

*Instituto de Biología Molecular y Celular  
Universidad Miguel Hernández de Elche*



## **TESIS DOCTORAL**

***“DESARROLLO DE SISTEMAS PARA  
LA INMOVILIZACIÓN DE PROTEÍNAS  
Y SUS APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS”***

**Daniel Bello Gil**

**Director de Tesis: Jesús Miguel Sanz Morales**

Elche  
- 2013 -





*Instituto de Biología Molecular y Celular  
Universidad Miguel Hernández de Elche*



D. Antonio Vicente Ferrer Montiel, Catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, y Director del Instituto de Biología Molecular y Celular de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

**DA SU CONFORMIDAD** a la lectura de la Tesis Doctoral titulada: “Desarrollo de sistemas para la inmovilización de proteínas y sus aplicaciones biotecnológicas”, presentada por Daniel Bello Gil.

Para que conste y surta a los efectos oportunos, firma el presente certificado en Elche, a 21 de junio de 2013.

Fdo.: Prof. Antonio Vicente Ferrer Montiel





*Instituto de Biología Molecular y Celular  
Universidad Miguel Hernández de Elche*



D. Jesús Miguel Sanz Morales, Profesor Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

**CERTIFICA** que el trabajo de investigación titulado “Desarrollo de sistemas para la inmovilización de proteínas y sus aplicaciones biotecnológicas” que conduce a la obtención del grado de Doctor, ha sido realizado bajo su dirección por Daniel Bello Gil en el Instituto de Biología Molecular y Celular de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

Para que conste y surta a los efectos oportunos, firma el presente certificado en Elche, a 21 de junio de 2013.

Fdo.: Prof. Jesús Miguel Sanz Morales





*A mi familia,*



## Agradecimientos,

Quisiera expresar mi más profundo agradecimiento a todas las personas e instituciones que de una forma u otra han tenido que ver con el desarrollo de esta Tesis Doctoral.

A mi Director de Tesis: Gracias Jesús en primer lugar y antes que nada por tus valores humanos, por lo excelente persona que eres y por tu inestimable ayuda. He aprendido mucho en esta etapa, gracias por aceptarme en tu grupo de trabajo, por tu confianza, por tus conocimientos, dedicación y preocupación, por tu constancia y por haberme enseñado a mirar un poco más allá del resultado. Gracias por no poner ni un pero cada vez que solicité tú ayuda, y fueron muchas veces... MUCHAS GRACIAS!!!

A los miembros de este tribunal por aceptar la oposición de este trabajo y por sus oportunas contribuciones.

A la Universidad Miguel Hernández de Elche y a la Universidad de Alicante por darme la oportunidad de ser parte de su colectivo de trabajo. Al antiguo Ministerio de Ciencia e Innovación de España por el financiamiento para llevar a cabo esta investigación. A la EMBO por el financiamiento para realizar mi primera estancia en el grupo de trabajo del Prof. Jesús Sanz.

Al IBMC, dónde me acogieron estupendamente desde mi primera estancia y dónde me he sentido muy bien, como si estuviera en mi propia casa. Además por darme la oportunidad de conocer a maravillosas personas. A todos mis profesores y compañeros del Máster. A Javier, Carmen, May y Raquel por toda su ayuda, no sólo en cuestiones de Tesis, sino también porque siempre están dispuestos para ofrecerte la mejor solución ante cualquier duda o problemática. De manera especial a May por su preocupación, y disposición durante la recta final de este trabajo.

Al grupo del Prof. Juan M. Feliu del Instituto Universitario de Electroquímica de la UA, de manera especial a Víctor Climent por su ayuda durante mi paso por Alicante, muchas gracias!

Al Prof. Miguel Saceda, por su entusiasta colaboración y por su inestimable ayuda en cuestiones de cáncer y la elaboración y corrección de este documento. Gracias también por los buenos momentos compartidos.

A la Unidad del Consejo Genético del Hospital Universitario de Elche, por su colaboración en la realización de este trabajo, de manera especial a Pilar y Ana.

A Ángeles por su ayuda en citometría.

A la Dra. María Luisa Ferrer por la síntesis de los nanotubos de carbono.

Al Dr. David Wood por las construcciones que contenían las inteínas.

A Alfonso de Agroquímica de la UMH por los análisis realizados.

A María que nos facilitó los fibroblastos.

**De manera especial a nuestro grupo de trabajo:**

A Beatriz por su inestimable ayuda en esta tesis, la mayoría de este trabajo es suyo también. Gracias por tus consejos, gracias por tus correcciones, gracias por todo lo compartido y por tu amistad durante estos años.

A Maite, una de las primeras personas que conocí en España y una de las primeras que me tendió la mano, gracias por todo tu apoyo, ayuda técnica, consejos, y por tu amistad durante estos años.

A Eva, también por su ayuda técnica en el grupo, y por su disposición continua para escuchar y ayudar, gracias!!

A la "guajira" por el tiempo que compartimos en el lab., por su ayuda en cuestiones de PCR, oligos, etc. Muchas gracias!!

Graci: no tengo como agradecer tu amistad, eres una maravillosa persona y nunca podré olvidar toda la ayuda que me has brindado, todavía recuerdo ese momento de la llamada a la Embajada de Canadá, jajaja.... Gracias a tí pude reencontrarme con mi amor después de 1 año y medio. Gracias por todos los momentos que compartimos en el lab. y fuera de este, aunque casi siempre con algunos minutos de retraso.

Al grupo de trabajo de Auxi Prieto, del CIB, con el que colaboramos intensamente, gracias por toda la ayuda brindada. Gracias Auxi porque fuistes tú la que me puso en contacto con Jesús, en lo que fue el inicio de este camino.

**A mis orígenes:**

Al ICIDCA y mis compañeros de lab. en Cuba, dónde empecé a trabajar con los bioplásticos y que me dio la oportunidad de conocer a magníficas personas y profesionales de este campo como Helmut Brandl, Manfred Zinn, Auxi Prieto y Jesús Sanz.

**A mis nuevos amigos:**

A Alfonso por su amistad, por darme la oportunidad de conocer a su familia.

A Lou, que es otra de las maravillosas personas que he conocido. Gracias muchas por todo!!!

A Marce y Jose,

A Kike "el tiqui tiqui", gracias por tu amistad y por tu ayuda en cuestiones de informática. Al "Gayunbero" de Cheo por sus historias de horror y misterio, por su amistad. A Pablete, Alicia, Estefa, Reglita, Beatriz, María del Mar por toda la ayuda brindada y por su amistad. A Ainara por compartir tantos "buenos momentos" durante la realización de los trabajos del máster, ufffttttttttttt!!

A Rocío por sus consejos y por facilitarme los fosfolípidos,

A Sara por su ayuda en muchas cuestiones de electroquímica y por su amistad!!

**A mis amigos de siempre:**

Dasie, gracias por tus consejos, por tu ayuda con *Vitotag Biosciences*, por tu ayuda con Jenny, por tus continuos ánimos para seguir y por ser un ejemplo de superación. A Mari por toda su ayuda.

A Magdiel, hermano de batalla..... y al quién considero ya mi propia familia.

A Pedro, Yoelis, Alden, Rupert, Tania, Dani, Luis..... la liga extraordinaria.

A Tanita: gracias por tu ayuda, por tu amistad. Te quiero mucho.

De manera especial a Lisse y Ernesto, desde aquí mi cariño y agradecimiento por todo.

A Emily por su ayuda constante, confianza y por su amor.

A mi hermano David Piccot, siempre presente en todos los momentos.

Gracias a otra persona muy especial que conocí aquí en Elche y que me ayudó en primer lugar a mejorar como persona y también como profesional. Gracias al viejo y nunca bien ponderado José Martín, gracias por tu amistad..... y a tu familia: Pepi, Elier, el Oso y Sabe, que tanto me han ayudado durante esta época y a los que considero mi familia aquí en España.

**A mi familia, que han entendido y sabido sobreponerse a mí salida de Cuba y para los que estos tres años han sido mucho tiempo...**

A mis padres: a quien se lo debo todo y que siempre me lo han dado todo. Que a pesar de la situación, siempre hicieron lo imposible y se sacrificaron para que mi hermana y yo estudiáramos sin otra preocupación.

A mi madre, mi mayor fan, siempre ahí... y que hoy no pude estar aquí pero que siento como si estuviera.

A mi viejo, que ha sido de todo para mí.

A Efren, mi otro padre.

A mi hermana, a mi sobris, a mí cuñado por todo su amor y apoyo.

A mi esposa y su familia, que siempre han estado.

Bolita: siempre has sido mi inspiración, gracias por tu inestimable contribución en la realización experimental de este trabajo, gracias por tus múltiples contribuciones. Gracias por tu amor, gracias por entenderme y seguirme, gracias por ser así: ÚNICA, TE AMO!





## ***ÍNDICE***



<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1. LA IMPORTANCIA BIOTECNOLÓGICA DE LA INMOVILIZACIÓN DE PROTEÍNAS</b> .....	1
1.1 Soportes para la inmovilización de proteínas.....	2
1.1.1 Nanosoportes.....	3
1.2 Procedimientos para la inmovilización de proteínas.....	5
1.2.1 Métodos irreversibles.....	5
1.2.2 Métodos reversibles.....	8
1.2.3 Métodos por interacciones de afinidad.....	10
1.2.3.1 Estrategias para la eliminación de “tags” de afinidad .....	13
<b>2. PLÁSTICOS BACTERIANOS COMO SOPORTES SOSTENIBLES PARA LA INMOVILIZACIÓN DE PROTEÍNAS</b> .....	15
2.1 Polihidroxialcanoatos.....	15
2.2 Las fasinas, proteínas mayoritarias asociadas a los gránulos de polihidroxialcanoato.....	18
<b>3. PROTEÍNAS DE UNIÓN A COLINA DE <i>Streptococcus pneumoniae</i> COMO ETIQUETAS DE AFINIDAD</b> .....	21
3.1 El dominio de unión a colina de LytA (C-LytA).....	21
3.2 C-LytA como “tag” de afinidad.....	25
<b>II. OBJETIVOS</b> .....	29
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	31
<b>1. CEPAS BACTERIANAS Y PLÁSMIDOS</b> .....	31
1.1 Medios, condiciones de cultivo y de conservación.....	31
<b>2. LÍNEAS CELULARES Y LINFOCITOS</b> .....	32
2.1 Condiciones de cultivo.....	32
<b>3. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR</b> .....	32
3.1 Purificación de ADN.....	32
3.2 Preparación y transformación de células competentes.....	33
3.3 Electroforesis de ADN en geles de agarosa.....	33
3.4 Secuenciación de ADN.....	33
3.5 Oligonucléotidos.....	33
3.6 Construcción de los plásmidos pDB1 y pDB2.....	34
<b>4. TÉCNICAS DE TRABAJO CON PROTEÍNAS</b> .....	35
4.1 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida.....	35
4.2 Valoración de la concentración de proteína pura.....	35
4.3 Expresión y purificación de proteínas recombinantes.....	35
4.3.1 Eliminación de la etiqueta de afinidad C-LytA de la proteína Clyt-int-MBP en fase sólida.....	38
4.3.2 Eliminación de la etiqueta de afinidad C-LytA de la proteína Clyt-int-MBP en fase líquida.....	39
4.4 Ensayos de actividad enzimática.....	40
4.4.1 Actividad $\beta$ -galactosidasa.....	40
4.4.2 Actividad lacasa.....	40
4.4.3 Actividad D-aminoácido oxidasa.....	40
4.5 Preparación de gránulos artificiales de polihidroxialcanoatos.....	41
4.6 Inmovilización de proteínas que contienen la etiqueta de afinidad BioF a polihidroxialcanoatos.....	41
4.6.1 Caracterización de la interacción fasina-bioplástico.....	41
4.6.2 Desarrollo de plásticos bioactivos.....	42
4.7 Actividad de la proteína DAO en la proteína de fusión Clyt-DAO inmovilizada en nanobiorreactores.....	43
4.8 Terapia enzimática contra células tumorales.....	43
4.8.1 Tratamientos.....	43
4.8.2 Estudio de las fases del ciclo celular por citometría de flujo.....	44
4.8.3 Estudio de la integridad celular por microscopía de fluorescencia.....	44

4.9 Desarrollo de electrodos enzimáticos.....	45
4.9.1 Funcionalización de electrodos de grafito con <i>N,N</i> dietiletilendiamina mediante el método de sales de diazonio.....	45
4.9.2 Funcionalización con DEAE de andamios de nanotubos de carbono multi-pared.....	46
4.9.3 Inmovilización de enzimas en electrodos de grafito y andamios de MWCNTs.....	46
4.9.4 Evaluación de la proteína inmovilizada mediante voltametría cíclica.....	46
4.9.5 Amperometría.....	47
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>48</b>
<b>1. INMOVILIZACIÓN DE PROTEÍNAS EN POLIHIDROXIALCANOATOS MEDIANTE EL DOMINIO DE UNIÓN A BIOPLÁSTICOS DE LA FASINA PhaF.....</b>	<b>48</b>
1.1 Caracterización y estabilidad de la interacción PhaF-bioplástico.....	48
1.2 Adsorción de proteínas de fusión con BioF a PHB comercial.....	52
1.3 Aplicaciones biotecnológicas relacionadas con la interacción BioF- bioplástico.....	55
1.3.1 Biorreactores enzimáticos.....	55
1.3.2 Biodecoloración de colorantes textiles.....	56
1.3.2.1 <i>Obtención de la proteína de fusión BioF-CueO</i> .....	57
<b>2. LAS APLICACIONES DEL MÓDULO DE UNIÓN A COLINA.....</b>	<b>69</b>
2.1 Desarrollo de electrodos enzimáticos.....	69
2.1.1 Prueba de concepto: inmovilización de CLyt-βgal sobre electrodos de grafito.....	69
2.1.2 Transferencia directa de electrones: inmovilización de CLyt-DAO.....	75
2.1.2.1 <i>Inmovilización sobre electrodos de grafito</i> .....	75
2.1.2.2 <i>Inmovilización sobre nanotubos de carbono de pared múltiple</i> .....	78
2.2 Desarrollo de nanobiorreactores enzimáticos.....	80
2.2.1 Estudio de la capacidad de carga de CLyt-DAO en nanopartículas magnéticas.....	81
2.2.2 Caracterización de la actividad de la enzima inmovilizada sobre las nanopartículas magnéticas.....	82
2.2.3 Estabilidad de la proteína inmovilizada frente a temperatura, pH y fuerza iónica.....	83
2.2.4 Actividad de la enzima CLyt-DAO en ciclos sucesivos.....	87
2.2.5 Estudio de la inmovilización y purificación de CLyt-DAO en nanopartículas magnéticas a partir de extractos crudos.....	88
2.2.6 Regeneración de las nanopartículas magnéticas.....	91
2.3 Terapia enzimática contra células tumorales.....	92
2.4 Nuevo sistema de purificación de proteínas recombinantes a partir de las proteínas de fusión con C-LytA mediante el empleo de inteínas.....	98
2.4.1 Purificación en fase sólida.....	99
2.4.2 Mejora biotecnológica del procedimiento de purificación de proteínas mediante C-LytA en sistemas acuosos de dos fases (ATPS).....	102
<b>V. DISCUSIÓN.....</b>	<b>106</b>
<b>1. DOMINIO DE UNIÓN A BIOPLÁSTICOS.....</b>	<b>106</b>
1.1 Caracterización de la interacción BioF-polihidroxicanoatos comerciales (PHB).....	106
1.2 Polihidroxicanoatos bioactivos como biorreactores enzimáticos: ensayo y aplicación sobre biodegradación de colorantes de la industria textil.....	110
<b>2. DOMINIO DE UNIÓN A COLINA.....</b>	<b>114</b>
2.1 Desarrollo de electrodos enzimáticos.....	114
2.2 Desarrollo de nanobiorreactores.....	119
2.3 Terapia enzimática contra células tumorales.....	124
2.4 Nuevo sistema de purificación de proteínas recombinantes a partir de la proteína de fusión con C-LytA mediante el empleo de inteínas.....	126
<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>129</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>132</b>

