación industrial de estos procesos. A modo de ejemplo de este tipo de estrategias síntesis química, se muestra en la Figura 42 la síntesis de Decitabina mediante estrategias de síntesis química (Henschke y col., 2010).

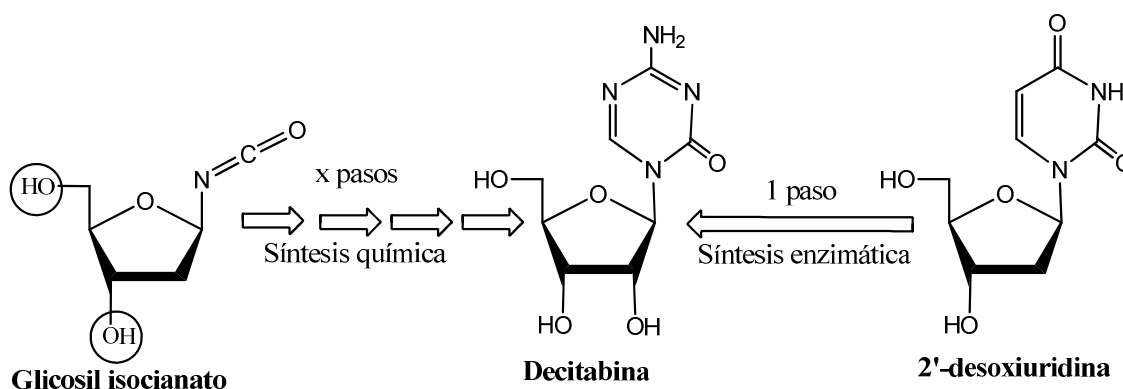


Figura 42: Síntesis de la Decitabina llevada a cabo mediante diferentes estrategias de síntesis

Frente a este tipo de síntesis química convencional, es cada vez más común hoy en día el uso de otro tipo de estrategias de síntesis que incorporan en todos o alguno de sus pasos el uso de enzimas. En este sentido, en el presente trabajo se ha abordado la síntesis enzimática de nucleósidos naturales y no naturales, entre los que se incluye la decitabina, mediante el uso de la *DpNDT*, tanto libre como inmovilizada, en lo que se conoce como síntesis “One-pot, one-step” (es decir síntesis en un recipiente, en solo paso).

Asimismo, una vez caracterizada e inmovilizada la *DpNDT* recombinante, con el objetivo de estudiar su posible aplicación industrial en la síntesis de nucleósidos naturales y no naturales, se han llevado a cabo estudios de especificidad de sustrato, mediante diferentes tipos de reacciones, tanto con la enzima libre e inmovilizada utilizando como sustratos nucleósidos y bases, tanto naturales como no naturales.

8.1. Síntesis de nucleósidos naturales

Se ha llevado a cabo la determinación de la especificidad de sustrato de la *Dp*NDT recombinante libre e inmovilizada con nucleósidos y bases naturales. Los resultados obtenidos se muestran en la Tablas 18 y 19

Como se observa en la Tabla 18, la enzima soluble reconoce los distintos nucleósidos donadores con el siguiente orden de preferencia que se traduce en una mayor actividad específica: Tyd ≈ dUri > dIno >>> dAdo > dCit; y como mejor aceptor T ≈ U ≈ H > A >>> C, lo cual contrasta con los datos que se conocen hasta ahora en la especificidad de sustrato de este tipo de enzimas (Fernández-Lucas y col., 2010; Kaminski, 2002). Como se puede observar la *Dp*NDT presenta en general una mayor preferencia por las bases pirimidínicas, con la excepción de la citosina. Este comportamiento podría ser explicado en parte por la ausencia de la Tyr 160 presente en *Lr*NDT, que es esencial en el reconocimiento de la base. Su ausencia explicaría la razón de este comportamiento anómalo de la *Dp*NDT respecto a otras descritas (Fernández-Lucas y col., 2010; Kaminski, 2002; Porter y col., 1995a; Porter y Short, 1995b; Short y col., 1996), dado que esta enzima es capaz de catalizar muy eficientemente la hidrólisis del nucleósido detectándose la base correspondiente en elevados rendimientos, no sucediendo lo mismo con la formación del nuevo nucleósido.

Tabla 18: Reacciones de síntesis de nucleósidos naturales catalizada por la *Dp*NDT recombinante libre ^a.

Actividad específica (µmoles convertidos/min/mg enz) ^a					
Nucleósido Base	dUri	Tyd	dAdo	dIno	dCit
Uracilo	-	0,73	0,07	0,11	0,02
Timina	0,70	-	0,02	0,10	0,01
Adenina	0,14	0,21	-	0,11	0,02
Hipoxantina	0,67	0,72	0,02	-	0,01
Citosina	0,06	0,04	0,02	0,04	-

^a Condiciones de reacción: [Nucleósido]=[Base] = 10 mM en tampón MES 50 mM, pH 6,5, a 50 °C, 20 min y 30 r.p.m.. Se utilizaron 14,3 µg de proteína en un volumen de ensayo de 40 µL.

Resultados y Discusión

Como podemos ver en la Tabla 19, la enzima inmovilizada mantiene la especificidad de sustrato que presentaba la *Dp*NDT libre, manteniendo el orden de preferencia del nucleósido donador Tyd \approx dUri > dlno >>> dAdo > dCit. Sin embargo, su especificidad en cuanto al aceptor es diferente, presentando el siguiente orden de preferencia C > A > T \approx U > H.

Tabla 19: Reacciones de síntesis de nucleósidos naturales^a catalizada por la *Dp*NDT recombinante inmovilizada.

Reacción ^a	Base	% ^b	U.I. ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	A.E.E. (U.I./ mg_{prot})	A.E.E. _{der} (U.I./ g_{der})
dUri	T	3,0	1.0×10^{-3}	36.0×10^{-3}	0.06
	A	7,4	2.4×10^{-3}	85.0×10^{-3}	0.14
	H	0,5	0.2×10^{-3}	6.0×10^{-3}	0.03
	C	15	5.0×10^{-3}	150.0×10^{-3}	0.90
Tyd	U	5.0	1.7×10^{-3}	60.0×10^{-3}	0.10
	A	14.5	4.8×10^{-3}	170.0×10^{-3}	0.29
	H	0.5	0.2×10^{-3}	6.0×10^{-3}	0.01
	C	14.0	4.7×10^{-3}	165.0×10^{-3}	0.28
dAdo	U	0.8	0.3×10^{-3}	10.0×10^{-3}	0.02
	T	0.5	0.2×10^{-3}	6.0×10^{-3}	0.01
	H	2.0	0.8×10^{-3}	30.0×10^{-3}	0.05
	C	1.3	0.4×10^{-3}	12.0×10^{-3}	0.02
dlno	U	3.0	1.0×10^{-3}	36.0×10^{-3}	0.06
	T	2.3	0.8×10^{-3}	27.0×10^{-3}	0.05
	A	7.0	2.3×10^{-3}	84.0×10^{-3}	0.14
	C	0.3	0.1×10^{-3}	3.0×10^{-3}	0.01
dCit	U	0.1	0.3×10^{-4}	1.7×10^{-3}	0.003
	T	0.1	0.3×10^{-4}	1.7×10^{-3}	0.003
	A	0.3	0.1×10^{-3}	3.5×10^{-3}	0.01
	H	0.20	0.6×10^{-4}	1.7×10^{-3}	0.006

^a Condiciones de reacción: [Nucleósido + Base] = 10 mM en tampón MES pH 6,5 50 mM, 50 °C, 30 min, 350 r.p.m. Se utilizaron 24.3 μg de proteína en un volumen de ensayo de 100 μl .

^b Rendimiento nucleósido obtenido sobre el 100 % (10 mM).

8.2. Síntesis de nucleósidos naturales utilizando bases poco solubles en disolventes acuosos.

Como se ha demostrado en este trabajo la *Dp*NDT libre y la inmovilizada presentan elevadas actividades en condiciones alcalinas (Figuras 25 y 39). Por esta razón, se consideró la utilización de guanina y xantina como bases aceptores en la síntesis de nucleósidos. Estas bases presentan la peculiaridad de su baja solubilidad en disolventes acuosos a pH neutros. En la bibliografía aparecen algunos ejemplos que describen la dificultad del proceso (Okuyama y col., 2003; Yokozeki y Tsuji, 2000). En este sentido, la adición de disolventes orgánicos miscibles con disolventes acuosos para tratar de incrementar la solubilidad de este tipo de compuestos han permitido mejorar la actividad enzimática de las NDTs (Fernández-Lucas y col., 2011a; Muller y col., 1996; Yokozeki y Tsuji, 2000), la concentración de disolvente requerida puede afectar a la estabilidad de la enzima significativamente. Por esta razón y aprovechando el peculiar comportamiento de esta enzima frente al pH en comparación con otras NDTs descritas, se han utilizado tanto la *Dp*NDT libre como inmovilizada en la síntesis de este tipo de nucleósidos. Para ello se prepararon las soluciones de los reactivos pH alcalino con el fin de facilitar su completa disolución. Los resultados se muestran en la Tabla 20.

Tabla 20: Reacciones de síntesis de nucleósidos naturales catalizada por la *Dp*NDT recombinante libre empleando guanina y xantina como bases.

Actividad específica (µmoles convertidos/min/mg enzima) ^a					
Nucleósido	dUri	Tyd	dAdo	dlno	DCit
Base					
Guanina ^a		-	4x10 ⁻³	10x10 ⁻³	-
Xantina ^b	40x10 ⁻³	40x10 ⁻³	10x10 ⁻³	10x10 ⁻³	-

^{a-b} Condiciones de reacción: [Nucleósido]=[Base] = 10 mM en tampón fosfato 50 mM, pH 10, a 50 °C, 20 min y 30 r.p.m.. Se utilizaron 14,3 µg de proteína en un volumen de ensayo de 40 µL.

Resultados y Discusión

Cabe destacar que la *Dp*NDT es capaz de catalizar reacciones de transglicosilación utilizando concentraciones más elevadas de guanina y xantina (10 mM) (Tabla 20) que las previamente conseguidas por otras 2'-desoxirribosiltransferasas mediante el empleo de disolventes orgánicos miscibles con agua. Concretamente la *Lr*NDT libre e inmovilizada opera con concentraciones de 1 mM de guanina y xantina (Fernández-Lucas *y col.*, 2011b). Desafortunadamente el derivado inmovilizado presentaba un ligero descenso de la actividad con el pH respecto de la enzima libre como se pudo observar al determinar el efecto del pH en la actividad de la *Dp*QNDT (Figura 39) y no fue posible obtener resultados positivos al tratar de reproducir las condiciones de ensayo de la enzima libre (10 mM, 20 min de reacción). Por esta razón, se procedió a disminuir la concentración de los sustratos e incrementar el tiempo de reacción, para conseguir unas condiciones de reacción en las cuales el biocatalizador inmovilizado pudiera operar de manera óptima (Tabla 21).

Tabla 21: Reacciones de síntesis de nucleósidos naturales utilizando el derivado inmovilizado *QDp*NDT.

Reacción	t (h)	% ^b	U.I. ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	A.E.E. (U.I./ mg_{prot})	A.E.E. _{der} (U.I./ g_{der})
<i>Dp</i>NDT					
Guanina ^a	2	54	3.6×10^{-4}	2.5×10^{-2}	
Xantina ^a	2	50	3.2×10^{-4}	2.3×10^{-2}	
<i>QDp</i>NDT					
Guanina ^a	2	41	6.8×10^{-4}	2.8×10^{-2}	0,040
Xantina ^a	2	37	6.1×10^{-4}	2.5×10^{-2}	0.036

^a Condiciones de reacción: [dUri]=[Base] = 2 mM en tampón fosfato 50 mM, pH 10, a 50 °C, 120 y 240 min, 350 r.p.m.. Se utilizaron 17 mg de biocatalizador conteniendo 24.3 μg de proteína en un volumen de ensayo de 100 μL con *QDp*NDT.

^b Rendimiento nucleósido obtenido sobre el 100 % (10 mM).

8.3. Síntesis de nucleósidos no naturales

Una vez determinada la especificidad de sustrato con nucleósidos naturales con la enzima libre e inmovilizada, se procedió a estudiar su aplicación en el uso de nucleósidos no naturales. Para ello, se realizaron dos tipos de síntesis:

1) Síntesis a partir de nucleósido natural y base no natural.

Se realizaron reacciones de transglicosilación catalizada por la *Dp*NDT recombinante tanto libre como inmovilizada empleando como sustratos diferentes tipos de bases no naturales y 2'-desoxiuridina (apartado 19 de Materiales y Métodos) y cuyos resultados aparecen en las Tablas 22 y 23.

Resultados y Discusión

Tabla 22: Reacciones de síntesis de nucleósidos no naturales mediante la *Dp*NDT recombinante a partir de la reacción de un nucleósido natural y una base no natural^a.

Actividad enzimática específica (μmoles convertidos/min × mg enzima)	
Base	Nucleósido
	DUri
Azacitosina	$5,0 \times 10^{-3}$
Benzimidazol	-
Benzoiladenina	-
Etiluracilo	$1,6 \times 10^{-2}$
Fluoroadenina	$1,3 \times 10^{-2}$
Trifluorotimina	$8,0 \times 10^{-3}$
2,6-diaminopurina	$5,0 \times 10^{-3}$
6-Mercaptopurina	$2,5 \times 10^{-2}$
5-Clouracilo	$1,6 \times 10^{-2}$
5-Fluorocitosina	$1,3 \times 10^{-2}$
5-Fluoro-2-metoxi-4(1 <i>H</i>)pirimidinona	$1,0 \times 10^{-3}$
5-Fluorouracilo	-
5-Bromouracilo	$1,3 \times 10^{-2}$
5-Iodouracilo	$1,6 \times 10^{-2}$
7-deaza-hidroxipurina	-

^aCondiciones de reacción: [dUri]=[Base]=2 mM en tampón MES 50 mM, pH 6,5, a 50 °C, 2 horas y 30 r.p.m.. Se utilizaron 14.3 μg de proteína en un volumen de ensayo de 40 μL.

(-) = ausencia de actividad

Resultados y Discusión

Tabla 23: Reacciones de síntesis de nucleósidos no naturales mediante el derivado inmovilizado QDpNDT a partir de la reacción de un nucleósido natural y una base no natural.

Reacción ^a	% ^b	U.I. ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	A.E.E. (U.I./mg)	A.E.E. _{der} (U.I./g _{der})
Azacitosina	10	$1,6 \times 10^{-4}$	$7,0 \times 10^{-3}$	0,010
Benzimidazol	6	$1,0 \times 10^{-4}$	$4,0 \times 10^{-3}$	0,006
Benzoiladenina	-	-	-	-
Etiluracilo	26	$4,4 \times 10^{-4}$	$1,8 \times 10^{-2}$	0,026
Fluoroadenina	0.05	$8,3 \times 10^{-7}$	$3,4 \times 10^{-5}$	$5,0 \times 10^{-5}$
Trifluorotimina	43	$7,2 \times 10^{-4}$	$2,9 \times 10^{-2}$	0,043
2,6-diaminopurina	25	$4,0 \times 10^{-4}$	$1,7 \times 10^{-2}$	0,024
6-Mercaptopurina	24	$4,0 \times 10^{-4}$	$1,7 \times 10^{-2}$	0,024
5-Clorouracilo	36	$5,2 \times 10^{-4}$	$2,1 \times 10^{-2}$	0,031
5-Fluorocitosina	2	$3,3 \times 10^{-5}$	$1,5 \times 10^{-3}$	0,002
5-Fluoro-2-metoxi-4(1H)pirimidinona	8	$1,3 \times 10^{-4}$	$6,0 \times 10^{-3}$	0,008
5-Fluorouracilo	43	$7,2 \times 10^{-4}$	$2,9 \times 10^{-2}$	0,043
5-Bromouracilo	26	$4,4 \times 10^{-4}$	$1,8 \times 10^{-2}$	0,026
5-Iodouracilo	28	$4,6 \times 10^{-4}$	$1,9 \times 10^{-2}$	0,027
7-deaza-6-hidroxiuracilo	-	-	-	-

^aCondiciones de reacción: [Nucleósido]=[Base]=2 mM en tampón MES 50 mM, pH 6,5, a 50 °C, 2 horas y 30 r.p.m.. Se utilizaron 24.3 μg de proteína en un volumen de ensayo de 100 μl .

^bRendimiento nucleósido obtenido sobre el 100 % (10 mM).

(-) = ausencia de actividad

Aunque los resultados obtenidos en cuanto a la síntesis de nucleósidos a partir de nucleósidos naturales y bases no naturales, son muy dispares existiendo casos en los que la actividad se mantiene, otros en los que mejora sustancialmente y otros en los que empeora notablemente, cabe destacar que se han conseguido sintetizar análogos de nucleósidos con actividad terapéutica, como por ejemplo la 6-mercaptopurina-2'-desoxirribosa, 2,6-diaminopurina-2'-desoxirribosa, benzimidazol-2'-desoxirribosido, 5-fluoro-2'-desoxiuridina, 5-cloro-2'-desoxiuridina, 5-bromo-2'-desoxiuridina, 5-iodo-2'-

Resultados y Discusión

desoxiuridina, 5-etil-2'-desoxiuridina, 5-fluoro-2-metoxi-4(1*H*)pirimidinona-2'-desoxirribosa, 2'-fluoro-2'-desoxicitidina, y 5-trifluorotimidina (Tabla 22).

Aunque los resultados obtenidos en cuanto a la síntesis de nucleósidos a partir de nucleósidos naturales y bases no naturales, son muy dispares existiendo casos en los que la actividad se mantiene, otros en los que mejora sustancialmente y otros en los que empeora notablemente, cabe destacar que se han conseguido sintetizar análogos de nucleósidos con actividad terapéutica, como por ejemplo la 6-mercaptopurina-2'-desoxirribosa, 2,6-diaminopurina-2'-desoxirribosa, benzimidazol-2'-desoxirribosido, 5-fluoro-2'-desoxiuridina, 5-cloro-2'-desoxiuridina, 5-bromo-2'-desoxiuridina, 5-iodo-2'-desoxiuridina, 5-etil-2'-desoxiuridina, 5-fluoro-2-metoxi-4(1*H*)pirimidinona-2'-desoxirribosa, 2'-fluoro-2'-desoxicitidina, y 5-trifluorotimidina (Tablas 22 y 23).

Así, los nucleósidos derivados de la 2,6-diaminopurina son usados como agentes terapéuticos frente a diferentes tipos de cáncer y enfermedades virales. En este sentido, estos compuestos pueden actuar como drogas o predrogas dependiendo de su capacidad de actuar como sustrato de la adenosina desaminasa (ADA) *in vivo* (Médici y *col.*, 2006) y, además han sido empleados en la síntesis de oligonucleótidos antisentido modificados (Herdewijn, 2000). Empleando 2'-desoxiuridina y 2,6-diaminopurina como sustratos, se ha conseguido la síntesis de la 2,6-diaminopurina-2'-desoxirribosa, compuesto que ha sido utilizado como prodroga de la 2'-desoxiguanosina en leucemias de células linfocíticas de ratón (Weckbecker y Cory, 1988). También han sido sintetizados análogos de derivados halogenados de la 2'-desoxiuridina que son usados como anticancerígenos. Ejemplos de ello son la síntesis de 5-fluoro-2'-desoxiuridina, un potente anticancerígeno que inhibe la timidilato sintasa, enzima esencial en la síntesis de DNA durante la proliferación celular (Sato y *col.*, 2008). Además la 5-bromo-2'-desoxiuridina y la 5-cloro-2'-desoxiuridina han sido empleados con similares efectos terapéuticos (Brandon y *col.*, 2000; O'Neill y *col.*, 1983). El derivado QDsNDT también fue capaz de sintetizar dos derivados de la citidina con aplicaciones terapéuticas como la 5-aza-2'-desoxicitidina y 5-fluoro-2'-desoxicitidina. En el primer caso, la 5-aza-2'-desoxicitidina (Decitabina) ha demostrado ser un inhibidor de la metilación del DNA en intervenciones tempranas, prevención y tratamiento de diferentes tipos de cáncer (Christman, 2002; Lantry y *col.*, 1999), mientras que la 5-fluoro-2'-desoxicitidina se administra clínicamente en combinación con la 3,4,5,6-tetrahidrouridina (THU) debido a su habilidad para inhibir la DNA metiltransferasa (Beumer y *col.*, 2008; Beumer y *col.*, 2006). Finalmente, la enzima inmovilizada fue activa en la síntesis de 5-etil-2'-desoxiuridina (5-EtdUrd), la cual ha sido descrita como potenciadora del efecto

antitumoral del 5-fluorouracilo (5-FU), sin un incremento significativo de la toxicidad (Kralovánszky y *col.*, 1999). La síntesis química del 5-EtdUrd es particularmente difícil y laboriosa por lo que su síntesis enzimática mediante el derivado QDsNDT podría ser una alternativa interesante. Además, 5-EtdUrd es un intermedio clave en la síntesis de (E)-5-(2-bromovinil)-2'-desoxiuridina (BVDU), usada en el tratamiento de algunas infecciones de virus (Kalinichenko y *col.*, 1989).

Finalmente, otros nucleósidos con efecto antiviral han sido sintetizados con éxito mediante el derivado QDsNDT. Un ejemplo de ello es la 2'-fluoro-2'-desoxicitidina, la cual exhibe un potente efecto antiviral frente a la dispersión y replicación de virus causante de la enfermedad de Borna (Bajramovic y *col.*, 2004). Igualmente también se llevó a cabo la síntesis del antiherpético 5 -yodo-2'-desoxiuridina (Idoxuridine) (Seth y *col.*, 2005) y la trifluorotimidina (Trifluridine) (Brady y *col.*, 2004) satisfactoriamente.

2) Síntesis a partir nucleósido no natural y base natural

En estos experimentos se utilizaron como sustrato diferentes tipos de bases naturales (uracilo, adenina y timina), nucleósidos no naturales (ara A, ara U y 2'-desoxi-2'-fluorouridina, DFU), con la *Dp*NDT recombinante libre e inmovilizada (apartado 19 de Materiales y Métodos). Los resultados se muestran en las Tabla 24 y 25.

Tabla 24: Reacciones de síntesis de nucleósidos no naturales mediante la *Dp*NDT libre utilizando la reacción de un nucleósido no natural y una base natural^a

		Actividad específica (µmoles convertidos/min/mg enz)							
		Base	A	C	G	H	T	U	X
Nucleósido									
Ara-U	1:1	-	-	-	-	-	$1,1 \times 10^{-3}$	-	-
	3:1	-	-	-	-	-	$3,3 \times 10^{-3}$	-	-
Ara-A	1:1	-	-	-	-	-	-	$9,7 \times 10^{-5}$	-
	3:1	-	-	-	-	-	-	$1,3 \times 10^{-4}$	-
DFU	1:1	-	-	-	-	-	$2,5 \times 10^{-3}$	-	-
	3:1	-	-	-	-	-	$5,8 \times 10^{-3}$	-	-

^a Condiciones de reacción: [Nucleósido]=0,5 o 1,5 mM, [Base]=0,5 mM en tampón MES 50 mM, pH 6,5, 40°C, 24h y 30 r.p.m. (-) = ausencia de actividad

Resultados y Discusión

Tabla 25: Reacciones de síntesis de nucleósidos no naturales mediante el derivado QDpNT inmovilizada utilizando la reacción de un nucleósido no natural y una base natural.

Reacción ^a	Base	%	U.I. ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	A.E.E. (U.I./mg)	A.E.E. _{der} (U.I./g _{der})
AraU	A	-	-	-	-
	C	-	-	-	-
	G	-	-	-	-
	H	-	-	-	-
	T	21	$2,9 \times 10^{-6}$	$2,4 \times 10^{-4}$	$1,7 \times 10^{-4}$
	X	-	-	-	-
AraA	C	-	-	-	-
	G	-	-	-	-
	H	-	-	-	-
	T	-	-	-	-
	U	9,4	$1,3 \times 10^{-6}$	$9,1 \times 10^{-5}$	$7,1 \times 10^{-5}$
	X	-	-	-	-
DFU	A	-	-	-	-
	C	-	-	-	-
	G	-	-	-	-
	H	-	-	-	-
	T	56	$7,7 \times 10^{-6}$	$5,4 \times 10^{-4}$	$4,6 \times 10^{-4}$
	X	-	-	-	-

^aCondiciones reacción:[Nucleósido]= 1.5 mM, [Base]=0.5 mM en tampón MES 50 mM, pH 6,5, 40°C, 24h y 250 r.p.m.

(-) = ausencia de actividad

Estos resultados son muy interesantes, ya que estas tres reacciones no han sido descritas hasta el momento en otras 2'-desoxirribosiltransferasas, mientras que sí en las nucleósido fosforilasas, lo cual le da un valor añadido a la obtención del biocatalizador. Como se observa en la Tabla 25, en el caso del derivado inmovilizado no fue posible repetir los resultados para los arabinosilnucleósidos. Sin embargo, fue posible la reacción de síntesis de nucleósidos no naturales a partir de la 2'-desoxi-2'-fluorouridina.

En este tipo de estrategias de síntesis, dada la especificidad con la que operan las enzimas desaparecen los problemas de protección y desprotección de grupos funcionales así como la presencia de isómeros configuracionales. Asimismo al ser una reacción en un solo paso, el rendimiento de reacción, es el rendimiento global del proceso. Si a esto le añadimos que las operan en tampones acuosos y bajo unas condiciones de reacción moderadas, podemos afirmar que se ha obtenido un biocatalizador que opera de manera regio, enantio y estereoespecíficamente de manera eficaz y con un elevado rendimiento, en unas condiciones de reacción respetuosas con el medio ambiente o por simplificarlo de alguna manera, se ha desarrollado un “proceso biosostenible” para la obtención de análogos de nucleósidos de interés terapéutico. Proceso sencillo, eficaz, barato y respetuoso como podemos observar a continuación la síntesis de un gran número de nucleósidos, tanto naturales como no naturales. Ahí radica la importancia de la utilización de la *Dp*NDT como biocatalizador en la síntesis de nucleósidos, ya que es necesario resaltar que mediante otro tipo de estrategias de síntesis, obviamente habría sido imposible llevar a cabo la síntesis de ese elevado número de productos

9. Reutilización de la *Dp*NDT inmovilizado

Una vez comprobado que el derivado inmovilizado obtenido era activo en la síntesis de diferentes nucleósidos tanto naturales como no naturales, el objetivo fue comprobar si el biocatalizador inmovilizado obtenido se podría reutilizar en sucesivos ciclos de la misma reacción. Para ello se plantearon las siguientes reacciones de transglicosilación:

1) Síntesis de 2'-desoxiaguanosina y 2'-desoxixantosa a partir de 2'-desoxiuridina y la correspondiente base

Para ello en primer lugar se procedió a efectuar la reacción a diferentes tiempos de reacción y diferentes relaciones molares de sustratos, con el fin de optimizar todo lo posible y conseguir la mayor conversión posible. Los resultados se muestran en la Tabla 26.