<b>ADN</b>	ácido desoxirribonucleico
<b>AO</b>	naranja ácido 74
<b>APA</b>	ácido 4-amino fenilacético
<b>Ap<sup>r</sup></b>	resistencia a ampicilina
<b>ATPS</b>	sistema acuoso de dos fases
<b>AZ</b>	<i>azure</i> B
<b>βgal</b>	β-galactosidasa
<b>BioF</b>	dominio N-terminal de la fasina PhaF
<b>BSA</b>	albúmina de suero de bovino
<b>CB</b>	cibacron azul
<b>CBD</b>	dominio de unión a colina
<b>CBM</b>	módulo de unión a colina
<b>CBPs</b>	proteínas de unión a colina
<b>CBR</b>	repetición de unión a colina
<b>C-LytA</b>	dominio C-terminal de la autolisina LytA
<b>CNTs</b>	nanotubos de carbono
<b>C-terminal</b>	extremo carboxilo-terminal
<b>CWH</b>	hidrolasa de la pared celular
<b>DAO</b>	D-aminoácido oxidasa
<b>DEAE</b>	di-etilaminoetanol
<b>DEAEA</b>	<i>N,N</i> -dietiletilendiamina
<b>DMF</b>	2,6 dimetoxifenol
<b>dNTPs</b>	desoxirribonucleótidos
<b>DO</b>	densidad óptica
<b>DTT</b>	ditiotreitól
<b>ε</b>	coeficiente de absorción molar
<b>EA</b>	etanolamina
<b>EDAC</b>	1-etil-3-[3-(dimetilamino) propil]carbodiimida
<b>EDTA</b>	ácido etilendiaminotetraacético
<b>FAD</b>	dinucleótido de adenina-flavina
<b><i>g</i></b>	aceleración de la gravedad
<b>GAPs</b>	proteínas asociadas al gránulo de polihidroxialcanoato
<b>GFP</b>	proteína fluorescente verde
<b>GST</b>	glutación S- transferasa
<b>IC</b>	índigo carmín
<b>IMAC</b>	cromatografía de afinidad a iones metálicos
<b>IP</b>	yoduro de propidio
<b>IPTG</b>	isopropyl-β-D-1-tiogalactopiranosido
<b><i>k<sub>cat</sub></i></b>	constante catalítica
<b>kDa</b>	kilodalton
<b><i>K<sub>m</sub></i></b>	constante de Michaelis
<b>LB</b>	Luria-Bertani
<b>LTA</b>	ácido lipoteicoico
<b>MBP</b>	proteína de unión a maltosa
<b>mcl-PHAs</b>	polihidroxialcanoatos de cadena media

<b>MG</b>	verde malaquita
<b>MO</b>	naranja de metilo
<b>MWCNTs</b>	nanotubos de carbono multi-pared
<b>NADH</b>	dinucleótido de adenina-nicotinamida
<b>NAM</b>	ácido <i>N</i> -acetil murámico
<b>NC</b>	<i>new coccine</i>
<b>NHS</b>	<i>N</i> -hidroxisuccinimida
<b>nm</b>	nanómetros
<b>N-terminal</b>	extremo amino-terminal
<b>ONP</b>	<i>o</i> -nitrofenol
<b>ONPG</b>	<i>o</i> -nitro-fenil- $\beta$ -D-galactopiranosido
<b>PAP</b>	<i>p</i> -aminofenol
<b>PAPG</b>	<i>p</i> -aminofenil $\beta$ -D-galactopiranosido
<b>PBS</b>	tampón fosfato-salino
<b>PC</b>	fosforil colina
<b>PCR</b>	reacción en cadena de la polimerasa
<b>PEG</b>	polietilenglicol
<b>PHAs</b>	polihidroxialcanoatos
<b>PHB</b>	poli-3-hidroxibutirato
<b>PHBFL</b>	gránulos artificiales de PHB recubiertos con fosfolípidos
<b>PHBOL</b>	gránulos artificiales de PHB recubiertos con oleato de sodio
<b>PHO</b>	polihidroxi octanoato
<b>p/v</b>	relación peso/volumen
<b>RB5</b>	negro reactivo 5
<b>RB19</b>	azul reactivo 19
<b>ROS</b>	especies reactivas del oxígeno
<b>rpm</b>	revoluciones por minuto
<b>SAM</b>	monocapas autoensambladas
<b>scl-PHAs</b>	polihidroxialcanoatos de cadena corta
<b>SDS-PAGE</b>	electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes
<b>Sm<sup>r</sup></b>	resistencia a estreptomicina
<b>SDS</b>	dodecilsulfato sódico
<b>TA</b>	ácido teicoico
<b>TAE</b>	tampón Tris 40 mM, EDTA 1 mM, ácido acético 20 mM, pH 8,0
<b>Tag</b>	polipéptido o etiqueta de afinidad
<b>Tris</b>	tris (hidroximetil) aminometano
<b>UV</b>	ultravioleta
<b>V</b>	voltios
<b>VC</b>	voltimetría cíclica
<b>V<sub>max</sub></b>	velocidad enzimática máxima
<b>v/v</b>	relación volumen/volumen

**CÓDIGOS DE TRES Y UNA LETRA PARA AMINOÁCIDOS**

Ácido aspártico	Asp	D
Ácido glutámico	Glu	E
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Cisteína	Cys	C
Fenilalanina	Phe	F
Glicina	Gly	G
Glutamina	Gln	Q
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V





*Capítulo I*

**INTRODUCCIÓN**

UNIVERSITAS  
Miguel  
Hernández



## 1. LA IMPORTANCIA BIOTECNOLÓGICA DE LA INMOVILIZACIÓN DE PROTEÍNAS

La inmovilización de proteínas se define como “la localización de la misma en una determinada región definida del espacio con retención de su actividad catalítica y que puede ser utilizada continua y repetidamente” (Chibata, 1978). Este es un proceso de indudable importancia en Biotecnología, uno de cuyos aspectos más conocidos es el empleo de catalizadores relativamente caros como las enzimas en diversos procesos industriales que requieran la reutilización del catalizador para hacer el proceso económicamente viable (Guisán, 2006; Mateo y cols., 2007b; Khan y Alzohairy, 2010). El concepto puede extenderse asimismo a la creación de biomateriales en forma de partículas o superficies bioactivas con múltiples aplicaciones (electrodos, biosensores, terapia enzimática, etc.) (Spahn y Minter, 2008; Khan y Alzohairy, 2010; Sassolas y cols., 2012) y, por supuesto, a la purificación cromatográfica de proteínas (Wang y cols., 2012a).

Los sistemas de inmovilización de elementos biológicos se comenzaron a utilizar bajo bases completamente empíricas en procesos semi-industriales como la producción de vinagre, donde se utilizaban bacterias crecidas sobre virutas de madera para transformar el etanol en ácido acético (Hartmeier, 1988; Brena y Batista-Viera, 2006). Las bases del desarrollo actual en tecnología de inmovilización de proteínas se comenzaron a sentar a mediados del siglo XX (Brena y Batista-Viera, 2006). La primera utilización a nivel industrial de una enzima inmovilizada fue descrita en 1966 cuando se utilizó la aminoacilasa de *Aspergillus oryzae* para resolver mezclas racémicas de D-L aminoácidos (Tosa y cols., 1966). Posteriormente, entre los años 1985-1995, la inmovilización de biocatalizadores sufrió un considerable desarrollo, incluyendo la regeneración de cofactores enzimáticos y la inmovilización de células completas (Brena y Batista-Viera, 2006). Un ejemplo de lo anterior lo constituye la producción de L-aminoácidos a partir de  $\alpha$ -cetoácidos por aminación reductiva estereoselectiva con la L-aminoácido deshidrogenasa. El dinucleótido de adenina-nicotinamida (NADH) oxidado durante la reacción de aminación puede regenerarse mediante la reacción acoplada de oxidación del ácido fórmico, catalizada por la formato-deshidrogenasa (Brodellius y Mosbach, 1987).

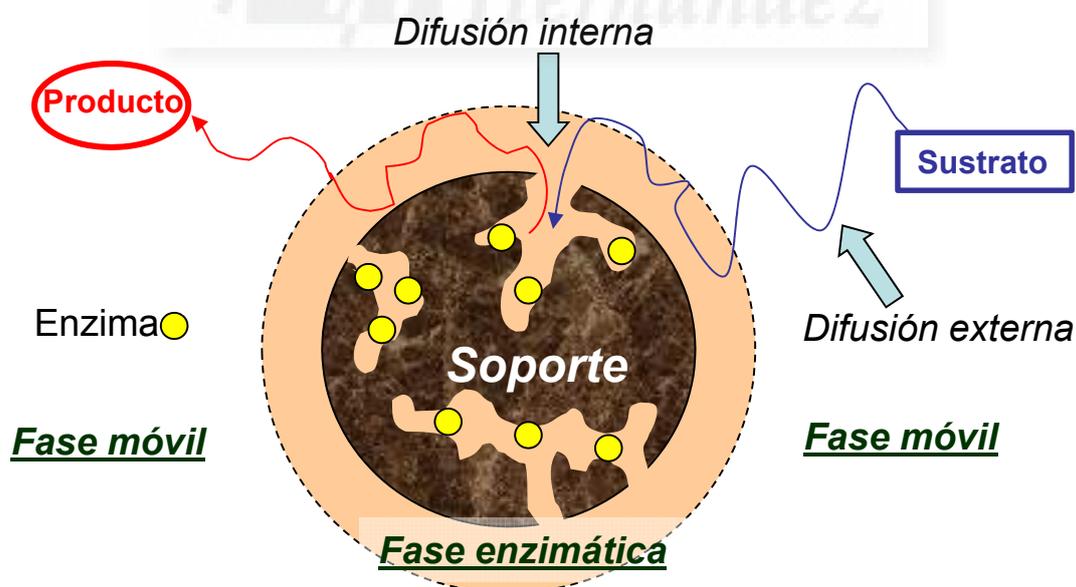
La inmovilización de enzimas es particularmente valiosa en la actualidad debido a que permite la reutilización de las mismas para catalizar una reacción determinada, con un aumento de los tiempos de vida media y una menor degradación. Además, permite y facilita tener un control más preciso de las reacciones que catalizan y ayuda a prevenir las contaminaciones entre los sustratos y/o productos de una reacción y las enzimas (Guisán, 2006; Spahn y Minter, 2008; Khan y Alzohairy, 2010). Los avances en el conocimiento de los sistemas de inmovilización han provocado

que la utilización de catalizadores caros y relativamente inestables como las enzimas se haya podido expandir a diversos campos del conocimiento y a la producción de múltiples productos biotecnológicos (Spahn y Minteer, 2008; Illanes y cols., 2012).

Las propiedades de una enzima inmovilizada están gobernadas por las suyas propias y por las del material o soporte destinado a su inmovilización. La interacción de estos dos componentes determina que en muchas ocasiones cambien las características bioquímicas, mecánicas y cinéticas de una enzima después de su inmovilización (Guisán, 2006; Talbert y Goddard, 2012).

### 1.1 Soportes para la inmovilización de proteínas

Las superficies de inmovilización juegan un papel fundamental y pueden decidir la utilidad de una determinada proteína cuando se encuentra inmovilizada. Los materiales deben cumplir con una serie de características para lograr que el sistema de inmovilización propuesto sea factible. Idealmente, el soporte debe ser un material asequible y con alta disponibilidad. El material debe proveer además una amplia área superficial y una elevada densidad de grupos funcionales que faciliten la inmovilización de la enzima. Además, debe garantizar una adecuada difusión de los sustratos y productos de la reacción enzimática (Khan y Alzohairy, 2010). Un aspecto importante y quizás el menos entendido de los sistemas de inmovilización es la interfaz formada entre la proteína, el soporte o material de inmovilización y la solución que contiene al sustrato (Figura 1).



**Figura 1.** Representación esquemática de los efectos locales que se producen en la interfaz formada entre la enzima y el soporte de inmovilización (fase enzimática) y la solución (fase móvil) que contiene al sustrato y al producto formado.

El microambiente que rodea a una proteína inmovilizada difiere del encontrado por la enzima libre en solución (Talbert y Goddard, 2012). La presencia de grupos cargados en la superficie del material o la disparidad hidrofóbica/hidrofílica entre el soporte y la solución puede conducir a la formación de gradientes de disolvente, sustrato e iones. Las limitaciones de transferencia de masa pueden reducir la difusión del sustrato a través de los poros del material del soporte. Adicionalmente, los materiales no porosos presentan capas que actúan como barrera a nivel de la interfaz y pueden influir en la transferencia del sustrato hacia la superficie de la enzima inmovilizada. Estos efectos de partición y transferencia de masa pueden modificar la velocidad de la reacción, el pH óptimo de trabajo de la enzima y la afinidad aparente por el sustrato (Guisán, 2006; Talbert y Goddard, 2012; Singh y cols., 2013).

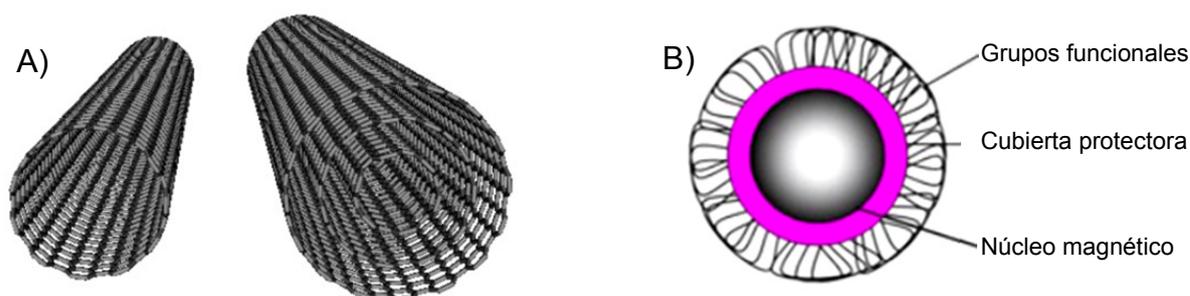
### 1.1.1 Nanosoportes

Parte de los problemas relacionados con las limitaciones de los soportes sólidos en la inmovilización de proteínas pueden contrarrestarse empleando nanomateriales. La nanotecnología de acuerdo a la “*National Nanotechnology Initiative*” (NNI) involucra la investigación y desarrollo a nivel atómico, molecular o macromolecular (en un rango normalmente inferior a los 100 nm) para crear estructuras, dispositivos y sistemas con propiedades funcionales novedosas. Su aplicación en procesos biotecnológicos recibe el nombre de nanobiotecnología.

Los nanomateriales sirven como soportes excelentes para la inmovilización de enzimas porque ofrecen las características ideales que determinan en muchos casos un aumento de la eficiencia catalítica. La inmovilización de enzimas en nanoestructuras reduce las limitaciones asociadas a la difusión de sustratos y productos, maximiza el área funcional superficial e incrementa significativamente la capacidad de carga (Feng y Ji, 2011; Ansari y Husain, 2012), lo que ejerce un impacto directo en la actividad de la enzima inmovilizada.

Estas características de los nanosoportes, combinada en muchos casos con su baja toxicidad y elevada biocompatibilidad y biodegradabilidad, hacen que los mismos encuentren cada día una mayor aplicación en investigaciones biomédicas relacionadas con el desarrollo de ensayos diagnóstico, sistemas de liberación de medicamentos, terapias enzimáticas personalizadas y en la regeneración de tejidos (De la Rica y cols., 2012; Koutsopoulos, 2012).

Entre los nanomateriales más atractivos para la inmovilización de proteínas se encuentran los nanotubos de carbono (CNTs) y las nanopartículas magnéticas (Figura 2).



**Figura 2.** Representación esquemática de nanoestructuras: A) Nanotubos de carbono de pared simple y múltiple, B) Nanopartícula magnética funcionalizada (adaptado a partir de: [www.chemicell.com](http://www.chemicell.com)).

Los CNTs son una forma alotrópica del carbono. Su estructura puede considerarse como una lámina de grafito enrollada sobre sí misma. Dependiendo del grado de enrollamiento, y la manera como se conforma la lámina original, el resultado puede llevar a nanotubos de distinto diámetro y geometría interna (Feng y Ji, 2011). De esta forma se pueden encontrar nanotubos de una sola pared o de pared múltiple (Figura 2A). Los CNTs se pueden producir por tres métodos fundamentales: descarga de arco voltaico, ablación láser y deposición química de vapor y exhiben de manera general extraordinarias propiedades mecánicas, eléctricas y térmicas. En la actualidad están siendo muy utilizados como sistemas de inmovilización de enzimas en aplicaciones especialmente relacionadas con la fabricación de células de biocombustible y biosensores (Feng y Ji, 2011; Vashist y cols., 2011). Los CNTs, que contienen en su estructura alargada un número muy elevado de anillos aromáticos, presentan diferencias mínimas de energía entre las bandas de valencia y conducción, lo que determina que el fenómeno de transferencia de electrones se realice de una manera muy eficiente (Chen y Tao, 2009).

Por último, muchas partículas y soportes magnéticos han sido empleados para la inmovilización de proteínas con buenos resultados (Ansari y Husain, 2012). Las nanopartículas magnéticas poseen la característica de poder ser manipuladas empleando campos magnéticos. Estas partículas presentan diámetros hidrodinámicos de 5 a 500 nm y pueden ser sintetizadas con diferentes composiciones y fases, incluyendo óxidos de hierro, tales como el  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  y  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , metales puros como el Fe y Co y aleaciones como  $\text{CoPt}_3$  y FePt (Schüth y cols., 2007). Hay varios métodos que se utilizan para la síntesis de nanopartículas magnéticas, encontrándose entre los más populares la coprecipitación, la descomposición térmica y/o reducción, la síntesis micelar, la síntesis hidrotermal y las técnicas de pirolisis láser (Schüth y cols., 2007). Después de la síntesis, estos núcleos magnéticos se protegen y estabilizan recubriéndolos con capas de otros compuestos que impiden la entrada de oxígeno al núcleo, evitando así fenómenos de oxidación y descomposición. Usualmente los núcleos se pueden proteger con dos grandes grupos de compuestos: los orgánicos (incluyendo

surfactantes y polímeros) y recubrimientos inorgánicos como sílica, carbón o metales preciosos como Ag y Au (Schüth y cols., 2007). Estas cubiertas no sólo protegen y estabilizan la nanopartícula de la oxidación y la degradación sino que además son con mucha frecuencia empleadas para funcionalizar el nanomaterial con componentes y grupos funcionales de interés (Figura 2B). Ésto, además de la fácil separación y manejo de las nanopartículas, ha impulsado y diversificado enormemente la utilización de estos nanomateriales en diversas investigaciones y aplicaciones biomédicas y biotecnológicas. Así podemos encontrarlas en aplicaciones en disciplinas diversas tales como: la inmovilización y purificación de proteínas y enzimas (Schüth y cols., 2007; Ansari y Husain, 2012), la construcción de celdas de biocombustibles (Schüth y cols., 2007; Ansari y Husain, 2012), el desarrollo de biosensores (Ansari y Husain, 2012; Sassolas y cols., 2012), la remediación medio-ambiental (Akbarzadeh y cols., 2012; Ansari y Husain, 2012), y en aplicaciones biomédicas relacionadas fundamentalmente con el desarrollo de equipamiento médico (resonancia magnética de imagen), en el tratamiento de diversas enfermedades y como sistemas de liberación de medicamentos y genes (Schüth y cols., 2007; Akbarzadeh y cols., 2012; Kim y cols., 2012).

## **1.2 Procedimientos para la inmovilización de proteínas**

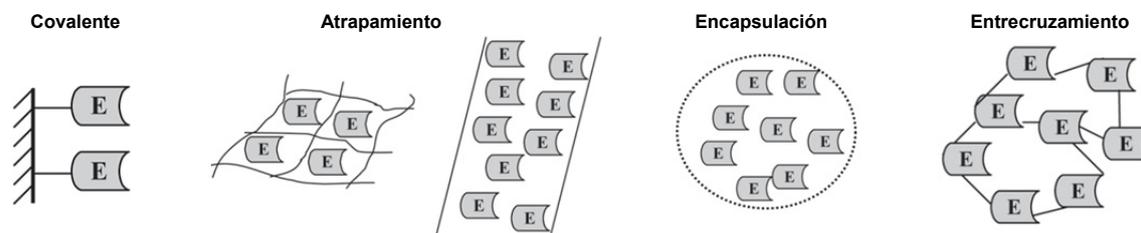
El proceso de inmovilización elegido debe compatibilizar fortaleza y especificidad de unión con retención de la funcionalidad de la proteína y hasta donde sea posible, que el soporte de inmovilización pueda ser regenerado con facilidad para su reutilización. Generalmente la elección de la estrategia más adecuada para la inmovilización de una proteína está determinada por las características físico-químicas de la superficie o soporte de inmovilización y de la proteína en cuestión, así como del uso final.

A lo largo de los años se han venido desarrollando varias estrategias de inmovilización, esencialmente siguiendo mecanismos físicos, covalentes y de bio-afinidad (Brena y Batista-Viera, 2006; Rusmini y cols., 2007). En función de la capacidad de regeneración del sistema, los métodos de inmovilización pueden clasificarse en reversibles e irreversibles (Brena y Batista-Viera, 2006). A continuación se describen las características generales de los mismos.

### **1.2.1 Métodos irreversibles**

El concepto de método de inmovilización irreversible se refiere a que una vez que la proteína se encuentra “unida” al soporte esta no puede separarse del mismo sin destruir su actividad biológica o el soporte (Brena y Batista-Viera, 2006). Los procedimientos más comunes de inmovilización

irreversible son el de unión covalente, el atrapamiento, la encapsulación y la inmovilización por entrecruzamiento (Figura 3).



**Figura 3.** Representación esquemática de métodos irreversibles de inmovilización (tomado de Brena y Batista-Viera, 2006)

La inmovilización mediada por la formación de un enlace covalente es uno de los métodos que más comúnmente se utilizan para unir proteínas a diferentes materiales o soportes (Rusmini y cols., 2007). La principal ventaja de este método es que debido a la naturaleza estable de los enlaces formados entre el soporte y la proteína, la misma no es liberada a la solución, no habiendo pérdidas de proteína durante el proceso de utilización. Ésto resulta particularmente ventajoso cuando se requiere estrictamente que no haya residuos de proteína en el producto final. Además, en aquellos casos más favorables, la formación de nuevos enlaces covalentes pueden estabilizar apreciablemente a la proteína. Sin embargo, para conseguir altos niveles de actividad inmovilizada, los aminoácidos esenciales para la catálisis no deben estar involucrados en los enlaces covalentes formados con los soportes y ésto muchas veces es difícil de controlar. Por este motivo es deseable que la inmovilización se lleve a cabo a través de residuos no esenciales, lo cual obliga a tener un amplio conocimiento de la estructura de la proteína, o alternativamente en presencia del sustrato o de un inhibidor competitivo que proteja el centro activo (Brena y Batista-Viera, 2006; Mateo y cols., 2007b; Rusmini y cols., 2007; Batalla y cols., 2012). Se han desarrollado un gran número de reacciones para la inmovilización covalente de proteínas dependiendo de los grupos funcionales expuestos en el soporte o la matriz de inmovilización (Tabla 1).

De manera general, el curso de la inmovilización covalente de proteínas pasa en primer lugar por la activación de las superficies para generar grupos electrofílicos, que durante el proceso de inmovilización reaccionan con grupos nucleofílicos fuertes presentes en la estructura de la proteína (Brena y Batista-Viera, 2006). En el caso de las proteínas, las cadenas laterales de los aminoácidos: lisina (grupo amino) (Guisán y cols., 1991; Marques y cols., 2011; Batalla y cols., 2012), cisteína (tiol) (Kim y cols., 2010; Godoy y cols., 2011), ácidos aspártico y glutámico (carboxilo) (Fernández-Lafuente y cols., 1993) y serina y treonina (hidroxilo) (Mateo y cols., 2007a), son las

que con mayor frecuencia son utilizadas en reacciones de inmovilización. De esta forma la enzima queda unida al soporte con mucha frecuencia por enlaces estables tipo amida, éter, tio-éter o carbamato (Brena y Batista-Viera, 2006; Rusmini y cols., 2007). Adicionalmente, la inmovilización covalente aumenta la rigidez estructural de la enzima, limitando el grado de movimiento lo que en la mayoría de los casos puede conllevar a una modificación sustancial de sus parámetros cinéticos ( $K_m$ ,  $k_{cat}$ ) (Brena y Batista-Viera, 2006; Spahn y Minteer, 2008).

Tabla 1. Grupos funcionales comúnmente disponibles en proteínas y funcionalidades requeridas en las superficies de inmovilización (adaptado a partir de Rusmini y cols., 2007).

Proteína		Superficie de inmovilización
Grupos laterales	Aminoácidos	
- NH <sub>2</sub>	Lys, hidroxil-Lys	ácido carboxílico, éster activo (NHS), epoxi-activada, aldehído
- SH	Cys	maleimida, piridil-disulfuro,vinil-sulfona
- COOH	Asp, Glu	aminada
- OH	Ser, Thr	epoxi-activada

Los métodos de inmovilización covalente conllevan en muchos casos a orientaciones no deseadas de la proteína en la superficie o soporte de inmovilización. Sin embargo, se han descrito procedimientos covalentes de inmovilización de proteínas donde se minimiza este fenómeno, y al mismo tiempo se logra que la proteína inmovilizada sea funcional (Batalla y cols., 2008a,b; Batalla y cols., 2012). Un ejemplo de lo anterior lo constituye la inmovilización de un anticuerpo policlonal (antiHRP-IgG, HRP: peroxidasa de rábano picante) en agarosa activada con grupos quelantes de metales y glioxilos (Ag-Me<sup>2+</sup>/G). Los anticuerpos se conjugaron al soporte a través de enlaces de coordinación entre los residuos de histidina de los anticuerpos (mayoritarios en su región Fc) y los metales, y seguidamente fueron incubados bajo condiciones alcalinas para promover la unión covalente intramolecular entre los residuos de lisina de la región Fc (alejada de la zona de interacción con el antígeno) y los grupos glioxilo expuestos en la superficie del soporte. El bioconjugado resultante fue inerte y unió específicamente su antígeno (HRP), sin significativa unión inespecífica de otras proteínas, resultando en una magnífica plataforma para la purificación de HRP (Batalla y cols., 2012).

Una variante de la inmovilización covalente lo constituye la inmovilización por entrecruzamiento, en donde la enzima de interés se enlaza covalentemente con ella misma o con otras proteínas inertes, como la albumina de suero bovino, utilizando agentes bifuncionales como el glutaraldehído (Nakagawa y cols., 1989; Gao y cols., 2010). De esta manera, la enzima es el propio

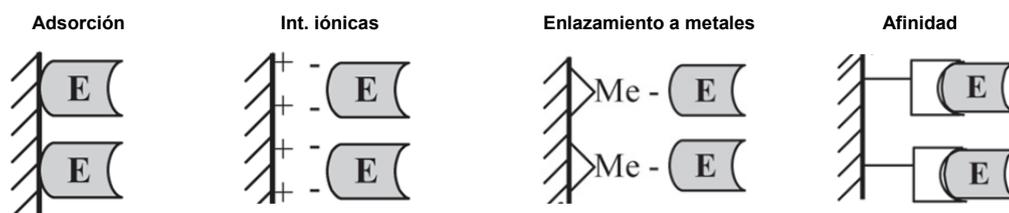
soporte, por lo que la transferencia de masa con el disolvente está muy favorecida. Este método es muy simple y económico pero sufre los mismos inconvenientes de la inmovilización covalente debido a la probable distorsión de la conformación nativa de la enzima y las alteraciones que pueda sufrir el sitio activo de la misma durante el proceso de entrecruzamiento (Sassolas y cols., 2012).

Por su parte el método de atrapamiento está basado en la inclusión de la proteína de interés dentro de una red polimérica (polímeros, geles, fibras) que permite el paso de sustratos y productos a través de ella pero que retiene la macromolécula (revisado por Sassolas y cols., 2012). Esto normalmente minimiza las pérdidas de enzima e incrementa su estabilidad, si bien el uso práctico de este método es limitado por las deficiencias que presenta en términos de transferencia de masa (Brena y Batista-Viera, 2006; Spahn y Minteer, 2008).

Debido a su fácil preparación, reproducibilidad y bajo coste los métodos de encapsulación resultan particularmente interesantes. En el proceso de encapsulación la proteína queda atrapada en una matriz polimérica, sin establecer ninguna interacción covalente con ésta y con cierta libertad de movimiento que permite la unión al sustrato y la catálisis (Campàs y Marty, 2006). Al igual que en los métodos de atrapamiento, se logra proteger a la proteína del medio externo, minimizando su pérdida o el ataque de agentes externos. Para la encapsulación pueden utilizarse matrices poliméricas e inorgánicas. La tecnología conocida como “sol-gel”, basada en la habilidad de formar matrices de porosidad definida de óxidos metálicos, sílica y organosiloxanos por reacción con precursores orgánicos, es una de las más utilizadas para la encapsulación de biomoléculas (Hench y West, 1990; Sassolas y cols., 2012). De manera general, los métodos de encapsulación son muy utilizados en aplicaciones terapéuticas y sistemas de liberación controlada de medicamentos, aunque son mecánicamente inestables y presentan importantes limitaciones de transferencia de masa sobre todo durante la catálisis de sustratos grandes (Brady y Jordaan, 2009).

### **1.2.2 Métodos reversibles**

En lo que respecta a los métodos reversibles de inmovilización, la unión entre el soporte y la proteína se produce bajo condiciones suaves por lo que es posible eluir con relativa facilidad la proteína del soporte (Figura 4). El uso de estos métodos resulta muy atractivo desde el punto de vista operativo, porque cuando la actividad de la enzima inmovilizada disminuye, la misma puede ser eluida y el soporte regenerado y recargado con una preparación fresca de la proteína.



**Figura 4.** Representación esquemática de métodos reversibles de inmovilización (tomado de Brena y Batista-Viera, 2006).

El método más simple de inmovilización reversible es la adsorción física, mediante el cual las proteínas están conectadas a la matriz por una variedad de enlaces: puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, fuerzas de Van der Waals, etc. La naturaleza de estas fuerzas es generalmente débil y por tanto altamente influenciadas por un cambio en las condiciones ambientales iniciales que propiciaron la unión (pH, fuerza iónica, temperatura) (Brena y Batista-Viera, 2006; Sassolas y cols., 2012). La inmovilización por adsorción es un método suave, fácil de llevar a cabo y por lo general la enzima conserva su actividad catalítica. Sin embargo, este método es inespecífico y debido a la naturaleza y moderada fortaleza de la interacción suele haber mucha desorción de proteína durante su utilización (Brena y Batista-Viera, 2006; Spahn y Minter, 2008).

Otro tipo de inmovilización reversible es la mediada por interacciones de tipo electrostático. La inmovilización se produce cuando interaccionan grupos cargados en la proteína con zonas superficiales cargadas del soporte (Brena y Batista-Viera, 2006). Este tipo de interacción ha sido muy utilizada en sistemas de purificación de proteínas por cromatografía empleando intercambiadores catiónicos y aniónicos (revisado por Lillehoj y Malik, 1989). Es un método simple y reversible, aunque la utilización de soportes altamente cargados, cuando los sustratos y/o productos también presentan cargas, puede favorecer la presencia de fenómenos de difusión y partición que afecten el pH óptimo, la estabilidad y la actividad de la enzima (Brena y Batista-Viera, 2006; Sassolas y cols., 2012).

Adicionalmente es posible inmovilizar una proteína a una superficie por enlazamiento a metales. Las sales y los hidróxidos de algunos metales de transición (Zr, Ti) depositados en la superficie del soporte pueden coordinarse con los grupos nucleofílicos de la matriz (Brena y Batista-Viera, 2006). Los grupos de la matriz no pueden ocupar todas las posiciones de coordinación de los metales, por lo que las posiciones que quedan libres se coordinan con grupos en las proteínas. El método es muy simple pero puede adolecer de falta de reproducibilidad debido fundamentalmente a la existencia de sitios de adsorción no uniforme y a la pérdida apreciable de

iones metálicos del soporte (Brena y Batista-Viera, 2006). Esto se ha podido mejorar utilizando soportes a los que previamente se le unían covalentemente agentes quelantes, lo que ha permitido que la coordinación del metal a la matriz gane en estabilidad (Brena y Batista-Viera, 2006; Sassolas y cols., 2012). De aquí se han desarrollado los soportes con alta capacidad quelante que en la actualidad son muy utilizados en la cromatografía de afinidad a metales para la purificación de proteínas (cromatografía IMAC, “*immobilized metal affinity chromatography*) (Hochuli y cols., 1988; Waugh, 2005; Uhlén, 2008), como se verá más adelante.

Los métodos de inmovilización reversible citados, al ser métodos más suaves que los covalentes, permiten retener la mayor parte de la actividad de la proteína, y regenerar con facilidad las superficies y/o soportes empleados. Sin embargo, de manera general son métodos poco específicos y que en muchos casos no pueden evitar que la proteína inmovilizada se libere del soporte progresivamente con pequeños cambios ambientales o por la propia reutilización. Por este motivo, con el objeto de compatibilizar especificidad y fortaleza de interacción, se han desarrollado diversos métodos de inmovilización por afinidad que se detallan a continuación.

### **1.2.3 Métodos por interacciones de afinidad**

Los procesos celulares de los sistemas biológicos están basados en una compleja red de interacciones específicas entre biomoléculas que pueden llegar a ser de muy alta afinidad (en el rango de los picomoles). En el ámbito científico, las reacciones de afinidad han sido utilizadas como una herramienta para estudiar procesos celulares en tejidos sanos y enfermos, pero también para desarrollar productos terapéuticos y ensayos analíticos y de diagnóstico basados en la afinidad entre un producto y una biomolécula diana (Uhlén, 2008). El uso extendido de este tipo de reacciones comienza a finales de la década de los 60 del siglo pasado, cuando se logró purificar en un solo paso avidina de huevo por cromatografía de afinidad en columnas de sefarosa funcionalizadas con biocitina (Cuatrecasas y Wilchek, 1968). Posteriormente y basados en otras interacciones de afinidad comenzaron a describirse otros sistemas que permitieron la purificación de diversas proteínas. De esta forma se logró desarrollar, por ejemplo, la purificación de anticuerpos por cromatografía de afinidad en matrices que contenían como ligando la proteína recombinante A (Uhlén y cols., 1984) o G (Guss y cols., 1986). En la actualidad, la mayoría de los anticuerpos monoclonales que se utilizan en investigación y diagnóstico, y esencialmente los que se utilizan en el tratamiento de diversas enfermedades son purificados por cromatografía de afinidad (Uhlén, 2008).