Resultados y Discusión

Tabla 26: Optimización de condiciones de la síntesis de nucleósidos purínicos mediante la *Dp*NDT inmovilizada.

Reacción ^a	T (h)	% ^c	U.I. ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	A.E.E. (U.I./ mg_{prot})	A.E.E. _{der} (U.I./ g_{der})
Guanina					
1:1	2	41	$6,8 \times 10^{-4}$	$2,8 \times 10^{-2}$	0,04
	4	56	$4,6 \times 10^{-4}$	$1,9 \times 10^{-2}$	0,03
	6	50	$4,1 \times 10^{-4}$	$1,7 \times 10^{-2}$	0,025
3:1	2	72	$1,2 \times 10^{-3}$	$5,0 \times 10^{-2}$	0,07
	4	82	$6,8 \times 10^{-4}$	$2,8 \times 10^{-2}$	0,04
	6	77	$5,6 \times 10^{-5}$	$1,9 \times 10^{-3}$	0,004
Xantina					
1:1	2	33	$5,5 \times 10^{-4}$	$1,9 \times 10^{-2}$	0,03
	4	47	$3,9 \times 10^{-4}$	$1,3 \times 10^{-2}$	0,02
	6	50	$4,1 \times 10^{-4}$	$1,7 \times 10^{-2}$	0,025
3:1	2	51	$8,5 \times 10^{-4}$	$2,9 \times 10^{-2}$	0,05
	4	73	$6,0 \times 10^{-4}$	$2,0 \times 10^{-2}$	0,04
	6	77	$5,6 \times 10^{-5}$	$1,9 \times 10^{-3}$	0,004

^aCondiciones reacción: [Nucleósido]=2 y 6 mM, [Base]=2 mM en tampón fosfato 50 mM, pH 10, 50°C, 2, 4 y 6 h y 250 r.p.m. Se utilizaron 24.3 μg de proteína en un volumen de ensayo de 100 μl .

Como se puede observar (Tabla 26) obviamente el rendimiento aumenta con el aumento de la relación molar de 2'-desoxirribonucleósido frente a la base, siendo mayor con una relación 3:1 que con la relación 1:1. Por otra parte, al aumentar el tiempo de reacción se observa un aumento de la conversión hasta alcanzar a un máximo a las 4 horas aproximadamente, a partir del cual no hay variación significativa de conversión. A la vista de los resultados y considerando los experimentos previos de desactivación de la temperatura con el tiempo (apartado 7 de Resultados y Discusión), se escogieron como condiciones para la reutilización del biocatalizador: una concentración de desoxiuridina de 6 mM y base de 2 mM en tampón fosfato 50 mM, pH 10. Por otra parte, la reacción se realizó a 50 °C durante 120 min, y 350 r.p.m, utilizando 17 mg de biocatalizador conteniendo 24,3 μg de proteína inmovilizada. Estas condiciones nos permitieron reutilizar el derivado inmovilizado sin pérdida significativa de actividad, a la

vez que producía un elevado rendimiento de nucleósido. En resumen, se optimizó al máximo la producción de la reacción catalizada por derivado comprometiendo lo menos posible la estabilidad del mismo. Los resultados se muestran en la Figura 43.

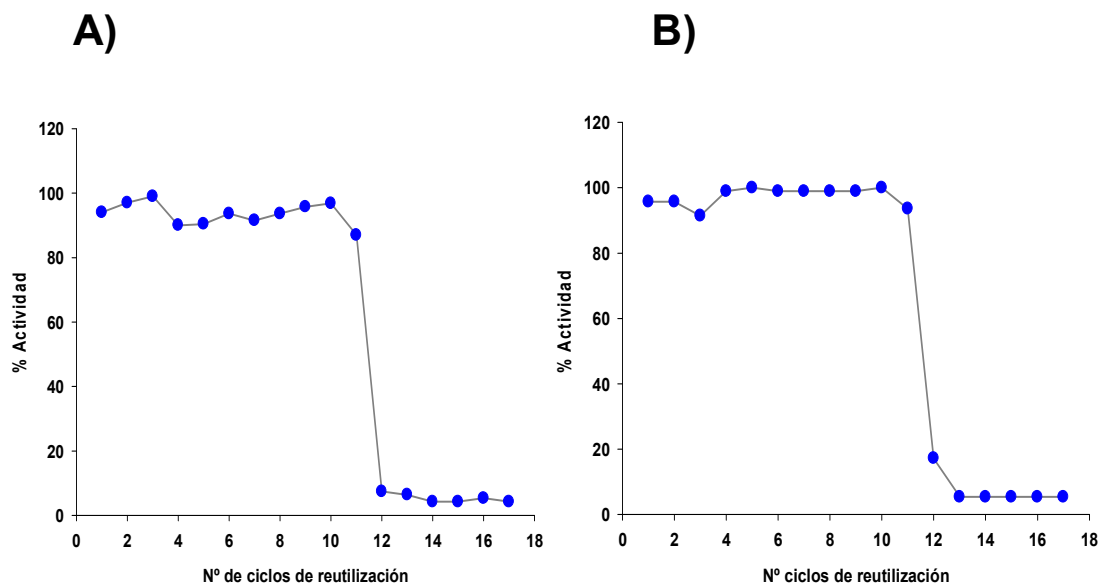


Figura 43: Reutilizaciones de la *DpNDT* inmovilizada en la reacción de síntesis de: A) 2'-desoxiguanosina, B) 2'-desoxixantosa. Condiciones reacción: [dUri]=6 mM, [Base]=2 mM en MES 50 mM, pH 6,5, a 50 °C, t = 2 horas, 250 r.p.m. Se utilizaron 24,3 µg de proteína inmovilizada.

La enzima inmovilizada puede catalizar la reacción 11 ciclos sin una disminución significativa de la actividad (Figura 43). A partir del ciclo 12 se produce una disminución drástica de la actividad, que fue del 90 % en el caso de la síntesis de la 2'-desoxiguanosina y del 85 % en el caso de la 2'-desoxixantosa. Este número de reutilizaciones es significativamente menor que el descrito para la *LrNDT* inmovilizada en Sepabeads que incluso llegan a 20-25 ciclos de actividad sin pérdida aparente de actividad (Fernández-Lucas y *col.*, 2011a). Si bien es interesante la reutilización del biocatalizador, no se ha obtenido un elevado número de reutilizaciones debido a que los valores de pH superiores a 10 afectan significativamente a la actividad de la enzima (apartado 6.1 de Resultados y Discusión). Como se mencionó anteriormente la disolución de los sustratos (guanina y xantina) requiere valores de pH elevados, lo que afecta al número de reutilizaciones del biocatalizador. Sin embargo, otras condiciones de reacción, como en la síntesis de 5-yodo-2'-desoxiuridina, y el 2'-desoxirribósido de la

Resultados y Discusión

5-fluoro-2-metoxi-4(1*H*) pirimidinona que se describe a continuación, el número de reutilizaciones sin pérdida aparente de actividad es mayor.

2) Síntesis de 5-yodo-2'-desoxiuridina y 5-Fluoro-2-metoxi-4(1*H*)pirimidinona 2'-desoxirribósido a partir de 2'-desoxiuridina y la correspondiente base

Al igual que en el caso anterior se procedió a efectuar la reacción a diferentes tiempos de reacción y diferentes relaciones molares de sustratos, con el fin de optimizar las condiciones de reacción y conseguir la mayor conversión posible (Tabla 27).

Tabla 27: Optimización de condiciones de la síntesis de nucleósidos no naturales mediante la *Dp*NDT inmovilizada.

Reacción ^a	t (h)	%	U.I. ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	A.E.E. (U.I./ mg_{prot})	A.E.E. _{der} (U.I./ g_{der})
5-Fluoro-2-metoxi-4(1<i>H</i>)pirimidinona					
1:1	2	7	$1,1 \times 10^{-4}$	$4,8 \times 10^{-3}$	0,070
	4	10	$8,5 \times 10^{-5}$	$3,5 \times 10^{-3}$	0,005
	6	5	$2,5 \times 10^{-5}$	$2,1 \times 10^{-4}$	0,002
3:1	2	14	$2,3 \times 10^{-4}$	$9,5 \times 10^{-3}$	0,014
	4	17	$1,4 \times 10^{-4}$	$5,9 \times 10^{-3}$	0,008
	6	29	$7,9 \times 10^{-5}$	$3,2 \times 10^{-3}$	0,005
5-Iodouracilo					
1:1	2	26	$2,8 \times 10^{-4}$	$1,2 \times 10^{-2}$	0,017
	4	38	$3,1 \times 10^{-4}$	$1,3 \times 10^{-2}$	0,019
	6	44	$2,5 \times 10^{-5}$	$1,0 \times 10^{-2}$	0,002
3:1	2	50	$8,3 \times 10^{-4}$	$3,4 \times 10^{-2}$	0,050
	4	50	$4,1 \times 10^{-4}$	$1,7 \times 10^{-2}$	0,024
	6	66	$3,6 \times 10^{-4}$	$1,5 \times 10^{-2}$	0,022

Resultados y Discusión

^aCondiciones reacción: [Nucleósido]=2 y 6 mM, [Base]=2 mM en tampón MES 50 mM, pH 6,5, 40°C, 2, 4 y 6 h y 250 r.p.m. Se utilizaron 24.3 µg de proteína en un volumen de ensayo de 100 µl.

Al igual que en el caso anterior, el rendimiento aumenta con el aumento de la relación molar de 2'-desoxirribonucleósido frente a la base, siendo mayor empleando una relación de 3:1 que 1:1. Por otra parte, a medida que aumentamos el tiempo de reacción aumenta la conversión hasta llegar a un máximo en torno a 4 horas a partir del cual no hay variación significativa de conversión. A la vista de los resultados y considerando los experimentos previos de desactivación de la temperatura con el tiempo (apartado 7 de Resultados y Discusión), se han escogido las siguientes condiciones para la reutilización del biocatalizador: una concentración de dosoxiuridina de 6 mM y de base 2mM en tampón MES 50 mM, pH 6,5, Por otra parte, la reacción se realiza a 50 °C durante 120 min, y 350 r.p.m, utilizando 24,3 µg de proteína inmovilizada. Estas condiciones han permitido reutilizar el derivado inmovilizado un alto número de veces sin una pérdida significativa de actividad, a la vez que se consigue un elevado rendimiento de nucleósido. Figura 44.

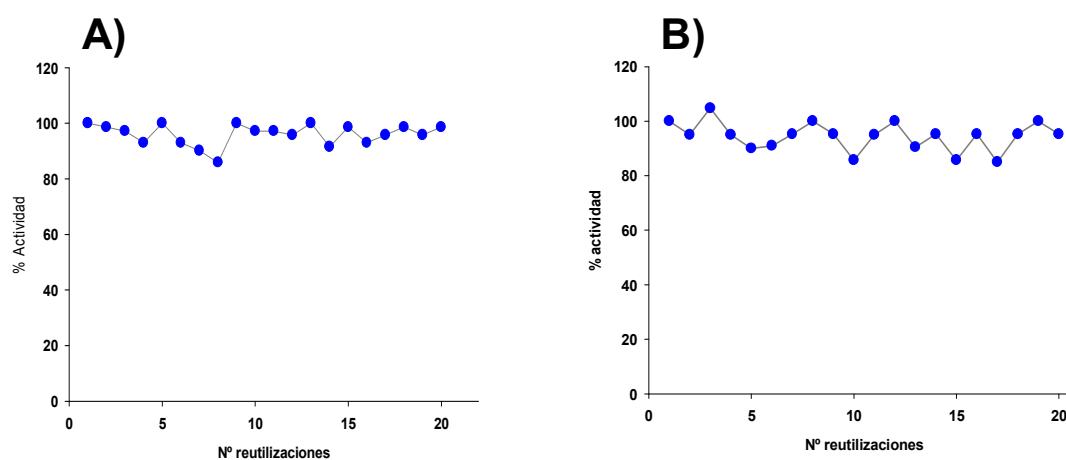


Figura 44: Reutilizaciones de la *DpNDT* inmovilizada en la reacción de síntesis de: A) 2'-desoxi-5-yodouridina, B) 5-Fluoro-2-metoxi-4(1*H*)pirimidinona 2'-desoxirribosa. Condiciones reacción: [dUri]=6 mM, [Base]=2 mM en MES 50 mM, pH 6,5, a 50 °C, t = 2 horas, 250 r.p.m. Se utilizaron 24,3 µg de proteína inmovilizada.