Teniendo en cuenta estos fundamentos, el empleo de las reacciones de afinidad para la inmovilización de proteínas en soportes o superficies que contienen grupos o ligandos afines a las mismas se ha extendido considerablemente. Debido a las ventajas que ofrecen estos sistemas y al desarrollo acelerado que han tenido disciplinas relacionadas con la genómica y la proteómica, se han venido desarrollando múltiples polipéptidos o etiquetas de afinidad (“tags”), que fusionados a una proteína de interés han permitido su inmovilización a soportes y ligandos afines al *tag* y en muchos casos su posterior purificación en un solo paso (Waugh, 2005; Arnau y cols., 2006; Uhlén, 2008; Fong y cols., 2010; Young y cols., 2012). Los polipéptidos de afinidad pueden definirse como secuencias de aminoácidos exógenos con una alta especificidad por ligandos químicos o biológicos (Arnau y cols., 2006). La primera cola de afinidad fue descrita en 1983 y estaba basada, como se ha mencionado más arriba, en la proteína A del estafilococo (Uhlén y cols., 1983). A partir de entonces se han logrado desarrollar una gran variedad de sistemas con diferentes etiquetas de afinidad (revisado por Young y cols., 2012).

Entre las colas de afinidad más utilizadas en la actualidad se encuentran: la cola de polihistidinas (*His-tag*) (Hochuli y cols., 1987), la proteína de unión a maltosa (*MBP-tag*) (Di Guan y cols., 1988) y la glutatión S-transferasa (*GST-tag*) (Smith y Johnson, 1988). La etiqueta de afinidad que probablemente se utiliza con una mayor frecuencia es el “*His-tag*” o cola de histidinas, que consiste en un péptido corto de residuos de histidina, normalmente 6, que muestra afinidad por metales de transición, lo que ha permitido la purificación de diferentes proteínas de fusión por cromatografía de afinidad a iones metálicos (IMAC) (Hochuli y cols., 1988; Porath, 1992). Los soportes más extendidos en IMAC utilizan el ácido nitrilo-triacético como ligando para la inmovilización de diferentes metales ( $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ) (Arnau y cols., 2006).

El número de aplicaciones biomédicas y biotecnológicas en los que en la actualidad se utilizan este tipo de sistemas está en continuo crecimiento, de ahí que los estudios relacionados con el desarrollo de nuevos polipéptidos de afinidad para la inmovilización de proteínas sea una temática que despierta un continuo interés científico. Por otro lado, no existe una regla específica que determine el empleo o no de una determinada etiqueta de afinidad para la inmovilización y/o purificación de una proteína, puesto que todas presentan ventajas y desventajas dependiendo de la aplicación para la que se quiera utilizar la proteína, los requerimientos de especificidad, solubilidad y las condiciones de unión y elución (Tabla 2).

Tabla 2. Estudio comparativo de los "tags" de afinidad más utilizados en la purificación e inmovilización de proteínas recombinantes

Sistema	Tamaño	Soporte	Tampones	Incompatibilidades	Nivel de purificación	Aplicación industrial a gran escala	Otras características
<b>LYTAG</b>	16 kDa	- Muchos soportes disponibles comercialmente. - Regenerables - Uniones y eluciones múltiples posibles para la misma muestra.	- <b>Ópticamente transparentes</b>	- Aminas terciarias o cuaternarias > 30 mM	- <b>Sin contaminantes</b>	- <b>Factible</b>	- Existe protocolo de purificación a partir de cuerpos de inclusión - No contiene cisteínas
<b>IMAC</b>	<b>840 Da</b>	- <b>Soportes caros</b> - Necesitan ser activados con metales. - Regenerabilidad limitada - Uniones y eluciones múltiples posibles para la misma muestra.	- <b>Interferencia óptica (imidazol)</b>	- Quelantes (EDTA, EGTA). - Reductores (DTT, $\beta$ -mercaptoetanol). - Interferencia con aminas y detergentes aniónicos.	- Se han descrito contaminantes persistentes en determinados casos: rotamasa SLYD, superóxido dismutasa, etc...	- <b>Factible</b> , pero dificultada por el elevado precio del soporte y su mantenimiento	- <b>Existe protocolo de purificación en condiciones desnaturalizantes</b> - No contiene cisteínas
<b>MBP</b>	42 kDa	- <b>Soportes caros</b> - Poca disponibilidad comercial - Regenerabilidad limitada - Uniones y eluciones múltiples complicadas por la difícil dialisis del ligando eluyente (maltoza)	- <b>Ópticamente transparentes</b>	- Detergentes iónicos - Lisozima - Amilasas	- <b>Sin contaminantes</b>	- <b>Factible</b> , pero el elevado precio del soporte y su mantenimiento	
<b>GST</b>	25 kDa	- <b>Soportes caros</b> - Poca disponibilidad comercial - Es necesario a veces subir el pH para provocar la elución	- <b>Interferencia del ligando eluyente (glutión) en la cuantificación de proteínas y en la digestión por factor Xa.</b>	- <b>Compatible con una variedad de detergentes</b>	- Se han descrito contaminantes persistentes en determinados casos: DnaK, DnaJ, GroEL, GroES, etc..	- <b>Factible</b> , pero el elevado precio del soporte y su mantenimiento	- Contiene cisteínas (puede sufrir agregación por oxidación) - Homodímero: puede interferir en la purificación de proteínas oligoméricas.
<b>FLAG</b>	<b>1 kDa</b>	- <b>Soportes muy caros y de reducida capacidad</b> - Poca disponibilidad comercial	- <b>Interferencia óptica (benzamida)</b>	- <b>No hay descritas</b>	- <b>Sin contaminantes</b>	- <b>Muy difícil por el elevado precio del soporte y del ligando eluyente (péptido FLAG)</b>	- <b>Rendimiento muy reducido, sólo aplicable a estudios analíticos.</b>

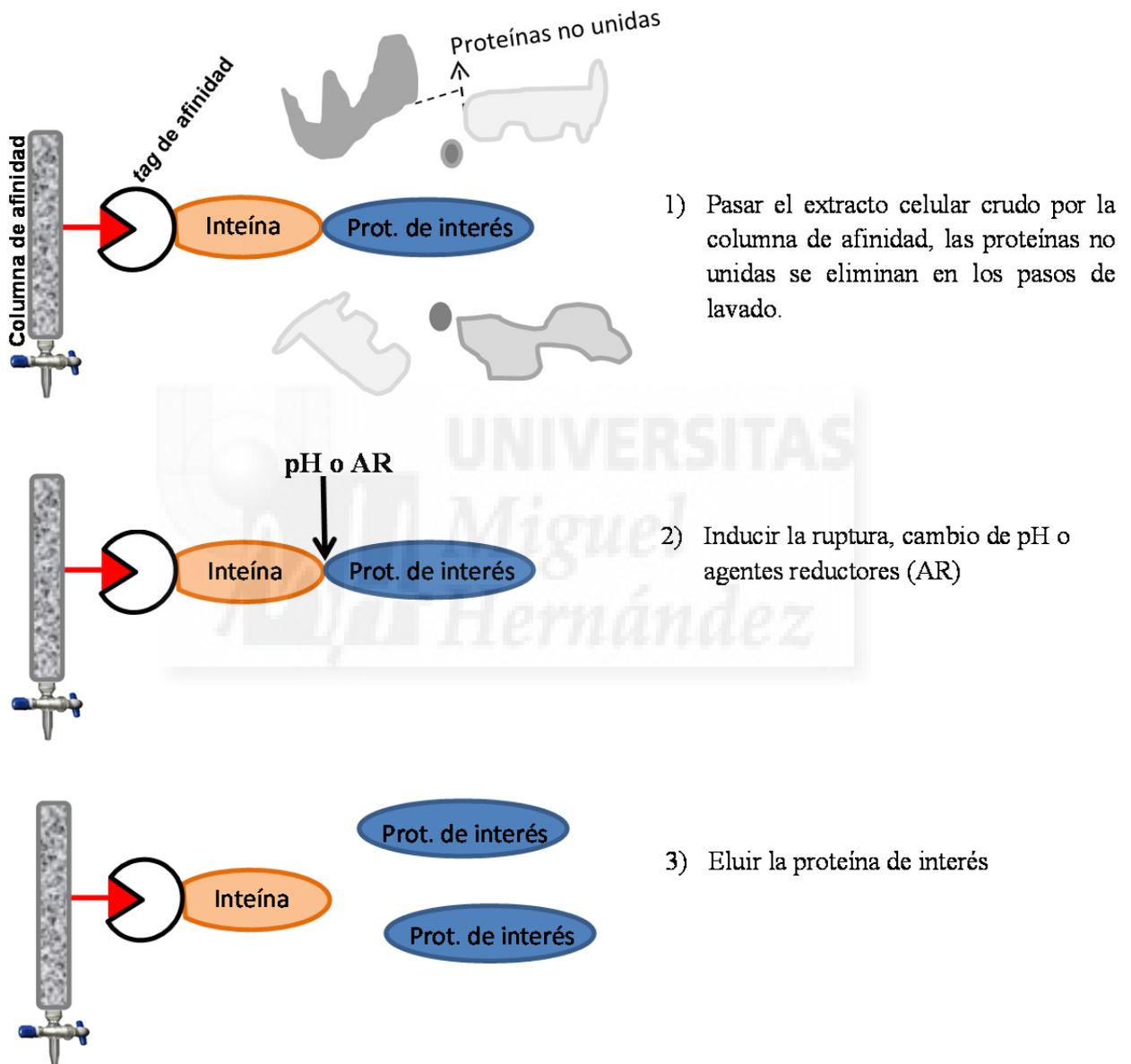
### 1.2.3.1 Estrategias para la eliminación de “tags” de afinidad

En procedimientos de purificación de proteínas por cromatografía de afinidad, es necesario resaltar que, en ocasiones, la introducción de la cola de afinidad puede repercutir positivamente en las propiedades bioquímicas de la proteína en cuestión. Se han descrito casos en los que la etiqueta ha incrementado la expresión, prevenido la proteólisis, facilitado el replegamiento y aumentado la solubilidad de la proteína (Arnau y cols., 2006; Young y cols., 2012). Por el contrario, la cola de afinidad también puede provocar una disminución en los rendimientos, cambios conformacionales indeseados, inhibición de la actividad enzimática y alteraciones en la actividad biológica de la proteína de fusión resultante (Terpe, 2003; Waugh, 2005; Arnau y cols., 2006; Young y cols., 2012).

Debido a estas razones y a la necesidad en muchas ocasiones de utilizar en determinados procesos sólo el segmento correspondiente a la proteína de interés (por ejemplo, en aplicaciones terapéuticas), resulta importante el desarrollo de estrategias que permitan, una vez purificada la proteína de fusión, eliminar específicamente la etiqueta de afinidad empleada. Ésto en muchas ocasiones es un problema importante debido a la ausencia de procedimientos que garanticen, a la vez, una alta especificidad y rendimiento. Los métodos hidrolíticos químicos (bromuro de cianógeno, hidroxilamina) precisan condiciones a menudo extremas que pueden afectar a la estructura de la proteína y producir su desnaturalización (Arnau y cols., 2006; Li, 2011). Por su parte, los métodos enzimáticos basados en la utilización de proteasas dependientes de secuencia (factor Xa, enteroquinasa, trombina, o proteasas víricas como la del virus del mosaico del tabaco-TEV) son procedimientos más suaves, pero no siempre suficientemente específicos, que muchas veces dejan aminoácidos adicionales en la proteína y en los que los rendimientos globales son variables y dependientes en gran medida de la conformación de la proteína (Waugh, 2011). Además, estos procedimientos son efectivos a escala de laboratorio, pero a nivel industrial son prácticamente inviables por el elevado coste asociado a las endopeptidasas y a los pasos adicionales de purificación que se necesitan para separar las proteasas de la proteína recombinante de interés (Banki y Wood, 2005).

Una estrategia para abordar esta problemática contempla la utilización de etiquetas de afinidad auto-escindibles bajo ciertas condiciones químicas o ambientales. Entre estas etiquetas caben destacar las inteínas (del inglés *INTervening protEINS*) (Banki y Wood, 2005; Fong y cols., 2010; Li, 2011), segmentos proteicos auto-escindibles que juegan un papel fundamental en la maduración post-traducciona de proteínas (Perler y cols., 1994) y que también pueden emplearse para la

purificación de polipéptidos (Banki y Wood, 2005) (Figura 5). De acuerdo al estímulo que induce la actividad autoproteolítica las inteínas se dividen en dos grupos. En el primer grupo se encuentran aquéllas en las que un cambio de pH induce actividad autoproteolítica en el extremo C-terminal. La inteína Ssp DnaB, comercializada por *New England Biolabs*, es la inteína inducible por pH que más ha sido utilizada hasta la actualidad (Fong y cols., 2010).



**Figura 5.** Representación esquemática (no a escala) del sistema de purificación de proteína recombinante que combina la utilización de *tags* de afinidad y de segmentos con actividad auto-proteolítica inducible como las inteínas.

Por otro lado, en el segundo grupo se encuentran las que presentan actividad autoescindible en presencia de compuestos que contengan grupos tioles como el ditioneitol (DTT) y el  $\beta$ -

mercaptoetanol (Fong y cols., 2010). Aquí se incluiría el primer sistema comercial de purificación empleando estos péptidos, también desarrollado por *New England Biolabs* y basado en la inteína de la subunidad A de la ATPasa vacuolar de *Saccharomyces cerevisiae* (*Sce* VMA) (Chong y cols., 1997).

Es necesario aclarar que los sistemas de eliminación de etiquetas de afinidad basado en inteínas inducibles por pH en algunas ocasiones presentan el problema de ruptura prematura de la proteína de fusión, muchas veces durante la etapa de expresión intracelular de la proteína recombinante. Esto disminuye los rendimientos globales del sistema y constituye la principal desventaja de este sistema en comparación con los métodos enzimáticos y químicos (Fong y cols., 2010), si bien las más recientes investigaciones en este campo están orientadas a la minimización de este problema (Shi y cols., 2013).

## **2. PLÁSTICOS BACTERIANOS COMO SOPORTES SOSTENIBLES PARA LA INMOVILIZACIÓN DE PROTEÍNAS**

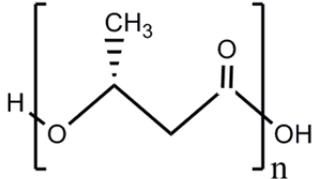
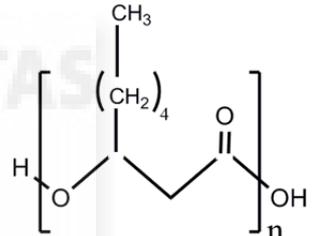
### **2.1 Polihidroxicanoatos**

Los polihidroxicanoatos (PHAs) son una familia de poliésteres termoplásticos de ácidos (*R*)-hidroxicanoicos, que se acumulan en forma cuerpos de inclusión (gránulos) en el citoplasma de algunas bacterias y que constituyen una fuente de carbono y reserva de energía importante durante períodos de limitación de nutrientes (Madison y Huisman, 1999; Lenz y Marchessault, 2005). Los gránulos de PHAs están formados por un núcleo polimérico (93-97 %, en peso seco), rodeado por una monocapa de fosfolípidos (1-6 %) y asociadas a esta estructura un conjunto de proteínas que no superan el 2 % del peso seco del gránulo (Steinbüchel y cols., 1995). Entre las proteínas asociadas a los gránulos de PHAs (GAPs) podemos encontrar cuatro tipos fundamentales: las PHAs sintetasas, responsables de la síntesis del polímero; las PHAs despolimerasas, implicadas en la degradación intracelular del bioplástico y en la movilización de las unidades monoméricas; las fasinas, con funciones estructurales y reguladoras, y un cuarto grupo más heterogéneo y menos caracterizado formado por otras proteínas con funciones menos conocidas (Steinbüchel y cols., 1995; Jendrossek, 2009).