Como se puede observar en la Figura 44, la enzima mantiene prácticamente la misma la actividad inicial durante al menos 20 ciclos de reutilización. Se ha logrado la máxima optimización de la producción del derivado inmovilizado comprometiendo lo menos

Resultados y Discusión

posible su estabilidad. Este elevado número de reutilizaciones, permite considerar el derivado *QDp*NDT como un biocatalizador óptimo para su aplicación industrial en la síntesis de nucleósidos no naturales.

A la vista de los resultados mostrados a lo largo de esta Tesis se puede concluir que el derivado *QDp*NDT es obviamente desde el punto de vista sintético un candidato óptimo para su posterior escalado, pero también es muy interesante resaltar las propiedades magnéticas que posee debido a su alto contenido en Fe_3O_4 . Esta peculiaridad magnética del derivado *QDp*NDT permite una fácil separación del biocatalizador del medio de reacción mediante la aplicación de un campo magnético **B**, lo cual facilita el proceso posterior de purificación de los productos de reacción. (Figura 45)

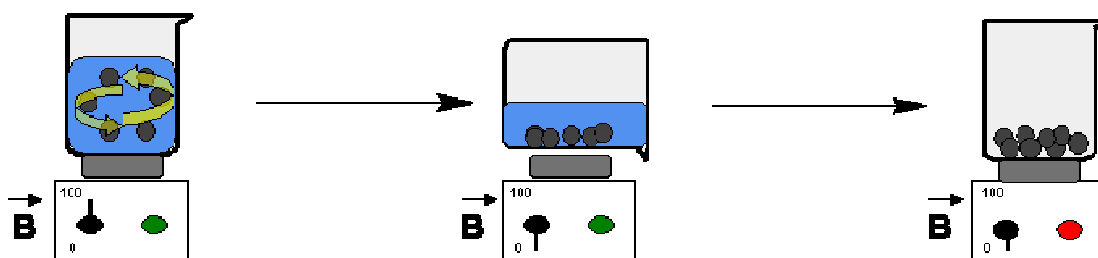
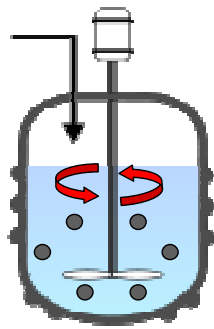


Figura 45: Representación gráfica del proceso de separación del biocatalizador del medio de reacción.

Otra interesante aplicación del derivado consiste en mantener la agitación de las partículas magnéticas mediante la aplicación de un campo magnético **B**, lo cual evita fenómenos de cavitación y cizalla debidas a la acción del rotor, muy frecuentes en reactores de tanque agitado, que pueden llevar a la degradación del biocatalizador con la consiguiente pérdida de eficacia en el proceso. (Figura 46)

A)



B)

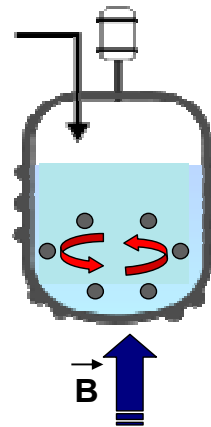


Figura 46: Esquema de funcionamiento de reactor de tanque agitado: A) Con agitación mecánica, B) Con agitación magnética.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

A la vista de los resultados obtenidos, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. Se ha clonado y expresado por primera vez el gen *ndt* de *Desulfotalea psychrophila* DSM 12343, en el microorganismo *E. coli* BL21(DE3) obteniéndose el microorganismo recombinante *E. coli* BL21(pET24ndt), demostrándose que el gen *ndt* codifica para una 2'-desoxirribosilnucleósido transferasa tipo II (NDT), enzima que cataliza el intercambio de bases púricas y/o pirimidínicas entre 2'-desoxirribosilnucleósidos, siendo la primera vez que se describe esta actividad para un microorganismo psicrófilo
2. Tras determinar las condiciones óptimas de producción de la NDT recombinante en medio LB suplementado con kanamicina y mediante inducción con IPTG 0,4 mM durante 3 horas a 37 °C y 250 r.p.m. se ha diseñado un sencillo protocolo de purificación de la proteína recombinante, mediante dos pasos cromatográficos que ha permitido obtener la enzima pura con un rendimiento de 7 mg de proteína por litro de caldo de producción.
3. Se ha caracterizado funcionalmente la nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa *Dp*NDT de *Desulfotalea psychrophila* recombinante estableciéndose las condiciones óptimas de ensayo a pH 4 -11 y 50 °C, durante 15 minutos. El aumento de la fuerza iónica no afecta significativamente a la enzima, así mismo, la actividad de la enzima no se ve afectada por la presencia de cationes metálicos mono y divalentes. Respecto a la especificidad de sustrato, la enzima usa como mejor aceptor $T \approx U \approx H > A \gg C$ y como mejor donador $Tyd \approx dUri > dIno \gg dAdo > dCit$.
4. Se ha caracterizado estructuralmente la *Dp*NDT recombinante mediante experimentos de absorción, fluorescencia, dicroísmo circular, calorimetría y ultracentrifugación analítica. La enzima activa es un homotetrámero de 68.6 kDa (16.75 kDa por monómero), con un coeficiente de extinción molar (ϵ_0) de 11835 M⁻¹cm⁻¹ similar al valor teórico. Presenta un contenido de estructura secundaria de 31

Conclusiones

% α -hélice; 19,9% β -lámina y 48,8 % de estructura aperiódica a los 20°C, valores similares a los que se muestran en la estructura secundaria consenso a la que se llegó mediante los métodos de predicción de la estructura secundaria de la enzima a partir de su estructura primaria (33,7 % en α -hélice, 12,6 % de β -lámina y 53,7 % de estructura aperiódica).

5. Mediante estudios de mutagénesis dirigida de la Ser C-terminal se ha conseguido un mutante con una Tyr C-terminal, residuo conservado en la mayoría de la NDTs descritas, que presenta el doble de actividad que la enzima silvestre, lo que indica la implicación de este residuo en la reacción catalizada por estas enzimas.
6. Se ha obtenido un derivado inmovilizado de la *Dp*NDT producida por *E. coli* BL21 (DE3) sobre un soporte biodegradable constituido por partículas magnéticas obtenidas a partir de quitosano y magnetita, entrecruzadas con epíclorhidrina y posteriormente activadas con glutaraldehído obteniéndose un biocatalizador (*QDp*NDT) con una actividad específica de 0,14 U.I./g biocatalizador y con una actividad retenida del 71 % frente a la enzima libre en las mismas condiciones de temperatura y pH. Es la primera vez que se inmoviliza este tipo de enzimas sobre este tipo de soporte.
7. Se han determinado las condiciones óptimas de actividad del derivado inmovilizado frente a pH y T, los resultados indican que *QDp*NDT opera con elevada actividad en un intervalo de pH 4 y 9 y de temperatura comprendida entre 40 y 70 °C, con lo cual se observa que el proceso de inmovilización incrementa las posibilidades de poder variar la temperatura del proceso, factor fundamental en el desarrollo industrial de un biocatalizador inmovilizado.
8. Se han llevado a cabo estudios de desactivación con la temperatura tanto con la enzima libre como con la inmovilizada, observándose que el proceso de inmovilización permite prolongar la vida media de uso de la enzima. Respecto a la enzima libre se ha determinado una temperatura de desactivación (T_m) de 58°C.
9. Tanto la *Dp*NDT libre como el derivado inmovilizado *QDp*NDT son capaces de catalizar la síntesis de nucleósidos naturales y no naturales, consiguiéndose por primera vez la síntesis de arabinosilnucleósidos con una nucleósido 2'-

desoxirribosiltransferasa inmovilizada, además de numerosos productos de síntesis de nucleósidos naturales y no naturales. Tanto la *Dp*NDT como el derivado *QDp*NDT cataliza de manera efectiva la síntesis de nucleósidos utilizando bases púricas poco solubles en medios acuosos como la xantina y la guanina debido al comportamiento que experimenta esta enzima a valores elevados de pH, lo que la diferencia frente a otros tipos de 2'-desoxirribosiltransferasas descritas hasta la fecha.

10. El derivado inmovilizado *QDp*NDT puede reutilizarse durante 11 ciclos sin pérdida significativa de actividad en la síntesis de 2'-desoxiguanosina y 2'-desoxixantosina, y al menos 20 ciclos en la síntesis de 2'-desoxi-5-yodouridina y el 2'-desoxirribósido de la 5-fluoro-2-metoxi-4(1*H*)pirimidinona. Todas estas características convierte al derivado ***QDp*NDT** en un candidato con un potencial elevado para su aplicación industrial como biocatalizador en la síntesis de nucleósidos.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Naby, M. A. (1993), Immobilization of *Aspergillus niger* NRC-107 Xylanase and BETA-Xylosidase, and properties of the immobilized enzymes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38, 69-81.
- Abdel-Naby, M. A., Ismail, A. M. S., Abdel-Fattah, A. M. y Abdel-Fattah, A. F. (1999a), Preparation and some properties of immobilized *Penicillium funiculosum* 258 dextranase. *Process Biochem.* 34, 391-398.
- Abdel-Naby, M. A., Ismail, A. M. S., Ahmed, S. A. y Fattah, A. F. A. (1998), Production and immobilization of alkaline protease from *Bacillus mycoides*. *Bioresour. Technol.* 64, 205-210.
- Abdel-Naby, M. A., Sherif, A. A., El-Tanash, A. B. y Mankarios, A. T. (1999b), Immobilization of *Aspergillus oryzae* tannase and properties of the immobilized enzyme. *J. Appl. Microbiol.* 87, 108-114.
- Acosta, N., Jimenez, C., Borau, V. y Heras, A. (1993), Extraction and characterization of chitin from crustaceans. *Biomass & Bioenergy* 5, 145-153.
- Agustian, J., Kamaruddin, A. H. y Bhatia, S. (2011), Enzymatic membrane reactors: the determining factors in two separate phase operations. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 86, 1032-1048.
- Alcalde, M., Ferrer, M., Plou, F. J. y Ballesteros, A. (2006), Environmental biocatalysis: from remediation with enzymes to novel green processes. *Trends Biotechnol.* 24, 281-287.
- An, X. N., Su, Z. X. y Zeng, H. M. (2003), Preparation of highly magnetic chitosan particles and their use for affinity purification of enzymes. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 78, 596-600.
- Anand, R., Kaminski, P. A. y Ealick, S. E. (2004), Structures of Purine 2'-Deoxyribosyltransferase, Substrate Complexes, and the Ribosylated Enzyme Intermediate at 2.0 Å... Resolution. *Biochemistry* 43, 2384-2393.
- Anastas, P., Eghbali, N., (2010), Green Chemistry: Principles and Practice. *Chem. Soc. Rev.* 39, 301-312.
- Andrews, L. D., Graham, J., Snider, M. J. y Fraga, D. (2008), Characterization of a novel bacterial arginine kinase from *Desulfotalea psychrophila*. *Comp. Biochem. Physiol., Part B: Biochem. Mol. Biol.* 150, 312-319.
- Aranaz, I., Mengibar, M., Harris, R., Paños, I., Miralles, B., Acosta, N., Galed, G. y Heras, A. (2009), Functional Characterization of Chitin and Chitosan. *Curr. Chem. Biol.* 3, 203-230.
- Armstrong, S. R., Cook, W. J., Short, S. A. y Ealick, S. E. (1996), Crystal structures of nucleoside 2-deoxyribosyltransferase in native and ligand-bound forms reveal architecture of the active site. *Structure* 4, 97-107.

Bibliografía

- Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J. y Schwede, T. (2006), The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* 22, 195-201.
- Arroyo, M. (1998), Inmovilización de enzimas: Fundamentos, metodos y aplicaciones. *Ars Pharmaceutica* 39, 23-29.
- Bajramovic, J. J., Volmer, R., Syan, S., Pochet, S. y Gonzalez-Dunia, D. (2004), 2'-Fluoro-2'-Deoxycytidine Inhibits Borna Disease Virus Replication and Spread. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 1422-1425.
- Banerjee, S. y Debnath, M. (2007), Continuous production of 6-amino penicillanic acid (6-APA) by agarose immobilized penicillin acylase in a packed column reactor. *Chem. Biochem. Eng. Q.* 21, 265-269.
- Bayramoglu, G., Yilmaz, M. y Arica, M. Y. (2010), Preparation and characterization of epoxy-functionalized magnetic chitosan beads: laccase immobilized for degradation of reactive dyes. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 33, 439-448.
- Beck, W. S. y Levin, M. (1963), Purification, Kinetics, and Repression Control of Bacterial Trans-N-deoxyribosylase. *J. Biol. Chem.* 238, 702-709.
- Belhaj-Ben Romdhane, I., Ben Romdhane, Z., Gargouri, A. y Belghith, H. (2011), Esterification activity and stability of *Talaromyces thermophilus* lipase immobilized onto chitosan. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 68, 230-239.
- Benavidez, T. E., Capra, R. H., Alvarez, C. I. y Baruzzi, A. M. (2009), Amperometric Biosensor Based on Immobilization of Oxalate Oxidase in a Mucin/Chitosan Matrix. *Electroanalysis* 21, 837-843.
- Beumer, J., Parise, R., Newman, E., Doroshov, J., Synold, T., Lenz, H.-J. y Egorin, M. (2008), Concentrations of the DNA methyltransferase inhibitor 5-fluoro-2'-deoxycytidine (FdCyd) and its cytotoxic metabolites in plasma of patients treated with FdCyd and tetrahydrouridine (THU). *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 62, 363-368.
- Beumer, J. H., Eiseman, J. L., Parise, R. A., Joseph, E., Holleran, J. L., Covey, J. M. y Egorin, M. J. (2006), Pharmacokinetics, Metabolism, and Oral Bioavailability of the DNA Methyltransferase Inhibitor 5-Fluoro-2'-Deoxycytidine in Mice. *Clinical Cancer Research* 12, 7483-7491.
- Boadi, D. K. y Neufeld, R. J. (2001), Encapsulation of tannase for the hydrolysis of tea tannins. *Enzyme Microb. Technol.* 28, 590-595.
- Boller, T., Meier, C. y Menzler, S. (2002), Eupergit oxirane acrylic Beads: how to make enzymes fit for biocatalysis. *Org. Process Res. Dev.* 6, 509-519.
- Boryski, J. (2008), Reactions of Transglycosylation in the Nucleoside Chemistry. *Curr. Org. Chem.* 12, 309-325.
- Bosch, J., Robien, M. A., Mehlin, C., Boni, E., Riechers, A., Buckner, F. S., Van Voorhis, W. C., Myler, P. J., Worthey, E. A., Detitta, G., Luft, J. R., Lauricella, A., Gulde, S., Anderson, L. A., Kalyuzhniy, O., Neely, H. M., Ross, J., Earnest, T. N., Soltis, M., Schoenfeld, L., Zucker, F., Merritt, E. A., Fan, E., Verlinde, C. L. M. J. y Hol, W. G. J. (2006), Using Fragment Cocktail Crystallography To Assist Inhibitor Design of *Trypanosoma brucei* Nucleoside 2-Deoxyribosyltransferase. *J. Med. Chem.* 49, 5939-5946.

- Bradford, M. M. (1976), A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brady, D. y Jordaan, J. (2009), Advances in enzyme immobilisation. *Biotechnology* 31, 1639-1650.
- Brady, D., Jordaan, J., Simpson, C., Chetty, A., Arumugam, C. y Moolman, F. S. (2008), Spherezymes: A novel structured self-immobilisation enzyme technology. *Bmc Biotechnology* 8.
- Brady, D., Steenkamp, L., Skein, E., Chaplin, J. A. y Reddy, S. (2004), Optimisation of the enantioselective biocatalytic hydrolysis of naproxen ethyl ester using ChiroCLEC-CR. *Enzyme and Microbial Technology* 34, 283-291.
- Brandon, M. L., Mi, L.-J., Chaung, W., Teebor, G. y Boorstein, R. J. (2000), 5-Chloro-2'-deoxyuridine cytotoxicity results from base excision repair of uracil subsequent to thymidylate synthase inhibition. *Mutation Research/DNA Repair* 459, 161-169.
- Briante, R., La Cara, F., Febbraio, F., Barone, R., Piccialli, G., Carolla, R., Mainolfi, P., De Napoli, L., Patumi, M., Fontanazza, G. y Nucci, R. (2000), Hydrolysis of oleuropein by recombinant beta-glycosidase from hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* immobilised on chitosan matrix. *Journal of Biotechnology* 77, 275-286.
- Brock, T. D. (1997), The value of basic research: Discovery of *Thermus aquaticus* and other extreme thermophiles. *Genetics* 146, 1207-1210.
- Bruns, N. y Tiller, J. C. (2004), Amphiphilic Network as Nanoreactor for Enzymes in Organic Solvents. *Nano Letters* 5, 45-48.
- Burns, C. L., St. Clair, M. H., Frick, L. W., Spector, T., Averett, D. R., English, M. L., Holmes, T. J., Krenitsky, T. A. y Koszalka, G. W. (1993), Novel 6-alkoxypurine 2',3'-dideoxynucleosides as inhibitors of the cytopathic effect of the human immunodeficiency virus. *Journal of Medicinal Chemistry* 36, 378-384.
- Cao, L. (2005), Immobilised enzymes: science or art? *Current Opinion in Chemical Biology* 9, 217-226.
- Cao, L., Van Rantwijk, F. y Sheldon, R. A. (2000), Cross-Linked Enzyme Aggregates: A Simple and Effective Method for the Immobilization of Penicillin Acylase. *Organic Letters* 2, 1361-1364.
- Carson, D. y Bruce-Wasson, D. (1988), Synthesis of 2',3'-dideoxynucleosides by enzymatic trans-glycosylation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 155, 829-834.
- Carvalho, G. M. J., Alves, T. L. M. y Freire, D. M. G. (2000), L-DOPA production by immobilized tyrosinase. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 84-6, 791-800.
- Cavicchioli, R., Charlton, T., Ertan, H., Omar, S. M., Siddiqui, K. S. y Williams, T. J. (2011), Biotechnological uses of enzymes from psychrophiles. *Microbial Biotechnology* 4, 449-460.
- Cavicchioli, R., Siddiqui, K. S., Andrews, D. y Sowers, K. R. (2002), Low-temperature extremophiles and their applications. *Current Opinion in Biotechnology* 13, 253-261.
- Clark, D. S. (1994), Can immobilization be exploited to modify enzyme activity? *Trends in Biotechnology* 12, 439-443.

Bibliografía

- Cole, C., Barber, J. D. y Barton, G. J. (2008), The Jpred 3 secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Research* 36, W197-W201.
- Crapisi, A., Lante, A., Pasini, G. y Spettoli, P. (1993), Enhanced microbial Cell-Lysis by the of lysozyme immobilized on diferent carriers. *Process Biochemistry* 28, 17-21.
- Chawdhri, R. F., Hutchinson, D. W. y Richards, A. O. L. (1991), Nucleoside deoxyribosyltransferase and inosine phosphorylase activity in lactic acid bacteria. *Archives of Microbiology* 155, 409-411.
- Chellapandian, M. y Krishnan, M. R. V. (1998), Chitosan-poly (glycidyl methacrylate) copolymer for immobilization of urease. *Process Biochemistry* 33, 595-600.
- Chen, J. P. y Chiu, S. H. (1999), Preparation and characterization of urease immobilized onto porous chitosan beads for urea hydrolysis. *Bioprocess Engineering* 21, 323-330.
- Chen, S.-P., Yu, X.-D., Xu, J.-J. y Chen, H.-Y. (2010), Lab-on-a-chip for analysis of triglycerides based on a replaceable enzyme carrier using magnetic beads. *Analyst* 135, 2979-2986.
- Christman, J. K. (2002), 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene* 21, 5483-95.
- D'annibale, A., Stazi, S. R., Vinciguerra, V., Di Mattia, E. y Sermanni, G. G. (1999), Characterization of immobilized laccase from *Lentinula edodes* and its use in olive-mill wastewater treatment. *Process Biochemistry* 34, 697-706.
- Dalmas, B., Hunter, G. J. y Bannister, W. H. (1994), Prediction of protein secondary structure from circular dichroism spectra using artificial neural network techniques. *Biochem Mol Biol Int* 34, 17-26.
- Danzin, C. y Cardinaud, R. (1974), Deoxyribosyl Transfer Catalysis with trans-N-Deoxyribosylase. Kinetic studies of purine-to-purine trans-N-deoxyribosylase. *European Journal of Biochemistry* 48, 255-262.
- Danzin, C. y Cardinaud, R. (1976), Deoxyribosyl Transfer Catalysis with trans-N-Deoxyribosylase. Kinetic study of purine (pyrimidine) to pyrimidine (purine) trans-N-deoxyribosylase. *European Journal of Biochemistry* 62, 365-372.
- Dash, M., Chiellini, F., Ottenbrite, R. M. y Chiellini, E. (2011), Chitosan-A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science* 36, 981-1014.
- Dauria, S., Pellino, F., Lacara, F., Barone, R., Rossi, M. y Nucci, R. (1996), Immobilization on chitosan of a thermophilic beta-glycosidase expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 61, 157-166.
- De Clercq E. (2010), Highlights in the discovery of antiviral drugs: a personal retrospective. *Journal of Medical Chemistry* 53, 1438-1450.
- Deléage, G. y Roux, B. (1987), An algorithm for protein secondary structure prediction based on class prediction. *Protein Engineering* 1, 289-294.
- Deming, J. W. (2002), Psychrophiles and polar regions. *Current Opinion in Microbiology* 5, 301-309.

- Demirjian, D. C., Moris-Varas, F. y Cassidy, C. S. (2001), Enzymes from extremophiles. *Current Opinion in Chemical Biology* 5, 144-151.
- Devi, R., Yadav, S. y Pundir, C. S. (2012), Amperometric determination of xanthine in fish meat by zinc oxide nanoparticle/chitosan/multiwalled carbon nanotube/polyaniline composite film bound xanthine oxidase. *Analyst* 137, 754-759.
- Edelhoch, H. (1967), Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry* 6, 1948-1954.
- El Hadrami, A., Adam, L. R., El Hadrami, I. y Daayf, F. (2010), Chitosan in Plant Protection. *Marine Drugs* 8, 968-987.
- Elion, G. B., Furman, P. A., Fyfe, J. A., Miranda, P. D., Beauchamp, L. y Schaeffer, H. J. (1977), Selectivity of action of an antiherpetic agent, 9-(2-hydroxyethoxymethyl)guanine. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74, 5716-5720.
- Elwakeel, K. Z. (2010), Environmental application of chitosan resins for the treatment of water and wastewater: A Review. *Journal of Dispersion Science and Technology* 31, 273-288.
- Faber, K. (2011), *Biotransformations in Organic Chemistry*, 434.
- Fadnavis, N. W. y Deshpande, A. (2002), Synthetic applications of enzymes entrapped in reverse micelles & organo-gels. *Current Organic Chemistry* 6, 393-410.
- Fedoy, A. E., Yang, N., Martinez, A., Leiros, H. K. S. y Steen, I. H. (2007), Structural and functional properties of isocitrate dehydrogenase from the psychrophilic bacterium *Desulfotalea psychrophila* reveal a cold-active enzyme with an unusual high thermal stability. *Journal of Molecular Biology* 372, 130-149.
- Feng, T., Du, Y. M., Yang, J. H., Li, J. y Shi, X. W. (2006), Immobilization of a nonspecific chitosan hydrolytic enzyme for application in preparation of water-soluble low-molecular-weight chitosan. *Journal of Applied Polymer Science* 101, 1334-1339.
- Fernández-Lafuente, R. (2009), Stabilization of multimeric enzymes: Strategies to prevent subunit dissociation. *Enzyme and Microbial Technology* 45, 405-418.
- Fernández-Lafuente, R., Guisan, J. M., Ali, S. y Cowan, D. (2000), Immobilization of functionally unstable catechol-2,3-dioxygenase greatly improves operational stability. *Enzyme and Microbial Technology* 26, 568-573.
- Fernández-Lafuente, R., Rodriguez, V., Mateo, C., Penzol, G., Hernandez-Justiz, O., Irazoqui, G., Villarino, A., Ovsejevi, K., Batista, F. y Guisan, J. M. (1999), Stabilization of multimeric enzymes via immobilization and post-immobilization techniques. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 7, 181-189.
- Fernández-Lucas J., Condezo L.A., Martínez-Lagos F. y Sinisterra J.V. (2007), Synthesis of 2'-deoxyribosyl nucleosides using new 2'-deoxyribosyltransferase microorganism producers. *Enzyme Microbial Technology*. 40, 1147-1155.
- Fernández-Lucas, J., Acebal, C., Sinisterra, J. V., Arroyo, M. y De La Mata, I. (2010), *Lactobacillus reuteri* 2'-Deoxyribosyltransferase, a Novel Biocatalyst for Tailoring of Nucleosides. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 1462-1470.
- Fernández-Lucas, J., Fresco-Taboada, A., Acebal, C., De La Mata, I. y Arroyo, M. (2011a), Enzymatic synthesis of nucleoside analogues using immobilized 2'-deoxyribosyltransferase from *Lactobacillus reuteri*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 91, 317-327.