El primer miembro de esta familia de polímeros bacterianos, el poli-3-hidroxiбутirato o PHB, fue descubierto en *Bacillus megaterium* (Lemoigne, 1926). En la actualidad se han descrito más de 150 monómeros como posibles constituyentes de estos polímeros, por lo que el número teórico de

co-polímeros de PHAs que se pueden formar, con una gran variedad de propiedades físico-químicas y funciones, es muy grande (Steinbüchel y Valentin, 1995; Jendrossek, 2009). Dependiendo de la longitud de la cadena de carbono que conforma la unidad monomérica, éstos se pueden dividir en: PHAs de cadena corta ( $C_3$ - $C_5$ , scl-PHAs) como el PHB; de cadena media ( $C_6$ - $C_{14}$ , mcl-PHAs) como el poli-hidroxiocetanoato (PHO) (Tabla 3); y de cadena larga para unidades monoméricas de más de catorce átomos de carbono (Zinn y cols., 2001).

Tabla 3. Estructura y algunas propiedades de los bioplásticos PHB y PHO. Los datos son determinaciones experimentales tomadas de Wang y cols., 2011a.  $T_g$ , temperatura de transición vítrea,  $T_m$ , temperatura de fusión,  $T_d$ , temperatura de descomposición para lograr un 5 % de pérdida de peso, n, número de repeticiones del monómero.

Tipo de PHA	Propiedades			Estructura
	$T_g$ (°C)	$T_m$ (°C)	$T_d$ (°C)	
<b>PHB</b>	-3,08	163,30	227,84	
<b>PHO</b>	-38,38	66,06	256,22	

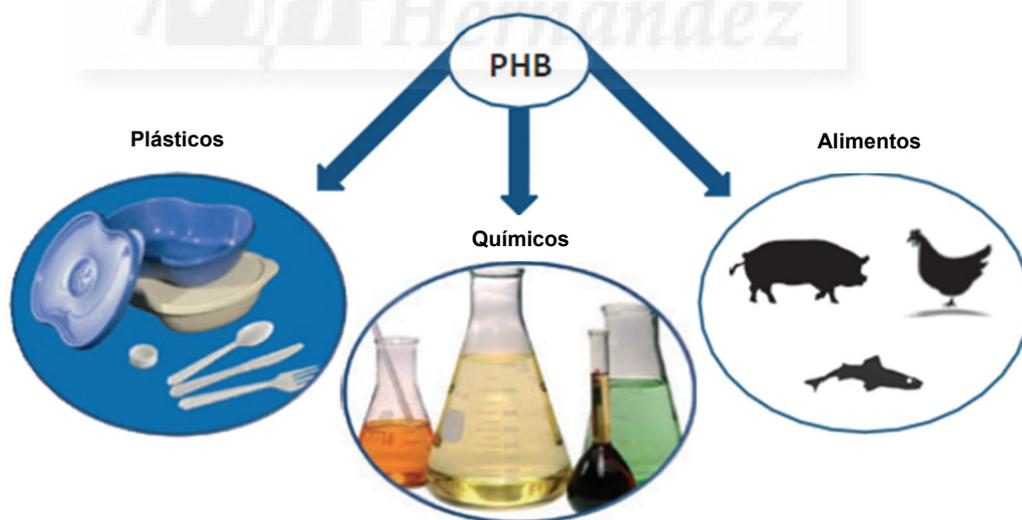
Estos biopolímeros presentan, en general, características físico-mecánicas comparables a las de los plásticos convencionales (derivados del petróleo), mientras que, al contrario que éstos, son completamente biodegradables y se producen a partir de fuentes naturales (Steinbüchel y cols., 1995; Zinn y cols., 2001; Keshavarz y Roy, 2010), de ahí que se les conozca con el término de bioplásticos (Somleva y cols., 2013). Debido a estas propiedades los PHAs han ganado rápidamente un marcado interés científico y en la actualidad ya los podemos encontrar en algunas aplicaciones biomédicas y biotecnológicas (Philip y cols., 2007; Chanprateep, 2010; Keshavarz y Roy, 2010; Somleva y cols., 2013). Especialmente, y aprovechando su biocompatibilidad, éstos bioplásticos están siendo intensamente investigados para aplicaciones *in vivo* como materiales para implantación y regeneración de tejidos (Zinn y cols., 2001; Qu y cols., 2006), así como sistemas para la liberación controlada de fármacos y otras moléculas activas (Sendil y cols., 1999; Xiong y cols., 2010). Además se ha comprobado que los productos de degradación de bioplásticos como el PHB, incluyendo sus monómeros y oligómeros, no son tóxicos para tejidos humanos (Cheng y cols.,

2006; Qu y cols., 2006; Yang y cols., 2009). Debido a que estos materiales son productos biodegradables e inmunológicamente inertes (inocuos), se prevé que su utilización en disciplinas relacionadas con la medicina continúe en expansión.

Por otra parte, se estima que la creciente demanda de productos derivados del petróleo (combustibles, plásticos, y otros productos químicos) de grandes economías como la India y China, unido con datos que demuestran que entre los años 2005-2011 se alcanzó la máxima capacidad mundial de producción de petróleo (Murray y King, 2012), conllevará a una disminución progresiva en las fuentes de reservas fósiles de energía y por tanto a un necesario incremento en la utilización de alternativas sostenibles como los polihidroxialcanoatos para aplicaciones hasta el momento exclusivas para productos derivados del petróleo (Somleva y cols., 2013).

Estos bioplásticos pueden producirse como derivados de alto valor añadido a partir de diferentes cosechas. Por ejemplo, en los Estados Unidos se estima que la producción potencial de biomasa es de 1 billón de toneladas, suficiente para sustituir, aproximadamente, el 30 % del petróleo que utiliza este país (Perlack y cols., 2005; *US Department of Energy*, 2011).

Mientras los PHAs han sido principalmente utilizados como plásticos biodegradables, sus características únicas permitirán su utilización en otras aplicaciones (Figura 6).



**Figura 6.** A partir del PHB se pueden producir diferentes productos: bioplásticos, químicos y suplementos alimenticios (adaptado a partir de Somleva y cols., 2013).

Por ejemplo, la termólisis controlada del PHB o la biomasa que lo contiene, promueve la ruptura del polímero y la liberación de ácido crotonico, que puede ser separado fácilmente del resto de la biomasa (van Walsem y cols., 2011) y transformado, utilizando procesos químicos ya

existentes, en propileno por procedimientos de descarboxilación (Peterson y Fischer, 2010) y en butanol por métodos de hidrogenación (Somleva y cols., 2013). Además el PHB pudiera ser utilizado como alimento ya que se ha demostrado su valor nutricional y/o prebiótico en estudios realizados en cerdos, pollos, ovejas y peces (Forni y cols., 1999; Peoples y cols., 2001; Boon y cols., 2010; De Schryver y cols., 2010; Najdegerami y cols., 2012).

A pesar de esto, en la actualidad los altos costes de producción de los PHAs frenan la utilización de estos en una mayor diversidad de campos del conocimiento y aplicaciones (Madison y Huisman, 1999; Philip y cols., 2007). El éxito extendido en la utilización de estos bioplásticos dependerá en gran medida de la posibilidad de hacer su proceso de obtención a escala industrial competitivo con respecto al de los plásticos convencionales (Chanprateep, 2010; Keshavarz y Roy, 2010; Somleva y cols., 2013). En este sentido sólo unos pocos PHAs como por ejemplo el PHB, y los co-polímeros de 3-hidroxibutirato, 3-hidroxivalerato, y/o 4-hidroxibutirato, están siendo producidos a nivel industrial con diferentes nombres comerciales: *Biocycle*, *Biomer*, *Biopol*, *Enmat*, *Mirel*, y *Nodax* (Jendrossek, 2009; Somleva y cols., 2013).

## **2.2 Las fasinias, proteínas mayoritarias asociadas a los gránulos de polihidroxicanoato**

Los gránulos nativos de PHAs están organizados de una forma compleja a nivel subcelular y parecen ser mucho más que simples cuerpos de inclusión (Jendrossek, 2009). Estos gránulos contienen a los poliésteres recubiertos por una monocapa de fosfolípidos y mantienen en la superficie un conjunto de proteínas asociadas al gránulo (GAPs) (Jendrossek, 2009).

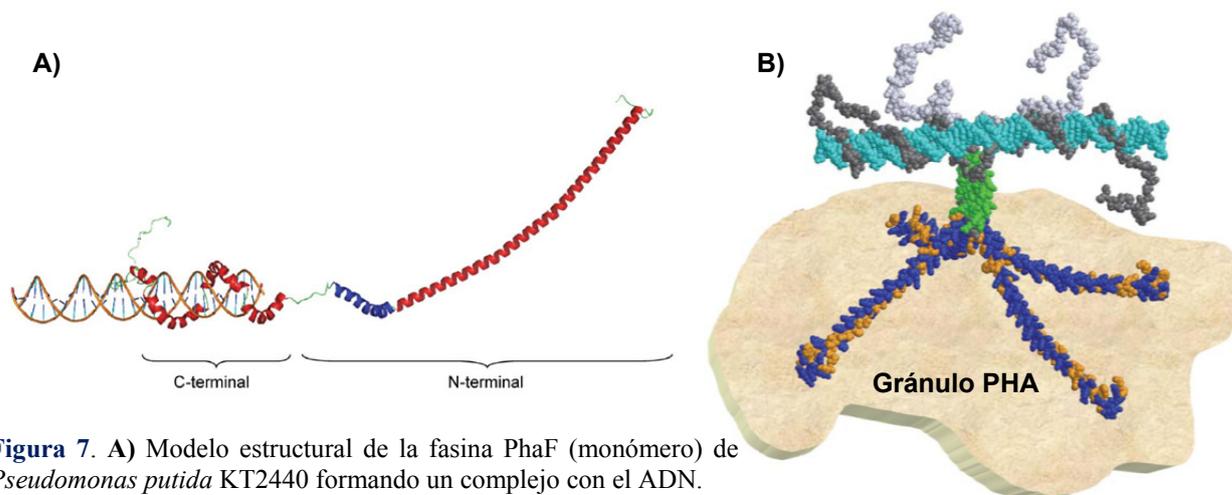
Las fasinias son proteínas de bajo peso molecular que constituyen los principales componentes de los GAPs (Jendrossek, 2009) y que sólo son sintetizadas cuando hay producción de PHAs (York y cols., 2001; Jendrossek, 2009). Han sido descritas en una gran variedad de géneros bacterianos (Wieczozorek y cols., 1995; McCool y Cannon, 1999; Prieto y cols., 1999) y parecen jugar un papel similar al de las oleosinas en los granos de polen y semillas de plantas, generando una interfaz entre el citoplasma y el núcleo hidrofóbico de los gránulos de PHAs (Steinbüchel y cols., 1995), evitando así su coalescencia (Pötter y Steinbüchel, 2005). Adicionalmente se ha descrito que al menos algunas fasinias juegan un papel importante en el control del tamaño y cantidad de gránulos de PHAs por célula (Steinbüchel y cols., 1995; Galán y cols., 2011). Recientemente se ha demostrado el papel de estas fasinias en la localización del gránulo dentro de la célula y la segregación de los mismos durante el proceso de división celular, garantizando la distribución equitativa de los mismos en las células hijas (Galán y cols., 2011). Además de estas funciones las fasinias participan

activamente en la regulación del metabolismo de los PHAs (Prieto y cols., 1999). En este sentido se ha descrito por ejemplo, que la fasina PhaP de *Ralstonia eutropha* incrementa la actividad específica de las sintetetas PhaC1 y PhaC2 de *Pseudomonas aeruginosa* (Qi y cols., 2000) y que la fasina PhaF de *Pseudomonas putida* KT2442 participa en el control de la expresión de la sinteteta PhaC1 y de la fasina PhaI (Galán y cols., 2011).

A pesar de su importancia en la estabilización y en el metabolismo de los gránulos de PHAs, solo unos pocos estudios se han enfocado en la estructura de las fasinas. A partir del análisis de la secuencia de aminoácidos de la principal fasina (PhaF) de *Pseudomonas putida* se ha sugerido que la misma está organizada en dos dominios: (i) un dominio C-terminal cargado positivamente, con las repeticiones de aminoácidos característica de los dominios de unión al ADN de las histonas y (ii) un dominio N-terminal que se une a los gránulos nativos de PHAs y que comparte similitud con el resto de la familia de las fasinas (Prieto y cols., 1999; Galán y cols., 2011; Maestro y cols., 2013).

Hay evidencias que soportan la independencia estructural y funcional de estos dominios. Por ejemplo, se ha descrito que varias proteínas de fusión que contenían la región N-terminal de la fasina PhaF se han expresado y asociado a gránulos nativos de PHO en *P. putida* sin comprometer la funcionalidad de las mismas ("tag" BioF, ver más adelante) (Moldes y cols., 2004; 2006). Adicionalmente se ha descrito que el dominio C-terminal de esta fasina aislado es capaz de unirse al ADN (Galán y cols., 2011).

Por otra parte se ha propuesto un modelo estructural tridimensional para la fasina PhaF de *Pseudomonas putida* KT2440 basado en procedimientos de modelado por homología de secuencia y en predicciones de la estructura secundaria (Maestro y cols., 2013). El modelo predice que PhaF es una proteína elongada con una larga y anfipática  $\alpha$ -hélice N-terminal con capacidad para unir PHAs, seguido de una cremallera de leucinas involucrada en la oligomerización de la proteína, y un dominio C-terminal super-helicoidal enrollado alrededor del ADN cromosómico (Maestro y cols., 2013) (Figura 7). Este modelo tridimensional fue validado por experimentos de hidrodinámica, espectroscopía y termodinámica. Se confirmó en primer lugar que la fasina libre en solución es un tetrámero y en segundo lugar que la mayor parte de la proteína está intrínsecamente desordenada en ausencia de sus ligandos (PHAs y ADN) (Maestro y cols., 2013).



**Figura 7. A)** Modelo estructural de la fasina PhaF (monómero) de *Pseudomonas putida* KT2440 formando un complejo con el ADN.

**B)** Modelo de la interacción entre los gránulos de PHAs, las fasinas y el ADN cromosomal en *Pseudomonas putida* KT2440. El tetrámero de PhaF está representado interactuando con el gránulo de PHA y al mismo tiempo permanece unido a un segmento de ADN nuclear. Los residuos hidrofóbicos y polares del dominio N-terminal se muestran en color naranja y azul respectivamente. La cremallera de leucina se muestra en verde y el ADN en *cian* (adaptado a partir de Maestro y cols., 2013).

Secuencias completas de fasinas, así como partes de ellas, han sido previamente descritas como etiquetas de afinidad para la inmovilización y purificación de proteínas recombinantes en gránulos de PHAs (Moldes y cols., 2004, 2006; Wang y cols., 2008b; Atwood y Rehm, 2009). En este sentido, el dominio N-terminal de la fasina de PhaF se ha desarrollado como etiqueta de afinidad (BioF) para adsorber/inmovilizar proteínas de fusión *in vivo* en gránulos nativos de PHAs de *P. putida* (Prieto y cols., 1999; Moldes y cols., 2004, 2006). De esta forma, proteínas híbridas recombinantes que contengan el polipéptido BioF pueden expresarse en sistemas bacterianos de producción de PHAs, a partir de los cuales pueden obtenerse fácilmente mediante centrifugación diferencial gránulos nativos de PHAs que contienen adsorbidas las citadas proteínas de fusión y que por lo tanto se pueden utilizar directamente en determinadas aplicaciones.

En un primer estudio, Moldes y cols. (2004) lograron aislar las proteínas recombinantes FLyt y FLac (una fusión del BioF-tag con el dominio de unión a colina de LytA y con la  $\beta$ -galactosidasa respectivamente), unidas a gránulos de PHAs en *Pseudomonas putida* GPG-Tc6. Las proteínas de fusión se obtuvieron con un alto grado de pureza a partir de los gránulos por tratamiento suave con detergentes. Adicionalmente, demostraron que toda la actividad  $\beta$ -galactosidasa producida por la cepa recombinante se encontraba inmovilizada en los gránulos nativos. Éste fue el primer trabajo donde se obtuvo la inmovilización selectiva de proteínas recombinantes a gránulos de PHAs en bacterias, y constituye el primer ejemplo en la literatura donde se obtienen bioplásticos activos.