Bibliografía

- Fernández-Lucas, J., Fresco-Taboada, A., De La Mata, I. y Arroyo, M. (2011b), One-step enzymatic synthesis of nucleosides from low water-soluble purine bases in non-conventional media. *Bioresource Technology*.
- Foresti, M. L. y Ferreira, M. L. (2007), Chitosan-immobilized lipases for the catalysis of fatty acid esterifications. *Enzyme and Microbial Technology* 40, 769-777.
- Frishman, D. y Argos, P. (1996), Incorporation of non-local interactions in protein secondary structure prediction from the amino acid sequence. *Protein Engineering* 9, 133-142.
- Gamage, A. y Shahidi, F. (2007), Use of chitosan for the removal of metal ion contaminants and proteins from water. *Food Chemistry* 104, 989-996.
- García-Galan, C., Berenguer-Murcia, Á., Fernández-Lafuente, R. y Rodrigues, R. C. (2011), Potential of Different Enzyme Immobilization Strategies to Improve Enzyme Performance. *Advanced Synthesis & Catalysis* 353, 2885-2904.
- Garg, R., Gupta, S. P., Gao, H., Babu, M. S., Debnath, A. K. y Hansch, C. (1999), Comparative Quantitative Structure-Activity Relationship Studies on Anti-HIV Drugs. *Chemical Reviews* 99, 3525-3602.
- Garnier, J., Gibrat, J. F. y Robson, B. (1996), GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence. *Methods in Enzymology* 266, 540-53.
- Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R. D. y Bairoch, A. (2003), ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Research* 31, 3784-3788.
- Geourjon, C. y Deléage, G. (1995), SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. *Computer applications in the biosciences : CABIOS* 11, 681-684.
- Ghosh, M., Tyagi, R. y Gupta, M. N. (1995), Preparation of trypsin free chymotrypsin. *Biotechnology Techniques* 9, 149-152.
- Gibrat, J. F., Garnier, J. y Robson, B. (1987), Further developments of protein secondary structure prediction using information theory: New parameters and consideration of residue pairs. *Journal of Molecular Biology* 198, 425-443.
- Gill, S. C. y Von Hippel, H. P. (1989), Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* 182, 319-326.
- Gomez, L., Ramirez, H. L. y Villalonga, R. (2000), Stabilization of invertase by modification of sugar chains with chitosan. *Biotechnology Letters* 22, 347-350.
- Guermeur, Y. y Gallinari, P. (1997), *Combinaison de Classifieurs Statistiques, Application; la Prediction de la Structure Secondaire des Proteines*, 169.
- Guermeur, Y., Geourjon, C., Gallinari, P. y Deléage, G. (1999), Improved performance in protein secondary structure prediction by inhomogeneous score combination. *Bioinformatics* 15, 413-421.
- Gui-Yin, L., Zhi-De, Z., Yuan-Jian, L., Ke-Long, H. y Ming, Z. (2010), Surface functionalization of chitosan-coated magnetic nanoparticles for covalent immobilization of yeast alcohol

- dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 322.
- Guisan, J. M., Bastida, A., Cuesta, C., Fernandezlafuente, R. y Rosell, C. M. (1991), Immobilization stabilization of Alpha-Chymotrypsin by covalent attachment to aldehyde agarose gels. *Biotechnology and Bioengineering* 38, 1144-1152.
- Guo, M. L., Jiang, Y. M., Ma, Z. L. y Li, Y. L. (1996), Hydrolytic characteristics of chitosan-immobilized As 1.398 neutral proteinase (from B-subtilis) to soybean protein. *Food Chemistry* 55, 373-377.
- Hammer-Jespersen, K. (1983), Nucleoside catabolism, p. 203-258. In A. Munch-Petersen (ed) *Metabolism of nucleotides and nucleobases in microorganism*. Academic Press Ins. London, United Kingdom.
- Hanahan, D. (1983), Studies on transformation on *Escherichia coli* with plasmid. *J. Mol. Biol.* 166, 557-580.
- Hartmeier, W. (1985), Immobilized biocatalysts -- From simple to complex systems. *Trends in Biotechnology* 3, 149-153.
- Hayashi, T. y Ikada, Y. (1991), Protease immobilization onto porous chitosan beads. *Journal of Applied Polymer Science* 42, 85-92.
- Henschke J.P., Zhang X., Yu J., Hu K. y Mei L. (2010), Synthesis of Decitabine. Patente de aplicación estadounidense. Nº de publicación . US 2010/0087637 A1.
- Herdewijn, P. (2000), Heterocyclic Modifications of Oligonucleotides and Antisense Technology. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 10, 297-310.
- Hernaiz, M. J., Alcántara, A. R., García, J. I. y Sinisterra, J. V. (2010), Applied biotransformations in green solvents. *Chem. Eur. J.* 16, 9422-9437.
- Hormigo, D., De La Mata, I., Acebal, C. y Arroyo, M. (2010), Immobilized aculeacin A acylase from *Actinoplanes utahensis*: Characterization of a novel biocatalyst. *Bioresource Technology* 101, 4261-4268.
- Hormigo, D., De La Mata, I., Castillon, M. P., Acebal, C. y Arroyo, M. (2009), Kinetic and microstructural characterization of immobilized penicillin acylase from *Streptomyces lavendulae* on Sepabeads EC-EP. *Biocatalysis and Biotransformation* 27, 271-281.
- Horvath, I. T. y Anastas, P. T. (2007), Introduction: Green chemistry. *Chemical Reviews* 107, 2167-2168.
- Hoyoux, A., Blaise, V., Collins, T., D'amico, S., Gratia, E., Huston, A. L., Marx, J. C., Sonan, G., Zeng, Y. X., Feller, G. y Gerday, C. (2004), Extreme catalysts from low-temperature environments. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 98, 317-330.
- Hsieh, H. J., Liu, P. C. y Liao, W. J. (2000), Immobilization of invertase via carbohydrate moiety on chitosan to enhance its thermal stability. *Biotechnology Letters* 22, 1459-1464.
- Hua, X., Yang, R., Zhang, W., Fei, Y., Jin, Z. y Jiang, B. (2010), Dual-enzymatic synthesis of lactulose in organic-aqueous two-phase media. *Food Research International* 43, 716-722.
- Huang, S.-H. y Juang, R.-S. (2011), Biochemical and biomedical applications of multifunctional magnetic nanoparticles: a review. *Journal of Nanoparticle Research* 13, 4411-4430.

Bibliografía

- Ichikawa, E. y Kato, K. (2001), Sugar-Modified Nucleosides in Past 10 Years, A Review. *Current Medicinal Chemistry* 8, 385-423.
- Itoyama, K., Tanibe, H., Hayashi, T. y Ikada, Y. (1994), Spacer effects on enzymatic-activity of papain immobilized onto porous chitosan beads. *Biomaterials* 15, 107-112.
- Iwasaki, K., Inoue, M. y Matsubara, Y. (1998), Continuous hydrolysis of pectate by immobilized endo-polygalacturonase in a continuously stirred tank reactor. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 62, 262-267.
- Jiang, D. S., Long, S. Y., Huang, J., Xiao, H. Y. y Zhou, J. Y. (2005), Immobilization of *Pycnoporus sanguineus* laccase on magnetic chitosan microspheres. *Biochemical Engineering Journal* 25, 15-23.
- Jin, Z., Su, Y. X. y Duan, Y. X. (2001), A novel method for polyaniline synthesis with the immobilized horseradish peroxidase enzyme. *Synthetic Metals* 122, 237-242.
- Jochems, P., Satyawali, Y., Diels, L. y Dejonghe, W. (2011), Enzyme immobilization on/in polymeric membranes: status, challenges and perspectives in biocatalytic membrane reactors (BMRs). *Green Chemistry* 13, 1609-1623.
- Kalinichenko, E. N., Barai, V. N., Bokut, S. B., Romanova, V. V., Zinchenko, A. I., Herrmann, G. y Mikhailopulo, I. A. (1989), Microbiological synthesis of 5-ethyl- and (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine. *Biotechnology Letters* 11, 621-626.
- Kalkan, N. A., Aksoy, S., Aksoy, E. A. y Hasirci, N. (2012), Preparation of Chitosan-Coated Magnetite Nanoparticles and Application for Immobilization of Laccase. *Journal of Applied Polymer Science* 123, 707-716.
- Kaminski, P. A. (2002), Functional Cloning, Heterologous Expression, and Purification of Two Different N-Deoxyribosyltransferases from *Lactobacillus helveticus*. *Journal of Biological Chemistry* 277, 14400-14407.
- Kaminski, P. A., Dacher, P., Duguá, L. y Pochet, S. (2008), In Vivo Reshaping the Catalytic Site of Nucleoside 2'-Deoxyribosyltransferase for Dideoxy- and Didehydronucleosides via a Single Amino Acid Substitution. *Journal of Biological Chemistry* 283, 20053-20059.
- Katchalski-Katzir, E. y Kraemer, D. M. (2000), Eupergit (R) C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 10, 157-176.
- Kaushik, A., Solanki, P. R., Ansari, A. A., Sumana, G., Ahmad, S. y Malhotra, B. D. (2009), Iron oxide-chitosan nanobiocomposite for urea sensor. *Sensors and Actuators B-Chemical* 138, 572-580.
- Kayastha, A. M. y Srivastava, P. K. (2001), Pigeonpea (*Cajanus cajan* L.) urease immobilized on glutaraldehyde-activated chitosan beads and its analytical applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 96, 41-53.
- Keller, P. M., Fyfe, J. A., Beauchamp, L., Lubbers, C. M., Furman, P. A., Schaeffer, H. J. y Elion, G. B. (1981), Enzymatic phosphorylation of acyclic nucleoside analogs and correlations with antihypertherpic activities. *Biochemical Pharmacology* 30, 3071-3077.
- Kiba, N., Oyama, Y. y Furusawa, M. (1993), Determination of aliphatic amino-acids in serum by HPLC with fluorometric detection using Co-Immobilized enzyme reactor. *Talanta* 40, 657-660.

- Kim, C., Xuong, N.-H., Edwards, S., Madhusudan, Yee, M.-C., Spraggon, G. y E. Mills, S. (2002), The crystal structure of anthranilate phosphoribosyltransferase from the enterobacterium *Pectobacterium carotovorum*. *FEBS Letters* 523, 239-246.
- King, R. D. y Sternberg, M. J. E. (1996), Identification and application of the concepts important for accurate and reliable protein secondary structure prediction. *Protein Science* 5, 2298-2310.
- Kise, H. y Hayakawa, A. (1991), Immobilization of preteases to porous chitosan beads and their catalysis for ester and peptide-synthesis in organic-solvents. *Enzyme and Microbial Technology* 13, 584-588.
- Klibanov, A. M. (1983), Immobilized enzymes and cells as practical catalysts. *Science* 219, 722-727.
- Knoblauch, C., Sahm, K. y Jårgensen, B. B. (1999), Psychrophilic sulfate-reducing bacteria isolated from permanently cold Arctic marine sediments: description of *Desulfofrigus oceanense* gen. nov., sp. nov., *Desulfofrigus fragile* sp. nov., *Desulfofaba gelida* gen. nov., sp. nov., *Desulfotalea psychrophila* gen. nov., sp. nov. and *Desulfotalea arctica* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 49, 1631-1643.
- Krajewska, B. (2004), Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme and Microbial Technology* 35, 126-139.
- Krajewska, B., Leszko, M. y Zaborska, W. (1990), Urease immobilized on chitosan membrane-preparation and properties. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 48, 337-350.
- Kralovánszky, J., Katona, C., Jeney, A., Pandi, E., Noordhuis, P., Erdélyi-Tóth, V., Ötvös, L., Kovács, P., Van Der Wilt, C. L. y Peters, G. J. (1999), 5-Ethyl-2'-deoxyuridine, a modulator of both antitumour action and pharmacokinetics of 5-fluorouracil. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 125, 675-684.
- Krenitsky, T., Koszalka, G. W. y Tuttle, J. V. (1981), Purine nucleoside synthesis: an efficient method employing nucleoside phosphorylases. *Biochemistry* 20, 3615-3621.
- Krenitsky, T. A., Mellors, J. W. y Barclay, R. K. (1965), Pyrimidine Nucleosidases. Their Classification and Relationship to uric Acid Ribonucleoside Phosphorylase. *J Biol Chem.* 240, 1281-6.
- Kunamneni, A., Ghazi, I., Camarero, S., Ballesteros, A., Plou, F. J. y Alcalde, M. (2008), Decolorization of synthetic dyes by laccase immobilized on epoxy-activated carriers. *Process Biochemistry* 43, 169-178.
- Kuo, C.-H., Liu, Y.-C., Chang, C.-M. J., Chen, J.-H., Chang, C. y Shieh, C.-J. (2012), Optimum conditions for lipase immobilization on chitosan-coated Fe₃O₄ nanoparticles. *Carbohydrate Polymers* 87, 2538-2545.
- Laemmli, U. K. (1970), Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lai, G.-S., Zhang, H.-L. y Han, D.-Y. (2009), Amperometric hydrogen peroxide biosensor based on the immobilization of horseradish peroxidase by carbon-coated iron nanoparticles in combination with chitosan and cross-linking of glutaraldehyde. *Microchimica Acta* 165, 159-165.
- Lalonde, J. y Margolin, A. Immobilization of Enzymes. in *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis* 163-184 (Wiley-VCH Verlag GmbH, 2008).

Bibliografía

- Lantry, L. E., Zhang, Z., Crist, K. A., Wang, Y., Kelloff, G. J., Lubet, R. A. y You, M. (1999), 5-Aza-2'-deoxycytidine is chemopreventive in a 4-(methyl-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced primary mouse lung tumor model. *Carcinogenesis* 20, 343-346.
- Lee, K. H., Lee, P. M. y Siaw, Y. S. (1992), Studies of L-Phenylalanine production by immobilized aminoacylase in stabilized calcium alginate beads. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 54, 375-382.
- Levene, P. A. y Medigreceanu, F. (1911), On Nucleases. *Journal of Biological Chemistry* 9, 65-83.
- Lewkowicz, E. S. y Iribarren, A. M. (2006), Nucleoside Phosphorylases. *Current Organic Chemistry* 10, 1197-1215.
- Lewkowicz, E. S., Martínez, N., Rogert, M. C., Porro, S. y Iribarren, A. M. (2000), An improved microbial synthesis of purine nucleosides. *Biotechnology Letters* 22, 1277-1280.
- Li, G. Y., Huang, K. L., Jiang, Y. R., Yang, D. L. y Ding, P. (2008), Preparation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* alcohol dehydrogenase immobilized on magnetic nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules* 42, 405-412.
- Li, N., Smith, T. J. y Zong, M.-H. (2010), Biocatalytic transformation of nucleoside derivatives. *Biotechnology Advances* 28, 348-366.
- Liang, Y.-Y. y Zhang, L.-M. (2007), Bioconjugation of papain on superparamagnetic nanoparticles decorated with carboxymethylated chitosan. *Biomacromolecules* 8, 1480-1486.
- Liu, Y., Jia, S., Ran, J. y Wu, S. Effects of static magnetic field on activity and stability of immobilized alpha-amylase in chitosan bead. *Catalysis Communications* 11, 364-367.
- Luckariff, H. R., Spain, J. C., Naik, R. R. y Stone, M. O. (2004), Enzyme immobilization in a biomimetic silica support. *Nature Biotechnology* 22, 211-213.
- Macnutt, W. S. (1952), The enzymically catalysed transfer of the deoxyribosyl group from one purine or pyrimidine to another. *Biochem. J.* 50, 384-397.
- Magalhaes, J. y Machado, A. (2002), Array of potentiometric sensors for the analysis of creatinine in urine samples. *Analyst* 127, 1069-1075.
- Manolov, R. J., Kambourova, M. S. y Emanuilova, E. I. (1993), Immobilization and properties of *Bacillus-stearotherophilus pullulanase*. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 18, 409-415.
- Mao, C., Cook, W. J., Zhou, M., Koszalka, G. W., Krenitsky, T. A. y Ealick, S. E. (1997), The crystal structure of *Escherichia coli* purine nucleoside phosphorylase: a comparison with the human enzyme reveals a conserved topology. *Structure* 5, 1373-1383.
- Margolin, A. L. (1996), Novel crystalline catalysts. *Trends in Biotechnology* 14, 223-230.
- Marx, J. C., Collins, T., D'amico, S., Feller, G. y Gerday, C. (2007), Cold-adapted enzymes from marine antarctic microorganisms. *Marine Biotechnology* 9, 293-304.
- Mateo, C., Abian, O., Fernandez-Lorente, G., Pedroche, J., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J. M., Tam, A. y Daminati, M. (2002), Epoxy sepabeads: a novel epoxy support for

- stabilization of industrial enzymes via very intense multipoint covalent attachment. *Biotechnol Prog* 18, 629-34.
- Mateo, C., Grazu, V., Palomo, J. M., Lopez-Gallego, F., Fernandez-Lafuente, R. y Guisan, J. M. (2007a), Immobilization of enzymes on heterofunctional epoxy supports. *Nat. Protocols* 2, 1022-1033.
- Mateo, C., Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M. y Fernandez-Lafuente, R. (2007b), Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology* 40, 1451-1463.
- Mathé, C. y Gosselin, G. (2006), L-nucleoside enantiomers as antiviral drugs: a mini-review. *Antiviral Res* 71, 276-81.
- Mcguffin, L. J., Bryson, K. y Jones, D. T. (2000), The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics* 16, 404-5.
- Médici, R., Lewkowicz, E. S. y Iribarren, A. M. (2006), Microbial synthesis of 2,6-diaminopurine nucleosides. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 39, 40-44.
- Mendes, A. A., De Oliveira, P. C., De Castro, H. F. y Giordano, R. D. C. (2011), Application of chitosan as support for immobilization of enzymes of industrial interest. *Quimica Nova* 34, 831-840.
- Merino, P., Franco, S., Merchan, F. L. y Tejero, T. Asymmetric synthesis of an isoxazolidine nucleoside analog of thymine polyoxin C. in *Tetrahedron Letters* Vol. 39 6411-6414 (1998).
- Miao, Y. Q. y Tan, S. N. (2000), Amperometric hydrogen peroxide biosensor based on immobilization of peroxidase in chitosan matrix crosslinked with glutaraldehyde. *Analyst* 125, 1591-1594.
- Mikhailopulo, I. A. (2007), Biotechnology of Nucleic Acid Constituents - State of the Art and Perspectives. *Current Organic Chemistry* 11, 317-335.
- Miller, J. H. *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory. (Cold Spring Harbor, NY, 1972).
- Minagawa, T., Okamura, Y., Shigemasa, Y., Minami, S. y Okamoto, Y. (2007), Effects of molecular weight and deacetylation degree of chitin/chitosan on wound healing. *Carbohydrate Polymers* 67, 640-644.
- Miyamoto, Y., Masaki, T. y Chohnan, S. (2007), Characterization of N-deoxyribosyltransferase from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics* 1774, 1323-1330.
- Muller, M., Hutchinson, L. K. y Guengerich, F. P. (1996), Addition of Deoxyribose to Guanine and Modified DNA Bases by *Lactobacillus helveticus* trans-N-Deoxyribosylase. *Chemical Research in Toxicology* 9, 1140-1144.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. y Erlich, H. (1986), Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology* 24, 17-27.
- Nahalka, J., Wu, B. Y., Shao, J., Gemeiner, P. y Wang, P. G. (2004), Production of cytidine 5'-monophospho-N-acetyl-beta-D-neuraminic acid (CMP-sialic acid) using enzymes or whole cells entrapped in calcium pectate-silica-gel beads. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 40, 101-106.

Bibliografía

- Nasratun, M., Said, H. A., Noraziah, A. y Alia, A. N. A. (2009), Immobilization of Lipase from *Candida rugosa* on Chitosan Beads for Transesterification Reaction. *American Journal of Applied Sciences* 6.
- Ng, L. T., Yuan, Y. J. y Zhao, H. J. (1998), Natural polymer-based sulfite biosensor. *Electroanalysis* 10, 1119-1124.
- Noda, T., Furuta, S. y Suda, I. (2001), Sweet potato beta-amylase immobilized on chitosan beads and its application in the semi-continuous production of maltose. *Carbohydrate Polymers* 44, 189-195.
- O'Neill, J. P., Heartlein, M. W. y Preston, R. J. (1983), Sister-chromatid exchanges and gene mutations are induced by the replication of 5-bromo- and 5-chloro-deoxyuridine substituted DNA. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 109, 259-270.
- Okuma, H., Okazaki, W., Usami, R. y Horikoshi, K. (2000), Development of the enzyme reactor system with an amperometric detection and application to estimation of the incipient stage of spoilage of chicken. *Analytica Chimica Acta* 411, 37-43.
- Okuma, H. y Watanabe, E. (2002), Flow system for fish freshness determination based on double multi-enzyme reactor electrodes. *Biosensors & Bioelectronics* 17, 367-372.
- Okuyama, K., Noguchi, K., Kanenari, M., Egawa, T., Osawa, K. y Ogawa, K. (2000), Structural diversity of chitosan and its complexes. *Carbohydrate Polymers* 41, 237-247.
- Okuyama, K., Shibuya, S., Hamamoto, T. y Noguchi, T. (2003), Enzymatic Synthesis of 2'-Deoxyguanosine with Nucleoside Deoxyribosyltransferase-II. *Biosci. Biotechnol. Biochem* 67, 889-995
- Pan, C., Hu, B., Li, W., Sun, Y., Ye, H. y Zeng, X. (2009), Novel and efficient method for immobilization and stabilization of beta-D-galactosidase by covalent attachment onto magnetic Fe(3)O(4)-chitosan nanoparticles. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 61, 208-215.
- Panchagnula, R. y Patel, J. R. (1997), Transdermal Delivery of Azidothymidine (AZT) through Rat Skin Ex-vivo. *Pharmacy and Pharmacology Communications* 3, 83-87.
- Panos, I., Acosta, N. y Heras, A. (2008), New drug delivery systems based on chitosan. *Current drug discovery technologies* 5, 333-41.
- Patel, C. B. y Gaikar, V. G. (2004), Adsorption and immobilization of penicillin acylase on chitosan beads. *Separation Science and Technology* 39, 2655-2675.
- Peniche, H., Osorio, A., Acosta, N., De La Campa, A. y Peniche, C. (2005), Preparation and characterization of superparamagnetic chitosan microspheres: Application as a support for the immobilization of tyrosinase. *Journal of Applied Polymer Science* 98, 651-657.
- Petach, H. H. y Driscoll, J. (1994), Transparent chitosan derivatives for the immobilization of the immobilization of glutamate-dehydrogenase. *Biotechnology and Bioengineering* 44, 1018-1022.
- Pifferi, P. G., Bonora, V., Spagna, G. y Tramontini, M. (1993), Immobilization of catalase on macromolecular supports activated with acid dyes. *Process Biochemistry* 28, 29-38.

- Porter, D. J. T., Merrill, B. M. y Short, S. A. (1995), Identification of the Active Site Nucleophile in Nucleoside 2-Deoxyribosyltransferase as Glutamic Acid 98. *Journal of Biological Chemistry* 270, 15551-15556.
- Porter, D. J. T., Merrill, B. M. y Short, S. A. (1995a), Identification of the Active Site Nucleophile in Nucleoside 2-Deoxyribosyltransferase as Glutamic Acid 98. *Journal of Biological Chemistry* 270, 15551-15556.
- Porter, D. J. T. y Short, S. A. (1995a), Nucleoside 2-Deoxyribosyltransferase. *Journal of Biological Chemistry* 270, 15557-15562.
- Porter, D. J. T. y Short, S. A. (1995b), Nucleoside 2-Deoxyribosyltransferase Pre-Steady-State kinetic analysis of native enzyme and mutant enzyme with an alanyl residue replacing Glu-98 (*). *Journal of Biological Chemistry* 270, 15557-15562.
- Porter, D. J. T. y Short, S. A. (1995b), Nucleoside 2-Deoxyribosyltransferase. *Journal of Biological Chemistry* 270, 15557-15562.
- Pugmire, M. J. y Ealick, S. E. (2002), Structural analyses reveal two distinct families of nucleoside phosphorylases. *Biochem J* 361, 1-25.
- Rabus, R., Ruepp, A., Frickey, T., Rattei, T., Fartmann, B., Stark, M., Bauer, M., Zibat, A., Lombardot, T., Becker, I., Amann, J., Gellner, K., Teeling, H., Leuschner, W. D., Glöckner, F. O., Lupas, A. N., Amann, R. y Klenk, H. P. (2004), The genome of *Desulfotalea psychrophila*, a sulfate-reducing bacterium from permanently cold Arctic sediments. *Environmental Microbiology* 6, 887-902.
- Ramakrishnan, V., Lathika, K. M., Dsouza, S. J., Singh, B. B. y Raghavan, K. G. (1997), Investigation with chitosan-oxalate oxidase-catalase conjugate for degrading oxalate from hyperoxaluric rat chyme. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics* 34, 373-378.
- Rani, M., Agarwal, A. y Negi, Y. S. (2010), REVIEW: Chitosan based hydrogel polymeric beads-as drug delivery system. *Bioresources* 5, 1-43.
- Rawal, R., Chawla, S., Dahiya, T. y Pundir, C. S. (2011), Development of an amperometric sulfite biosensor based on a gold nanoparticles/chitosan/multiwalled carbon nanotubes/polyaniline-modified gold electrode. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 401, 2599-2608.
- Rejikumar, S. y Devi, S. (2001), Hydrolysis of lactose and milk whey using a fixed-bed reactor containing beta-galactosidase covalently bound onto chitosan and cross-linked poly(vinyl alcohol). *International Journal of Food Science and Technology* 36, 91-98.
- Robak, T., Lech-Maranda, E., Korycka, A. y Robak E. (2006), Purine nucleoside analogs as immunosuppressive and antineoplastic agents: Mechanism of action and, clinical activity. *Current Medical Chemistry* 13, 3165-3189.
- Robertson, B. C. y Hoffee, P. A. (1973), Purification and Properties of Purine Nucleoside Phosphorylase from *Salmonella typhimurium*. *Journal of Biological Chemistry* 248, 2040-2043.
- Rodrigues, R. C., Berenguer-Murcia, A. y Fernandez-Lafuente, R. (2011), Coupling Chemical Modification and Immobilization to Improve the Catalytic Performance of Enzymes. *Advanced Synthesis & Catalysis* 353, 2216-2238.
- Rost, B. y Sander, C. (1993), Prediction of protein secondary structure at better than 70% accuracy. *J Mol Biol* 232, 584-99.