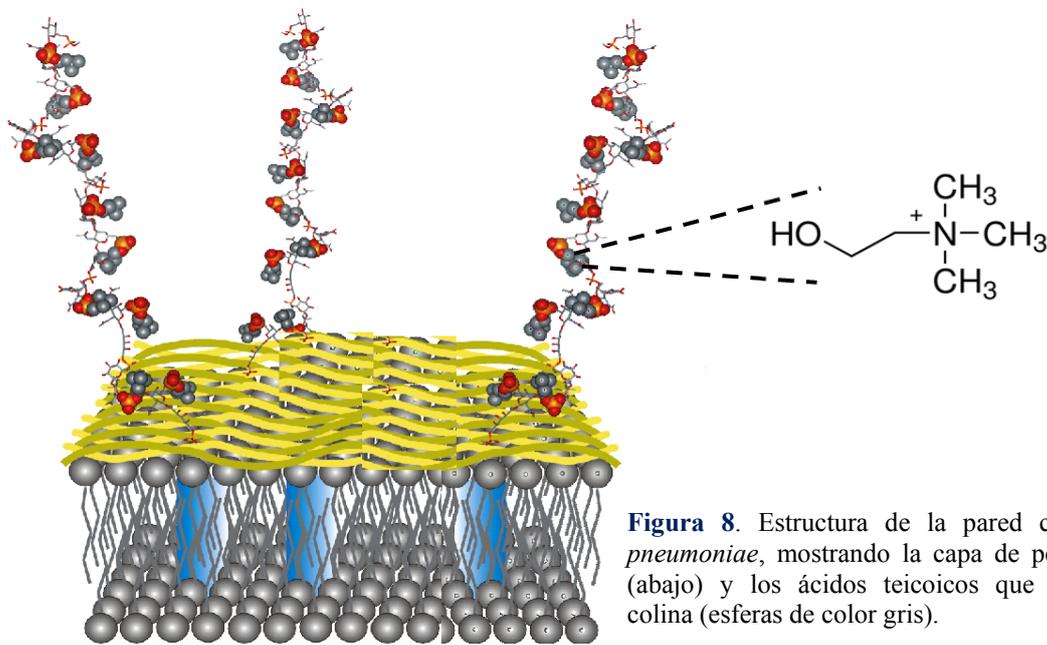
Utilizando la misma metodología se logró la inmovilización en gránulos nativos de PHAs de una proteína derivada de la toxina Cry de *Bacillus thuringiensis* (proteína Fk-Bt1) fusionada a BioF (Moldes y cols., 2006). En este trabajo se demostró que la toxina Fk-Bt1 inmovilizada en los gránulos retenía su función insecticida contra *Sesamia nonagrioides* (Moldes y cols., 2006). De estos resultados se deriva que el sistema que involucra la utilización del BioF y los gránulos nativos de PHAs, pudiera brindar una nueva herramienta para la producción y la formulación de polipéptidos activos con diferentes funciones.

Por su parte Banki y cols. (2005) establecieron una metodología novedosa de producción y purificación de proteínas recombinantes empleando estos bioplásticos. Los autores expresaron la MBP, la  $\beta$ -galactosidasa, la cloranfenicol acetil-transferasa y la proteína NusA unidas a gránulos de PHB a través de la fasina PhaP, en cepas de *Escherichia coli*. Las proteínas de fusión contenían entre la secuencia de la fasina y la proteína de interés, segmentos de inteínas con actividad auto-proteolítica inducible por cambio de pH. Los gránulos fueron obtenidos después de la lisis celular por centrifugación y a partir de estos se obtuvieron las proteínas de interés con un alta grado de pureza y funcionales, después de promover la ruptura de la proteína de fusión por la región de la inteína, por un cambio de pH en el medio.

### **3. PROTEÍNAS DE UNIÓN A COLINA DE *Streptococcus pneumoniae* COMO ETIQUETAS DE AFINIDAD**

#### **3.1 El dominio de unión a colina de LytA (C-LytA)**

*Streptococcus pneumoniae*, un diplococo encapsulado Gram-positivo, es la principal causa de infecciones invasivas (meningitis y bacteremia) y de varias enfermedades que afectan el tracto respiratorio superior (otitis media, sinusitis) e inferior (neumonía) (Maestro y Sanz, 2007; García y cols., 2010). Esta bacteria anaerobia facultativa, tiene una característica fisiológica prácticamente única entre los procariotas, que es la de exhibir un requerimiento nutricional absoluto por la colina (Tomasz, 1967; García y cols., 2010). Este aminoalcohol se incorpora como fosforil-colina (PC) en el ácido teicoico (TA) y lipoteicoico (LTA) de la pared y la membrana celular respectivamente (Tomasz, 1967; Brundish y Baddiley, 1968; Vollmer, 2007; García y cols., 2010) (Figura 8).



**Figura 8.** Estructura de la pared celular de *S. pneumoniae*, mostrando la capa de peptidoglicano (abajo) y los ácidos teicoicos que contienen la colina (esferas de color gris).

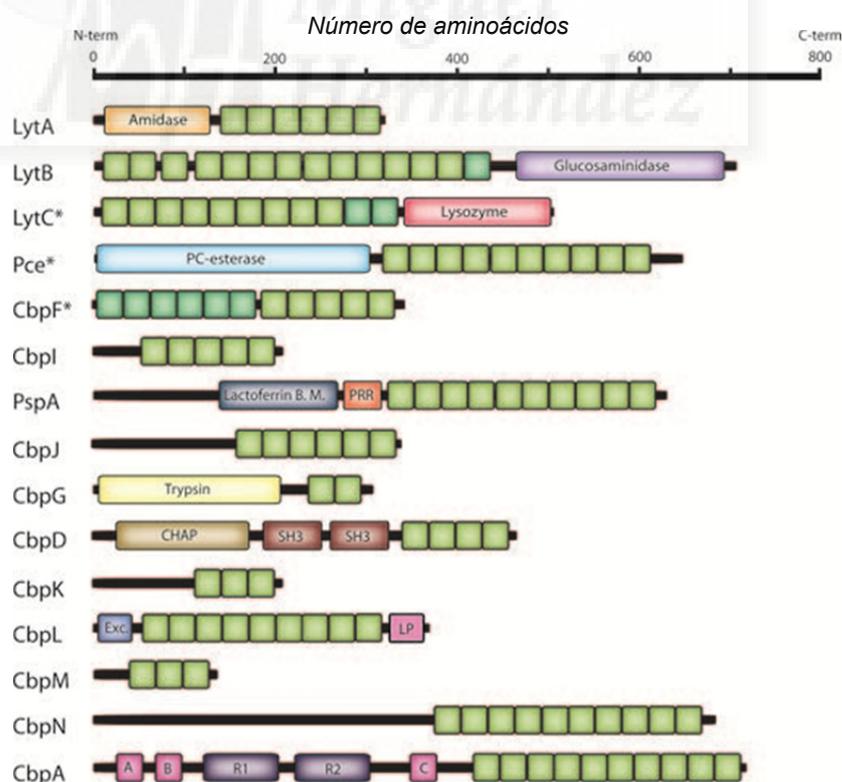
El cambio en el medio de cultivo de colina por etanolamina, aunque satisface los requerimientos nutricionales, causa una variedad de alteraciones morfológicas y funcionales en el microorganismo como por ejemplo el crecimiento formando cadenas alargadas, la carencia de la característica autólisis al final de la fase estacionaria, la incapacidad para experimentar transformación genética (Tomasz, 1968) y la resistencia a la infección por el bacteriófago Dp-1 (López y cols., 1982).

En la superficie celular de *S. pneumoniae* se encuentran varios grupos de proteínas que juegan un papel fundamental en diversos procesos fisiológicos asociados con el ciclo de vida de la bacteria y la infectividad, destacando entre ellas las denominadas proteínas de unión a colina (CBPs, por “*choline-binding proteins*”). La familia de CBPs de *S. pneumoniae* contiene de 13 a 16 miembros dependiendo del tipo particular de cepa (Hakenbeck y cols., 2009; García y cols., 2010) e intervienen en una amplia variedad de procesos esenciales para la viabilidad y patogenicidad de este microorganismo (Bergmann y Hammerschmidt, 2006; Hammerschmidt, 2007; Hakenbeck y cols., 2009). Se ha descrito por ejemplo una CBP como es CbpA (PspC), la principal adhesina del neumococo, que participa en la unión de la bacteria a células epiteliales del hospedero (Rosenow y cols., 1997; Hammerschmidt y cols., 2007), y evita la activación de la vía inmunológica del complemento por unión al factor H (Duthy y cols., 2002; Hammerschmidt y cols., 2007). También se ha demostrado que mutantes en CbpG tienen una habilidad disminuida para adherirse a células epiteliales de la nasofaringe de ratas y humanos (Gosink y cols., 2000; Hakenbeck y cols., 2009). Una función similar en la adherencia y colonización nasofaríngea se atribuye a la CbpD (Gosink y

cols., 2000). Por otra parte se ha descrito que CbpF regula la autólisis del neumococo por inhibición *in vivo* e *in vitro* de la actividad muramidasa de LytC (Molina y cols., 2009; Pérez-Dorado y cols., 2012).

Otro rol fundamental de las CBPs es el de su papel como hidrolasas de la pared celular (CWHs) (López y cols., 2004; Bergmann y Hammerschmidt, 2006; García y cols., 2010). Se han descrito cuatro CWHs de mucha importancia para la virulencia de esta bacteria: la principal autolisina LytA (N-acetilmuramoyl-L-alanina amidasa), la  $\beta$ -N-acetilglucosamidasa (LytB), la  $\beta$ -N-acetilmuramidasa (LytC; lisozima) y la fosforil-colina esterasa (Bergmann y Hammerschmidt, 2006). Estas CWHs rompen específicamente las uniones covalentes dentro del peptidoglicano y son responsables de eventos tales como la liberación de toxinas y la separación de las células hijas tras la división celular (López y cols., 2004; Bergmann y Hammerschmidt, 2006; Hammerschmidt, 2007; García y cols., 2010; Pérez-Dorado y cols., 2012). Dentro de la compleja interacción huésped-patógeno en enfermedades producidas por el neumococo la colonización nasofaríngea es el primer paso, donde las CBPs parecen tener un papel fundamental en la adhesión a la superficie de la mucosa nasofaríngea y el desarrollo del estado portador (García y cols., 2010).

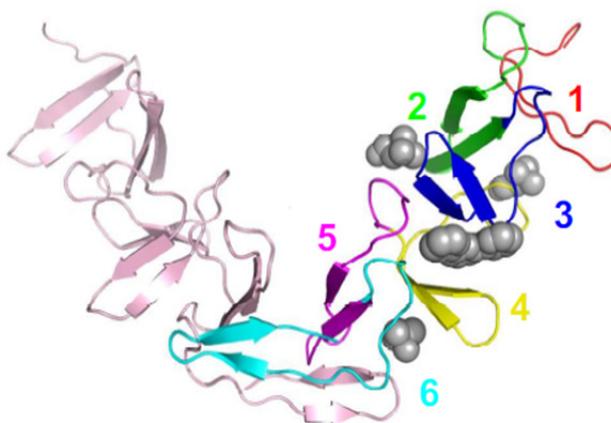
Las CBPs comparten una organización modular (Pérez-Dorado y cols., 2012) (Figura 9).



**Figura 9.** Organización modular de las proteínas unificadoras de colina (CBP) (adaptado a partir de Pérez-Dorado y cols., 2012). \* Existe la estructura tridimensional completa de la proteína. Los cuadros en verde representan CBRs.

En uno de los módulos se encuentra el centro catalítico que determina la actividad biológica de la proteína y el otro módulo es el de unión a colina (CBM), que ancla estas proteínas a la superficie celular a través de interacciones no covalentes con los residuos de colina situados en los TA y LTA (García y cols., 2010; Pérez-Dorado y cols., 2012). Los módulos de unión a colina de las CBPs pueden estar ubicados tanto en el extremo N- como en el C-terminal y están formados por varias repeticiones (repeticiones de unión a colina, CBR) con la secuencia consenso GWXK-X<sub>4-5</sub>-WYY-φ-X<sub>3-5</sub>-GXMX<sub>2-3</sub>, donde X representa a cualquier residuo de aminoácido y φ es un residuo hidrofóbico (<http://pfam.sanger.ac.uk/family?PF01473>) (García y cols., 2010). Dos CBR consecutivas configuran un sitio de unión a colina.

Una de las principales CBPs de la pared celular de *S. pneumoniae* es la autolisina LytA, una *N*-acetil-muramoil-L-alanina amidasa (NAM-amidasa) (López y García, 2004; García y cols., 2010). LytA es responsable de la auto-lisis celular en fase estacionaria (Llull y cols., 2006; Hakenbeck y cols., 2009), a través de la cual se liberan sustancias tóxicas como la neumolisina o toxina formadora del poro, que dañan las barreras endoteliales y epiteliales y permite que el neumococo acceda al torrente sanguíneo y se disemine por todo el cuerpo (Berry y Paton, 2000). LytA está organizada en dos módulos, uno en el N-terminal de su secuencia (residuos 1-174) que cataliza la ruptura del enlace *N*-acetilmuramoil-L-alanina del esqueleto del peptidoglicano y el otro es su correspondiente módulo de unión a colina, (residuos 175-301) que denominaremos módulo C-LytA. La estructura cristalina de C-LytA, la primera de un CBM, mostró que este módulo adopta una estructura β-solenoide (Fernández-Tornero y cols., 2001) en donde las CBR forman estructuras del tipo bucle-horquilla-β (Fernández-Tornero y cols., 2001) (Figura 10).

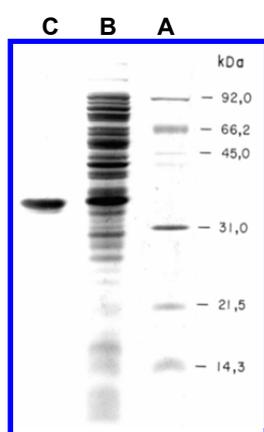


**Figura 10.** Estructura de rayos X de C-LytA basado en el PDB 1HCX. Cada cadena del homodímero contiene seis motivos estructurales (coloreados en rojo, verde, azul, amarillo, magenta y cian) compuesto de una horquilla-β y un lazo largo, que juntos constituyen cuatro sitios de unión a colina, ocupados en la estructura cristalina por tres residuos de colina y un residuo de *N*-óxido de *N,N*-dimetil dodecilamina (esferas grises) (adaptado a partir de Hernández-Rocamora, 2009).

Con variaciones, esta disposición se repite en todos los CBMs cuya estructura ha sido elucidada hasta ahora: Pce, CbpF, LytC, PspA, LytA, CbpA y CbpM (revisado por Pérez-Dorado y cols., 2012). Los sitios de unión a colina están localizados en la interfaz de dos CBRs consecutivos, donde tres residuos aromáticos conservados (generalmente 2 triptófanos y una tirosina) forman una cavidad en la cual las cargas positivas del grupo amonio cuaternario de la colina se estabilizan con la densidad electrónica de los anillos aromáticos de los aminoácidos del sitio de unión mediante interacciones catión- $\pi$  (Fernández-Tornero y cols. 2001; García y cols., 2010; Pérez-Dorado y cols., 2012). Adicionalmente, se establecen interacciones de Van der Waals entre los sustituyentes del nitrógeno del ligando y la proteína. La existencia de varias CBRs en tándem posibilita la unión simultánea a varios residuos de colina en la pared, asegurando un incremento sustancial en la afinidad de la proteína por la misma.

### 3.2 C-LytA como “tag” de afinidad

Los módulos de unión a colina no sólo muestran afinidad por este aminoalcohol sino también por análogos estructurales del mismo (Sanz y cols., 1988), siendo el mínimo requerimiento estructural el de constituir una amina terciaria o cuaternaria alifática (Sanz y cols., 1988). Esto ha permitido poner a punto un sistema eficaz de purificación de proteínas de fusión con algunos de estos CBMs (Sánchez-Puelles y cols., 1992). Básicamente, el procedimiento consiste en aplicar un extracto celular conteniendo la proteína de fusión sobre un soporte funcionalizado con aminas terciarias o cuaternarias como el dietilaminoetanol (DEAE). La proteína así inmovilizada mantiene su funcionalidad, y puede ser eluída fácilmente mediante la adición de un ligando competidor, como la propia colina, obteniéndose con elevado rendimiento y pureza (Figura 11).



**Figura 11.** Purificación de la autolisina LytA de *S. pneumoniae*.

A) Marcador de peso molecular

B) Extracto de *E. coli* RB791 [pGL100] que sobre-expresa LytA.

C) Fracción purificada de LytA en columnas de DEAE-celulosa.

El lavado se realizó con 1,5 M de NaCl y el tampón de elución contenía 150 mM de colina.

El procedimiento así descrito ha sido empleado en numerosos trabajos (Sánchez-Puelles y cols., 1992; Vian y cols., 1998; Caubín y cols., 2001; Hernández-Torres y cols., 2008) y es la base de tres patentes (ES2321788, ES2319844 y ES2032717) y de productos comercializados por la empresa española Biomedal S.L. (<http://www.biomedal.es>), en las que se hace uso del dominio C- LytA, y cuya denominación comercial son LYTAG y LYTAG-2-PHASE, habiéndose extendido este procedimiento no sólo al empleo de resinas cromatográficas convencionales sino también a otros métodos (papel, filtros, placas multipocillo, etc...).

Entre las ventajas de este procedimiento (Tabla 2) cabe destacar que el sistema es altamente específico, puede utilizar una gran variedad de soportes ya disponibles comercialmente (resinas, papel, placas multipocillo, etc...), muestra muy pocas incompatibilidades, y posee todas las atribuciones necesarias para pensar en un escalado eficiente para su empleo en biorreactores a nivel industrial, como el uso de componentes económicos (soportes, colina, etc), no tóxicos y sin inconvenientes medioambientales de relevancia.

También es necesario mencionar que el dominio de unión a colina de LytA (C-LytA) ha sido utilizado como etiqueta de afinidad para inmovilizar la proteína de unión a colágeno CNA35 a dendrímeros funcionalizados con colina para la detección de colágeno en tejidos (Hernández-Rocamora y cols., 2011). Asimismo se ha descrito un método que permite la inmovilización específica de proteínas a electrodos de oro funcionalizados con análogos de colina empleando C-LytA como polipéptido de afinidad (Madoz y cols., 1997).

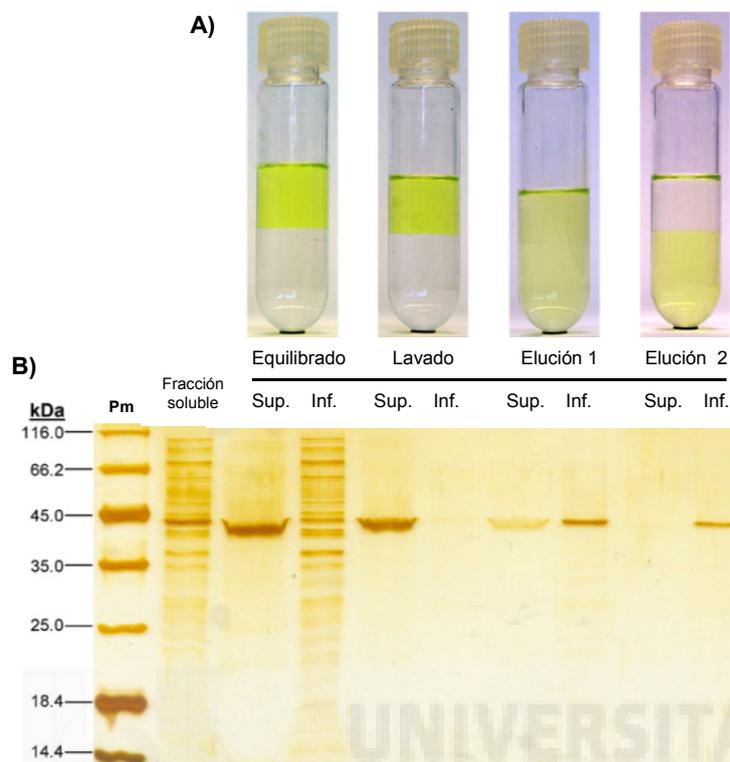
Por otro lado, las aplicaciones de C-LytA como polipéptido de afinidad no se reducen a la interacción con resinas sólidas. De hecho, el escalado de los procedimientos cromatográficos para su utilización industrial conlleva una serie de dificultades técnicas que resultan fundamentalmente de la compresibilidad de los materiales y la necesidad de aplicar altas presiones en columna. Por estos motivos, se han venido desarrollando métodos en solución que constituyan una alternativa al empleo de materiales sólidos.

En este sentido, podemos encontrar los sistemas de dos fases acuosos (ATPS) que se generan espontáneamente por la mezcla de soluciones de dos polímeros estructuralmente diferentes, o por la mezcla de un polímero (normalmente polietilenglicol o PEG) y altas concentraciones de una sal (Albertsson, 1986; Guan y cols., 1995; Andrews y cols., 2005; Asenjo y Andrews, 2012). Tras un corto período de tiempo aparecen dos fases, ambas acuosas, y que se encuentran en equilibrio. En mezclas de dos polímeros, cada fase se enriquece en uno de los dos polímeros, mientras que en sistemas polímero-sal una fase se enriquece en polímero, y la otra en sal.

Los sistemas acuosos de dos fases tienen una gran utilidad en la separación de material biológico (Maestro y cols., 2008; Asenjo y Andrews, 2012; Ruiz y cols., 2012). Presentan varias ventajas, tales como alta biocompatibilidad, baja tensión superficial (lo que minimiza la degradación de las biomoléculas), alta capacidad de carga y rendimiento, y son fácilmente escalables con vistas a su aplicación industrial (Albertsson, 1986; Walter y cols., 1991). En procesos de catálisis enzimática, la transferencia de masa (sustratos y productos) entre la fase enzimática y el resto está mucho más facilitada que cuando la enzima se adsorbe sobre una superficie sólida. Además son sistemas económicos, y en los que se pueden manejar muchos factores para conseguir mejorar la partición de la molécula de interés. El reparto de proteínas entre las dos fases es dependiente de factores tales como la carga, el tamaño y la hidrofobicidad de la proteína en cuestión (Andrews y cols., 2005; Asenjo y Andrews, 2012), y es una cuestión en general poco predecible. De hecho, la mayor implantación en el mercado de estos sistemas viene limitada por la baja predictibilidad en la partición de las proteínas. Sin embargo, el uso de polipéptidos o etiquetas de afinidad fusionados a la proteína de interés puede inducir a su localización en una u otra fase de una manera más controlada (Ruiz y cols., 2012), lo que se denomina partición por afinidad en sistemas acuosos de dos fases.

En este sentido, se han descrito resultados prometedores usando el conocido “tag” de histidinas (Birkenmeier y cols., 1991). En este sistema, la proteína fusionada a la cola de histidinas es dirigida de manera mayoritaria a la fase rica en PEG, previamente derivatizado de manera covalente con iones metálicos.

En nuestro caso, se ha descrito que las soluciones acuosas de dos fases que contienen polietilenglicol (PEG) han sido también utilizadas con éxito para la purificación de proteínas recombinantes fusionadas al dominio de unión a colina C-LytA (Maestro y cols., 2008). Las proteínas recombinantes fusionadas con C-LytA ensayadas a partir de un extracto, se localizaron de manera cuantitativa en la fase rica en PEG, y cambiaron su localización a la fase pobre en PEG por adición de su ligando natural colina (Maestro y cols., 2008) (Figura 12), constituyendo por lo tanto un avance significativo en la predictibilidad de este tipo de sistemas.



**Figura 12.** Purificación de GFP-C-LytA en PEG/fosfato a partir de *E. coli* REG-1 [pALEX2-Ca-GFP]. (A) Fotografías tomadas durante la purificación (B) Análisis de muestras (diluídas 100 veces) mediante SDS-PAGE (12 %) y tinción con plata. Sup., significa fase superior y Inf., fase inferior (adaptado a partir de Maestro y cols., 2008).

*Capítulo II*

**OBJETIVOS**

UNIVERSITAS

Miguel

Hernández



El propósito principal de este trabajo es el desarrollo de nuevos enfoques para la inmovilización y purificación de proteínas recombinantes basados en interacciones naturales de afinidad que permitan un procedimiento suave a la vez que estable y específico. Como se ha descrito en la Introducción, los sistemas de inmovilización que emplean las etiquetas de afinidad BioF (módulo de unión a bioplásticos del tipo de los polihidroxicanoatos de *Pseudomonas putida* KT2442) y C-LytA (módulo de unión a colina de la amidasa LytA de *Streptococcus pneumoniae*) poseen un elevado potencial biotecnológico que, a pesar de sus evidentes ventajas técnicas frente a otros sistemas similares comerciales, deben todavía vencer la natural inercia que oponen las industrias y los laboratorios biotecnológicos al cambio de sus procedimientos habituales. Por este motivo, es necesario por un lado avanzar en la comprensión del mecanismo general de actuación de los sistemas BioF y C-LytA, caracterizando y reafirmando la robustez de los mismos, y por otro lado explorar novedosas aplicaciones que les confieran un alto valor añadido y que aumenten por lo tanto su atractivo.

Para ello nos planteamos en este trabajo los siguientes objetivos:

Para la etiqueta de afinidad BioF:

- La caracterización de la estabilidad de la interacción con diferentes tipos de polihidroxicanoatos.
- La construcción de biorreactores enzimáticos sobre polihidroxicanoatos: pruebas de concepto y desarrollo de un sistema enzimático de descontaminación de colorantes.

Para la etiqueta de afinidad C-LytA:

- La construcción de electrodos enzimáticos sobre superficies de grafito y nanotubos de carbono.
- La inmovilización sobre nanopartículas magnéticas.
  - Para su uso como nanobiorreactores.
  - Para su uso como sistemas de estabilización y transporte de enzimas antitumorales.

- La introducción de inteínas en la proteína híbrida que promueva la separación de la etiqueta tras el proceso de purificación de proteínas recombinantes por cromatografía de afinidad.
  - En fase sólida (utilizando nanopartículas magnéticas como soporte).
  - En fase líquida (utilizando sistemas acuosos de dos fases).



*Capítulo III*

**MATERIALES Y MÉTODOS**

UNIVERSITAS

Hernández



## 1. CEPAS BACTERIANAS Y PLÁSMIDOS

Las cepas bacterianas y plásmidos que se han utilizado en este estudio se describen en la Tabla 4.

Tabla 4. Cepas bacterianas y plásmidos.

Especie	Cepa	Genotipo/fenotipo relevante	Referencia
<i>Escherichia coli</i>	DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> ( $r_k^-$ $m_k^+$ ), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA</i> , <i>relA1</i> , $\Delta$ ( <i>argF-lac</i> )U169, <i>deoR</i> $\Phi$ 80 <i>dlac</i> , $\Delta$ ( <i>lacZ</i> )M15	Hanahan, 1983
“	XL1-Blue	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> <i>relA1</i> , <i>lac</i> [F <sup>-</sup> <i>proAB lacIq</i> $\Delta$ M15 Tn10]	Sambrook y Russell, 2001
“	CC118 $\lambda$ <i>pir</i>	$\Delta$ ( <i>ara-leu</i> ), <i>araD</i> , $\Delta$ <i>lacX74</i> , <i>galE</i> , <i>galK</i> , <i>phoA20Thi-1</i> , <i>respE</i> , <i>rpoB</i> , <i>argE</i> (Am), <i>recA1</i> $\lambda$ <i>pir</i>	Herrero y cols., 1990
“	BL21 (DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT</i> <i>gal</i> [ <i>dcm</i> ] [ <i>lon</i> ] <i>hsdS<sub>B</sub></i> con DE3	Studier y Moffatt, 1986
“	BLR (DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT</i> <i>hsdS<sub>B</sub></i> ( $r_B^-$ $m_B^-$ ) <i>gal dcm</i> (DE3) $\Delta$ ( <i>srl-recA</i> )306:: <i>Tn10</i> ( <i>Tet<sup>R</sup></i> )	EMD Millipore (Novagen)
“	REG-1	<i>Mini-Tn5</i> ( <i>kanR nahR/Psal::xylS</i> ) <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) F80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> ( <i>ara-leu</i> )7697 <i>galU galK rpsL endA1 nupG</i>	Cedida por Biomedal S.L.

Plásmido	Parental	Características	Referencia
pNFA2	pVLT35	<i>Sm<sup>r</sup></i> , <i>flyt<sup>+</sup></i>	Moldes y cols., 2004
pNFL2	pVLT35	<i>Sm<sup>r</sup></i> , <i>bioF-<math>\beta</math>gal<sup>+</sup></i>	Moldes y cols., 2004
pETPhaF	pET-29a(+)	<i>Ap<sup>r</sup></i> , <i>phaF<sup>+</sup></i>	Galán y cols., 2011
pEG40	pEG3	<i>Ap<sup>r</sup></i> , <i>C-lytA-<math>\beta</math>gal<sup>+</sup></i>	Sánchez-Puelles y cols., 1992
pCPC21	pCPC20	<i>Ap<sup>r</sup></i> , <i>C-lytA-DAO<sup>+</sup></i>	Moldes, 2003
pCueO	pASK-IBA3	<i>Ap<sup>r</sup></i> , <i>cueO<sup>+</sup></i>	Grass y Rensing, 2001
pDB1	pET-21d (+)	<i>Ap<sup>r</sup></i> , <i>bioF<sup>+</sup></i>	Este trabajo
pDB2	pDB1	<i>Ap<sup>r</sup></i> , <i>bioF-cueO<sup>+</sup></i>	Este trabajo
pET/BI-MBP	pET	<i>Ap<sup>r</sup></i> , <i>C-lytA-int-MBP<sup>+</sup></i>	Cedido por David W. Wood
pALEX2-Ca-GFP	pALEX2-Ca	<i>Ap<sup>r</sup></i> , <i>C-lytA-GFP<sup>+</sup></i>	Maestro y cols., 2008

### 1.1 Medios, condiciones de cultivo y de conservación

Los cultivos en líquido de *Escherichia coli* se crecieron en medio Luria-Bertani (LB): triptona 10 g L<sup>-1</sup>, extracto de levadura 5 g L<sup>-1</sup>, NaCl 10 g L<sup>-1</sup> (Sambrook y Russell, 2001), suplementado en ocasiones con ampicilina (0,1 mg mL<sup>-1</sup>) o estreptomycin (0,05 mg mL<sup>-1</sup>) (dependiendo de la resistencia que portasen), en agitación orbital (200 rpm, Innova<sup>TM</sup> 4000) y a 37 °C. Su crecimiento se valoró por turbidimetría a 600 nm utilizando un espectrofotómetro “Evolution 201” (Thermo Scientific). Los cultivos en sólido se llevaron a cabo en placas de *Petri* conteniendo medio LB suplementado con 1,5 % (p/v) de bactoagar (Pronadisa).

En el caso específico de la determinación *in vivo* de la actividad lacasa en placas de *Petri*, al medio de cultivo (LB-agar, Pronadisa) se le añadió CuSO<sub>4</sub> 1 mM, isopropyl- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 0,5 mM y 2,6-dimetoxifenol (DMF) 2 mM (Sigma-Aldrich).

Todas las estirpes bacterianas se conservaron a corto plazo a 4 °C en placas de *Petri* conteniendo medio LB-agar (Pronadisa), suplementadas en su caso con el antibiótico adecuado. Para la conservación a largo plazo las células se congelaron a -80 °C en medio LB con glicerol al 15 % (v/v).

## **2. LÍNEAS CELULARES Y LINFOCITOS**

Las líneas celulares de carcinoma de colon SW620, SW480, HCT-15 y las líneas celulares de carcinoma de páncreas IMIM-PC-2, RWP1 y H5766T fueron gentilmente cedidas por el Instituto Hospital del Mar de Investigaciones Médicas de Barcelona (IMIM). Las líneas celulares de glioblastoma multiforme U87, T98 y LN-229 proceden de la ATCC (del inglés: “*American Type Culture Collection*”). La línea HGUE-C-1 de carcinoma de colon fue cedida por el Hospital General Universitario de Elche y los linfocitos fueron obtenidos de sangre periférica de individuos sanos en la Unidad del Consejo Genético del propio hospital.

### **2.1 Condiciones de cultivo**

Las líneas celulares de carcinoma de colon se cultivaron a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Se empleó el medio de cultivo DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado con L-glutamina a una concentración final de 2 mM, penicilina/streptomycin (BioWhittaker) a una concentración final de 50 U mL<sup>-1</sup>, piruvato sódico (BioWhittaker) a una concentración final de 1 mM y suero fetal bovino en una proporción final del 10 % (v/v). Los linfocitos se cultivaron bajo las mismas condiciones pero en medio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute Medium*) suplementado con suero fetal bovino en una proporción final del 10 % (v/v).

## **3. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR**

### **3.1 Purificación de ADN**

La purificación de ADN plasmídico se llevó a cabo utilizando el kit “QIAprep<sup>®</sup> Spin Miniprep” (QIAGEN). Los fragmentos de ADN obtenidos a partir de geles de agarosa se purificaron utilizando el kit “High Pure PCR Product Purification” (Roche Applied Science).

### 3.2 Preparación y transformación de células competentes

La preparación de células competentes de *E. coli* y su transformación con ADN plasmídico se llevó a cabo por el método tradicional del CaCl<sub>2</sub> (Sambrook y Russell, 2001).

### 3.3 Electroforesis de ADN en geles de agarosa

El tamaño y la pureza de los fragmentos de ADN se evaluaron mediante electroforesis en geles de agarosa-D2 (Pronadisa) al 0,8 % (p/v) en tampón TAE (Tris 40 mM, EDTA 1 mM, ácido acético 20 mM, pH 8,0, SERVA-GmbH), y utilizando el sistema Wide Mini-Sub<sup>®</sup> Cell GT de Bio-Rad. Las muestras se cargaron con tampón de carga (10x: xilencianol 0,1 % (p/v), azul de bromofenol 0,1 % (p/v), glicerol 10 % (v/v), EDTA 10 mM, pH 8,0). Como solución de tinción se utilizó el Redsafe<sup>™</sup> (Intron Biotechnology) y el campo eléctrico aplicado se ajustó en función de las características de los fragmentos analizados, variando entre 4 V cm<sup>-1</sup> y 8 V cm<sup>-1</sup>. El ADN se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta.