Bibliografía

- Roush, A. H. y Betz, R. F. (1958), Purification and Properties of Trans-N-Deoxyribosylase. *Journal of Biological Chemistry* 233, 261-266.
- Roy, J. J. y Abraham, E. T. (2004), Strategies in Making Cross-Linked Enzyme Crystals. *Chemical Reviews* 104, 3705-3722.
- Roy, J. J., Abraham, T. E., Abhijith, K. S., Kumar, P. V. S. y Thakur, M. S. (2005), Biosensor for the determination of phenols based on Cross-Linked Enzyme Crystals (CLEC) of laccase. *Biosensors and Bioelectronics* 21, 206-211.
- Saiki, R., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K., Horn, G., Erlich, H. y Arnheim, N. (1985), Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-1354.
- Saiz, J. L., López-Zumel, C., Monterroso, B., Varea, J., Arrondo, J. L. R., Iloro, I., García, J. L., Laynez, J. y Menéndez, M. (2002), Characterization of Ej1, the cell-wall amidase coded by the pneumococcal bacteriophage Ej-1. *Protein Sci.* 11, 1788-1799.
- Sadana A. (1982), Deactivation model involving a grace period for immobilized and soluble enzymes". *Enzyme Microbial Technology* 4, 44-46.
- Sakuragawa, A., Taniai, T. y Okutani, T. (1998), Fluorometric determination of microamounts of hydrogen peroxide with an immobilized enzyme prepared by coupling horseradish peroxidase to chitosan beads. *Analytica Chimica Acta* 374, 191-200.
- Sambrook, J., Fritsch, E. J. y T., M. (1989), *Molecular cloning: a laboratory manual*, (Cold Spring Harbor, New York (USA)).
- Santos, C., J., Paula, A. V., Nunes, G. F. M. y De Castro, H. F. (2008a), Pseudomonas fluorescens lipase immobilization on polysiloxane "polyvinyl alcohol composite chemically modified with epichlorohydrin. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 52-53, 49-57.
- Santos, C., J. L., Paula, A. V., Rocha, C. U. G. F., Nunes, G. F. M. y De Castro, H. F. (2008b), Morphological and mechanical properties of hybrid matrices of polysiloxane "polyvinyl alcohol prepared by sol-gel technique and their potential for immobilizing enzyme. *Journal of Non-Crystalline Solids* 354, 4823-4826.
- Sato, A., Hiramoto, A., Uchikubo, Y., Miyazaki, E., Satake, A., Naito, T., Hiraoka, O., Miyake, T., Kim, H.-S. y Wataya, Y. (2008), Gene expression profiles of necrosis and apoptosis induced by 5-fluoro-2'-deoxyuridine. *Genomics* 92, 9-17.
- Scardi, V. (1987), Immobilization of enzymes and microbial-cell in gelatin. *Methods in Enzymology* 135, 293-299.
- Schmid, A., Hollmann, F., Park, J. B. y Bühler, B. (2002), The use of enzymes in the chemical industry in Europe. *Current Opinion in Biotechnology* 13, 359-366.
- Segel, I. H. (1975), *Enzyme kinetics. Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems*, (Wiley-Interscience publications, New York (USA)).
- Seth, A. K., Misra, A. y Umrigar, D. (2005), Topical Liposomal Gel of Idoxuridine for the Treatment of Herpes Simplex: Pharmaceutical and Clinical Implications. *Pharmaceutical Development and Technology* 9, 277-289.

- Shahidi, F., Arachchi, J. K. V. y Jeon, Y. J. (1999), Food applications of chitin and chitosans. *Trends in Food Science & Technology* 10, 37-51.
- Shekhovtsova, T. N., Muginova, S. V. y Bagirova, N. A. (1997), Determination of organomercury compounds using immobilized peroxidase. *Analytica Chimica Acta* 344, 145-151.
- Sheldon, A., R., Schoevaart, R. y Van Langen, L. M. (2005), Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): A novel and versatile method for enzyme immobilization (a review). *Biocatalysis and Biotransformation* 23, 141-147.
- Sheldon, R. A. (2007), Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. *Advanced Synthesis & Catalysis* 349, 1289-1307.
- Sheldon, R. A. y Van Rantwijk, F. (2004), Biocatalysis for sustainable organic synthesis. *Australian Journal of Chemistry* 57, 281-289.
- Shi, W., Ting, L.-M., Kicska, G. A., Lewandowicz, A., Tyler, P. C., Evans, G. B., Furneaux, R. H., Kim, K., Almo, S. C. y Schramm, V. L. (2004), *Plasmodium falciparum* Purine Nucleoside Phosphorylase. *Journal of Biological Chemistry* 279, 18103-18106.
- Shirae, H., Yokozeki, K., Uchiyama, M. y Kubota, K. (1988), Enzymatic Production of Ribavirin from Purine Nucleosides by *Brevibacterium acetylicum* ATCC 954(Microbiology & Fermentation Industry). *Agricultural and biological chemistry* 52, 1777-1783.
- Short, S. A., Armstrong, S. R., Ealick, S. E. y Porter, D. J. T. (1996), Active Site Amino Acids That Participate in the Catalytic Mechanism of Nucleoside 2'-Deoxyribosyltransferase. *Journal of Biological Chemistry* 271, 4978-4987.
- Singla, A. K. y Chawla, M. (2001), Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects - an update. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 53, 1047-1067.
- Siso, M. I. G., Lang, E., Carrenogomez, B., Becerra, M., Espinar, F. O. y Mendez, J. B. (1997), Enzyme encapsulation on chitosan microbeads. *Process Biochemistry* 32, 211-216.
- Spagna, G., Barbagallo, R. N., Casarini, D. y Pifferi, P. G. (2001), A novel chitosan derivative to immobilize alpha-L-rhamnopyranosidase from *Aspergillus niger* for application in beverage technologies. *Enzyme and Microbial Technology* 28, 427-438.
- St. Clair, N. L. y Navia, M. A. (1992), Cross-linked enzyme crystals as robust biocatalysts. *Journal of the American Chemical Society* 114, 7314-7316.
- Steenkamp, D. (1992), Substrate specificity of the purine-2'-deoxyribonucleosidase of *Crithidia luciliae*. *Biochemical Journal* 287, 125-129.
- Surette, M., Gill, T. y Maclean, S. (1990), Purification and characterization of purine nucleoside phosphorylase from *Proteus vulgaris*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1435-1439.
- Swank, R. T. y Munkres, K. D. (1971), Molecular weight analysis of oligopeptides by electrophoresis in polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate. *Analytical Biochemistry* 39, 462-477.
- Takahashi, T. y Kayama, N. (1992), Binding to chitosan of multiple forms of glucoamylases from *aspergillus-saitoi* and *Rhizopus sp.* *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 40, 2775-2779.
- Taniai, T., Sakuragawa, A. y Okutani, T. (1999), Fluorometric determination of hydrogen peroxide in natural water samples by flow injection analysis with a reaction column of peroxidase immobilized onto chitosan beads. *Analytical Sciences* 15, 1077-1082.

Bibliografía

- Taniai, T., Sukuragawa, A. y Okutani, T. (2001), Fluorometric determination of ethanol in liquor samples by flow-injection analysis using an immobilized enzyme-reactor column with packing prepared by coupling alcohol oxidase and peroxidase onto chitosan beads. *Journal of Aoac International* 84, 1475-1483.
- The European Federation of Biotechnology, E. (1983), Guidelines for the characterization of immobilized biocatalysts: Worked out by The Working Party on Immobilized biocatalysts within The European Federation of Biotechnology. *Enzyme and Microbial Technology* 5, 304-307.
- Tonova, K. y Lazarova, Z. (2008), Reversed micelle solvents as tools of enzyme purification and enzyme-catalyzed conversion. *Biotechnology Advances* 26, 516-532.
- Trelles, J. A., Fernández, M., Lewkowicz, E. S., Iribarren, A. M. y Sinisterra, J. V. (2003), Purine nucleoside synthesis from uridine using immobilised *Enterobacter gergoviae* CECT 875 whole cells. *Tetrahedron Letters* 44, 2605-2609.
- Trelles, J. A., Lewkowicz, E. S., Sinisterra, J. V. y Iribarren, A. M. (2004), Free and immobilised *Citrobacter amalonaticus* CECT 863 as a biocatalyst for nucleoside synthesis. *International Journal of Biotechnology* 6, 376-384.
- Utagawa, T. (1999), Enzymatic preparation of nucleoside antibiotics. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 6, 215-222.
- Van De Velde, F., Lourenco, N. D., Pinheiro, H. M. y Bakker, M. (2002), Carrageenan: A food-grade and biocompatible support for immobilisation techniques. *Advanced Synthesis & Catalysis* 344, 815-835.
- Van Den Burg, B. (2003), Extremophiles as a source for novel enzymes. *Current Opinion in Microbiology* 6, 213-218.
- Van Mierlo, C. P. M. y Steensma, E. (2000), Protein folding and stability investigated by fluorescence, circular dichroism (CD), and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy: the flavodoxin story. *Journal of Biotechnology* 79, 281-298.
- Vinsova, J. y Vavrikova, E. (2011), Chitosan Derivatives with Antimicrobial, Antitumour and Antioxidant Activities - a Review. *Current Pharmaceutical Design* 17, 3596-3607.
- Vold, I. M. N. y Christensen, B. E. (2005), Periodate oxidation of chitosans with different chemical compositions. *Carbohydrate Research* 340, 679-684.
- Walter, M. R., Cook, W. J., Cole, L. B., Short, S. A., Koszalka, G. W., Krenitsky, T. A. y Ealick, S. E. (1990), Three-dimensional structure of thymidine phosphorylase from *Escherichia coli* at 2.8 Å resolution. *Journal of Biological Chemistry* 265, 14016-14022.
- Wang, G., Xu, J. J., Ye, L. H., Zhu, J. J. y Chen, H. Y. (2002), Highly sensitive sensors based on the immobilization of tyrosinase in chitosan. *Bioelectrochemistry* 57, 33-38.
- Wang, Y. T., Zhu, J. Z., Zhu, R. J., Zhu, Z. Q., Lai, Z. S. y Chen, Z. Y. (2003), Chitosan/Prussian blue-based biosensors. *Measurement Science & Technology* 14, 831-836.
- Weckbecker, G. y Cory, J. G. (1988), Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione-depleted mouse leukemia L1210 cells in vitro. *Cancer Letters* 40, 257-264.
- Wei, X., Zhang, M. y Gorski, W. (2003), Coupling the lactate oxidase to electrodes by ionotropic gelation of biopolymer. *Analytical Chemistry* 75, 2060-4.

- Wong, S. S. y Wong, L.-J. C. (1992), Chemical crosslinking and the stabilization of proteins and enzymes. *Enzyme and Microbial Technology* 14, 866-874.
- Wu, F. C., Tseng, R. L. y Juang, R. S. (2001), Enhanced abilities of highly swollen chitosan beads for color removal and tyrosinase immobilization. *Journal of Hazardous Materials* 81, 167-177.
- Yang, K., Xu, N.-S. y Su, W. W. (2010), Co-immobilized enzymes in magnetic chitosan beads for improved hydrolysis of macromolecular substrates under a time-varying magnetic field. *Journal of Biotechnology* 148, 119-127.
- Yang, L., Xiong, H., Zhang, X. y Wang, S. (2012), A novel tyrosinase biosensor based on chitosan-carbon-coated nickel nanocomposite film. *Bioelectrochemistry* 84, 44-48.
- Yao, D. C., Vlessidis, A. G. y Evmiridis, N. P. (2003), Microdialysis sampling and monitoring of uric acid in vivo by a chemiluminescence reaction and an enzyme on immobilized chitosan support membrane. *Analytica Chimica Acta* 478, 23-30.
- Yeon, K.-M., Lee, C.-H. y Kim, J. (2009), Magnetic Enzyme Carrier for Effective Biofouling Control in the Membrane Bioreactor Based on Enzymatic Quorum Quenching. *Environmental Science & Technology* 43, 7403-7409.
- Yi, Q., Sarney, D. B., Khan, J. A. y Vulfson, E. N. (1998), A novel approach to biotransformations in aqueous-organic two-phase systems: Enzymatic synthesis of alkyl beta-[D]-glucosides using microencapsulated beta-glucosidase. *Biotechnology and Bioengineering* 60, 385-390.
- Yokozeki, K. y Tsuji, T. (2000), A novel enzymatic method for the production of purine-2'-deoxyribonucleosides. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 10, 207-213.
- Yoshimoto, M. Stabilization of Enzymes Through Encapsulation in Liposomes. in *Enzyme Stabilization and Immobilization: Methods and Protocols*, Vol. 679 (ed. Minter, S. D.) 9-18 (Humana Press Inc, 999 Riverview Dr, Ste 208, Totowa, Nj 07512-1165 USA, 2011).
- Yoshimoto, M., Yamashita, T. y Kinoshita, S. Thermal stabilization of formaldehyde dehydrogenase by encapsulation in liposomes with nicotinamide adenine dinucleotide. *Enzyme and Microbial Technology* 49, 209-214.
- Zhang, L., Zhu, X., Zheng, S. y Sun, H. (2009a), Photochemical preparation of magnetic chitosan beads for immobilization of pullulanase. *Biochemical Engineering Journal* 46, 83-87.
- Zhang, Y., Wu, H., Li, J., Li, L., Jiang, Y., Jiang, Y. y Jiang, Z. (2007), Protamine-Templated Biomimetic Hybrid Capsules: Efficient and Stable Carrier for Enzyme Encapsulation. *Chemistry of Materials* 20, 1041-1048.
- Zhang, Y., Wu, H., Li, L., Li, J., Jiang, Z., Jiang, Y. y Chen, Y. (2009b), Enzymatic conversion of Baicalin into Baicalein by β -glucuronidase encapsulated in biomimetic core-shell structured hybrid capsules. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 57, 130-135.
- Zhang, Y. F. y Rochefort, D. (2011), Activity, conformation and thermal stability of laccase and glucose oxidase in poly(ethyleneimine) microcapsules for immobilization in paper. *Process Biochemistry* 46, 993-1000.
- Zhou, H., Yang, W. y Sun, C. (2008), Amperometric sulfite sensor based on multiwalled carbon nanotubes/ferrocene-branched chitosan composites. *Talanta* 77, 366-371.

Bibliografía

Zhou, M., Pugmire, M. J., Vuong, B. Q. y Ealick, S. E. (1999), Cloning, expression and crystallization of pyrimidine nucleoside phosphorylase from *Bacillus stearothermophilus*. *Acta Crystallographica Section D* 55, 287-290.