### 3.4 Secuenciación de ADN

La secuenciación de ADN se llevó a cabo en el servicio de secuenciación del Centro de Investigaciones Biológicas (Secugen, CIB-CSIC) utilizando un secuenciador automático modelo ABI Prism 3700 (Applied Biosystems). Para la reacción de secuenciación se utilizó el Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit de Applied Biosystems, y la ADN polimerasa AmpliTaq FS, siguiendo las recomendaciones de los suministradores. Las reacciones se llevaron a cabo mediante la técnica de PCR con un termociclador Gene Amp PCR System 2400 de Perkin-Elmer.

### 3.5 Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo fueron sintetizados por Invitrogen (Tabla 5).

Tabla 5. Nombre y secuencia (5'→3') de los oligos sintéticos utilizados en este trabajo para amplificar las regiones correspondientes al *bioF* en pNFA2 y a *cueO* en pCueO. Subrayados se encuentran los sitios de corte por endonucleasa de restricción introducidos. En rojo y azul el comienzo y fin de los fragmentos de ADN a amplificar.

Oligos	Secuencia (5'→3')
BioF_XbaI	CGCATAAAGCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGAATACGATGGCTGGCAAGAAGAATTCCGAG
BioF_NcoI	TCGTTCCGCTGATCCATGGGCTGCTGCCCGCGACGAAATCGGGGTAACC
CueO_NcoI	CGCATAAAGCCCATGGGCAGAACGCCAACGTTACCGAT
CueO_BamHI	GCTTTATGCGGGATCCTTATTATACCGTAAACCCTAACATCATCCC

### 3.6 Construcción de los plásmidos pDB1 y pDB2

El plásmido pDB1 contiene el gen *bioF* clonado en el vector de expresión pET-21d (+). Para su construcción, el fragmento que codifica para el polipéptido BioF se obtuvo mediante amplificación por PCR de la fracción comprendida entre los oligonucleótidos cebadores: 5'-CGCATAAAGCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGAATACGATGGCTGGCAAGAAGAATTCCGAG-3' (subrayado sitio de corte *XbaI*, en rojo el inicio del fragmento amplificado) y 5'-TCGTTCCGCTGATCCATGGGCTGCTGCCCCGCGACGAAATCGGGGTAACC-3' (subrayado sitio de corte *NcoI*, en azul el final del fragmento amplificado). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50  $\mu\text{L}$ , conteniendo 2,0 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  de ADN plasmídico molde pNFA2, 2,5 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  de cada oligonucleótido cebador, 200  $\mu\text{M}$  de una mezcla de *dNTPs* (Fermentas) y 2,5 unidades de la ADN polimerasa de alta fidelidad *PfuUltra*<sup>®</sup> de *Stratagene* (Agilent Technology) con su tampón correspondiente. Las muestras se sometieron a los siguientes ciclos: 1 ciclo de 120 s a 95 °C; 29 ciclos constituidos por: 30 s a 95 °C, 30 s a 60 °C y 60 s a 72 °C ; 1 ciclo de 600 s a 72 °C, utilizando para ello un termociclador MJ Mini<sup>™</sup> de Bio-Rad. El producto de PCR fue purificado utilizando el kit “High Pure PCR Product Purification” (Roche Applied Science) para posteriormente ser digerido por las enzimas de restricción *XbaI* y *NcoI* (Fermentas) y clonado en el sitio correspondiente del vector pET-21d (+) mediante la T4 ADN-Ligasa (Fermentas) manteniendo la incubación de 16 h a 24 °C. Finalmente, la mezcla de ligación se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* XL1-Blue, y el ADN plasmídico de las colonias resultantes fue secuenciado automáticamente (Secugen, CIB-CSIC).

Por su parte, el plásmido pDB2 es un derivado de pET-21d (+) que contiene el gen *cueO* clonado en posición 3' del gen *bioF*. Para su construcción el fragmento de ADN que codifica para la proteína CueO fue amplificado por PCR utilizando los oligonucleótidos cebadores 5'-CGCATAAAGCCCATGGGCAGAACGCCCAACGTTACCGAT-3' (subrayado sitio de corte *NcoI*, en rojo el inicio del fragmento amplificado) y 5'-GCTTTATGCGGGATCCTTATTATACCGTAAACCCTAACATCATCCC-3' (subrayado sitio de corte *BamHI*, en azul el fin del fragmento amplificado), utilizando como ADN molde el plásmido pCueO y los mismos ciclos de amplificación empleados en la construcción de pDB1. Tras la purificación del producto resultante de la amplificación, el ADN se trató con las enzimas de restricción *NcoI* y *BamHI* y se ligó en el correspondiente sitio del plásmido pDB1, en posición inmediata 3' del gen *bioF*, mediante incubación de 16 horas a 24 °C. La fidelidad de la construcción se comprobó mediante secuenciación.

## 4. TÉCNICAS DE TRABAJO CON PROTEÍNAS

### 4.1 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida

La pureza de las preparaciones proteicas fue comprobada por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970), utilizando el sistema Mini-Protean de Bio-Rad. El gel concentrador fue preparado a una concentración final de acrilamida del 4 % (p/v) y el separador a una concentración de 10 o 15 % (p/v) dependiendo del peso molecular de la proteína de interés. Los geles fueron teñidos con EZBlue™ (Sigma-Aldrich) o mediante tinción con plata (Pierce®, Thermo Scientific).

### 4.2 Valoración de la concentración de proteína pura

La concentración de las proteínas puras se valoró por espectroscopía de absorción a 280 nm (Evolution 201, Thermo Scientific), utilizando coeficientes de extinciones molares teóricos calculados a partir de las secuencias primarias de las proteínas (Programa *ProtParam* del servidor EXPASY, <http://web.expasy.org/protparam>).

Adicionalmente, la cuantificación de proteínas se llevó a cabo por el método colorimétrico de Bradford (1976) empleando como reactivo el “Protein Assay Dye Reagent Concentrate” de Bio-Rad. Para la curva patrón se utilizó la albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma-Aldrich).

### 4.3 Expresión y purificación de proteínas recombinantes

**PhaF**: la proteína fue purificada por cromatografía de interacciones hidrofóbicas en columnas de butil-sefarosa (GE, Healthcare) siguiendo el procedimiento descrito por Galán y cols. (2011).

**FLyt**: un litro de cultivo de *E. coli* CC118 conteniendo el plásmido pNFA2 se creció a 37 °C y 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0,6. La expresión del gen *flyt* fue entonces inducida durante 14 h a 30 °C (200 rpm) mediante la adición de 0,5 mM de isopropyl-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). Las células se recolectaron mediante centrifugación a 5000xg (Avanti® J-26XP, Beckman Coulter) durante 10 min a 4 °C, se resuspendieron en 50 mL de tampón de fosfato sódico 20 mM, NaCl 100 mM (pH 7,0), y fueron lisadas por sonicación (Branson 250) mediante 10 ciclos de 15 s a 4 °C. El lisado se centrifugó a 10000xg durante 10 min a 4 °C, y el precipitado, que contenía la fracción mayoritaria de la proteína FLyt en forma de cuerpos de inclusión, fue resuspendido en 25 mL de urea 8 M, seguido de centrifugación a 10000xg durante 10 min a 4 °C para eliminar restos no solubilizados. El sobrenadante resultante se cargó directamente

en una columna de Sefadex G-100 (50 x 1 cm, Bio-Rad). FLYt se replegó mientras se separaba por la columna de filtración en gel, empleando como fase móvil tampón fosfato de sodio 20 mM, 100 mM de NaCl (pH 7,0). La pureza de la proteína eluída se valoró por electroforesis en geles de poliacrilamida, encontrándola pura en más de un 90 %. Las fracciones elegidas se conservaron a -80 °C por un máximo de 12 meses.

**BioF-βgal:** un litro de cultivo de *E. coli* CC118 conteniendo el plásmido pNFL2 se creció y procesó de manera análoga al caso anterior. La proteína BioF-βgal se encontró mayoritariamente en la fracción soluble, a la cual se le añadió lentamente sulfato amónico (Sigma-Aldrich) hasta una concentración final de 1,7 M (4 °C). La mezcla se centrifugó a 10000xg durante 10 min a 4 °C, y el sobrenadante se añadió sobre una columna de butil-sefarosa (GE, Healthcare) (10 X 1 cm, Bio-Rad) previamente equilibrada en tampón fosfato sódico 20 mM más 1,7 M de sulfato de amonio (pH 7,0). La columna se lavó con tampón fosfato sódico 20 mM más 0,75 M sulfato de amonio (pH 7,0) hasta que, mediante el método de Bradford (1976), no se detectó presencia de proteína en la fracción de lavado. Finalmente la proteína BioF-βgal se eluyó de la columna utilizando tampón fosfato sódico 20 mM, pH 7,0.

**BioF-CueO:** un litro de cultivo de *E. coli* BL21 (DE3) conteniendo el plásmido pDB2 se creció a 37 °C y 200 rpm hasta alcanzar una  $DO_{600nm}$  de 0,6, momento en el cual se indujo la expresión del gen *bioF-cueO* mediante la adición de IPTG 0,5 mM manteniéndose durante 16 h a 25 °C (200 rpm). Las células se recogieron por centrifugación a 5000xg durante 10 min a 4 °C, se resuspendieron en 50 mL de tampón fosfato de sodio 20 mM más  $CuSO_4$  1 mM (pH 7,0), y fueron lisadas por sonicación mediante 10 ciclos de 15 s a 4 °C. El extracto resultante se centrifugó a 10000xg durante 10 min a 4 °C, y a la fracción soluble se le añadió lentamente sulfato amónico hasta una concentración final de 0,75 M (4 °C). La mezcla fue centrifugada nuevamente a 4 °C (10 min, 10000xg) y el sobrenadante resultante fue añadido a una columna de butil-sefarosa (GE, Healthcare) (10 X 1 cm, Bio-Rad), previamente equilibrada en tampón de fosfato de sodio 20 mM más sulfato amónico 0,75 M (pH 7,0). La columna se lavó con tampón fosfato de sodio 20 mM más sulfato amónico 0,5 M (pH 7,0), hasta que, mediante el método de Bradford (1976), no se detectó presencia de proteína en la fracción de lavado. Finalmente, la proteína BioF-CueO se eluyó de la columna utilizando tampón fosfato de sodio 20 mM más sulfato de amonio 0,3 M (pH 7,0). La pureza de la proteína eluída se valoró por electroforesis en geles de poliacrilamida, encontrándola pura en más de un 90 %. Las fracciones elegidas se conservaron a -80 °C por un máximo de 12 meses.

**CLyt-GFP**: la proteína se purificó por cromatografía de afinidad a partir de cultivos de *E. coli* REG-1 conteniendo el plásmido pALEX2-Ca-GFP (Maestro y cols., 2008), siguiendo las instrucciones descritas en el sistema C-LYTAG de expresión y purificación de proteína (Biomedal, S.L., España).

**CLyt-βgal**: un litro de cultivo de *E. coli* BL21(DE3) conteniendo el plásmido pEG40 se creció y procesó de manera análoga al de la proteína FLyt. El extracto resultante de la sonicación fue centrifugado a 10000xg durante 10 min a 4 °C, y el sobrenadante obtenido se añadió a 5 g de DEAE-celulosa (forma fibrosa, Sigma-Aldrich), previamente equilibrada en tampón fosfato sódico 20 mM, pH 7,0. La suspensión se añadió lentamente a una columna (30 x 1,5 cm, Bio-Rad) y el extracto retenido se lavó con tampón fosfato sódico 20 mM más 1,5 M NaCl (pH 7,0) hasta que, mediante el método de Bradford (1976), no se detectó presencia de proteína en la fracción de lavado. La proteína CLyt-βgal se eluyó de la columna con tampón de fosfato de sodio 20 mM (pH 7,0) más 1,5 M NaCl y cloruro de colina 2 % (p/v). La pureza de la proteína eluída se valoró por electroforesis en geles de poliacrilamida, encontrándola pura en más de un 90 %. Las fracciones elegidas se conservaron a -80 °C por un máximo de 12 meses.

**CLyt-DAO**: se purificó a partir de extractos de *E. coli* BL21 (DE3) conteniendo el plásmido pCPC21 por un procedimiento análogo al de la proteína CLyt-βgal, aunque previo a la ruptura de las células por sonicación se añadió el di-nucleótido de adenina-flavina (FAD) como cofactor de la proteína DAO a una concentración final de 100 μM. La pureza de la proteína eluída se valoró por electroforesis en geles de poliacrilamida, encontrándola pura en más de un 90 %. Las fracciones elegidas se conservaron a -80 °C por un máximo de 12 meses.

La proteína CLyt-DAO también fue purificada utilizando como soporte nanopartículas magnéticas funcionalizadas con grupos de etildietilamina (DEAE), de radio hidrodinámico de 200 nm (fluidMAG-DEAE, Chemicell). Para ello se utilizó como muestra de partida 1 mL de extracto proteico, conteniendo 125 μg mL<sup>-1</sup> de CLyt-DAO y 875 μg mL<sup>-1</sup> de proteínas celulares de *E. coli* BL21 en tampón fosfato de sodio 20 mM, pH 7,0. La mezcla de proteínas se adicionó a 12,5 mg de nanopartículas (relación μg CLyt-DAO/ mg nanopartícula de 10:1) previamente lavadas y equilibradas en tampón fosfato de sodio 20 mM, pH 7,0. La suspensión se incubó durante 10 min a 25 °C en agitación rotatoria, y la fracción proteica no retenida en las nanopartículas se separó de las mismas haciendo uso de un imán (MagnetoPURE, Chemicell). Las partículas se lavaron 5 veces con 1 mL de tampón fosfato de sodio 20 mM más 1,5 M NaCl (pH 7,0), durante 5 min en agitación rotatoria, para finalmente eluir la proteína CLyt-DAO por incubación con 1 mL de tampón fosfato

de sodio 20 mM más 1,5 M NaCl y cloruro de colina 2 % (p/v) (pH 7,0) durante 10 min a 25 °C en agitación rotatoria.

**CLyt-int-MBP**: se trata de una proteína recombinante constituida por la etiqueta de afinidad C-LytA, un segmento de inteína ( $\Delta$ I-CM) de *Saccharomyces cerevisiae* con actividad auto-proteolítica en su extremo C-terminal inducible por cambio de pH (Banki y cols., 2005; Gillies y cols., 2008) y a continuación la proteína de unión a maltosa (MBP). Un litro de cultivo *E. coli* BLR conteniendo el plásmido pET/BI-MBP se creció a 37 °C hasta alcanzar una  $DO_{600nm}$  de 0,6. En ese momento el cultivo se enfrió en un baño de agua a 20 °C. La inducción del gen codificante para la proteína CLyt-int-MBP se llevó a cabo mediante la adición al cultivo de 0,5 mM de IPTG, manteniéndose durante 24 h a 20 °C (200 rpm). Las células se precipitaron mediante centrifugación a 5000xg durante 10 min a 4 °C, se resuspendieron en 50 mL de tampón Tris-HCl 50 mM más 2 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH 8,5 (tampón TE), y se lisaron por sonicación mediante 10 ciclos de 15 s a 4 °C (sonicador Branson 250). El extracto resultante fue centrifugado a 10000xg durante 10 min a 4 °C. El sobredadante, donde se localizó mayoritariamente la proteína CLyt-int-MBP, se diluyó cinco veces en tampón TE y se añadió lentamente a una columna (10 X 1 cm, Bio-Rad) conteniendo 3 g de DEAE-celulosa, previamente equilibrada en tampón TE. La columna se lavó con tampón Tris-HCl 50 mM más 2 mM EDTA, 1,5 M NaCl, pH 8,5 (tampón TL), hasta que, mediante el método de Bradford (1976), no se detectó presencia de proteína en la fracción de lavado. La proteína CLyt-int-MBP se eluyó de la columna con tampón TL más colina 2 % (p/v). La pureza de la proteína eluida se valoró por electroforesis en geles de poliacrilamida, encontrándola pura en más de un 90 %. Las fracciones elegidas se conservaron a -80 °C por un máximo de 12 meses.

#### **4.3.1 Eliminación de la etiqueta de afinidad CLytA de la proteína CLyt-int-MBP en fase sólida**

##### *a) Utilizando DEAE-celulosa como soporte:*

Tras la inmovilización de la proteína como se ha descrito en el apartado anterior, la columna se equilibró con 8-10 volúmenes de columna con tampón fosfato de sodio 50 mM, EDTA 2 mM, pH 6,5 (tampón TR), y a continuación se incubó a 30 °C durante 24 h con el objeto de promover la autohidrólisis de la proteína. La proteína MBP pura resultante fue eluida con el tampón TR (1-2 volúmenes de columna) y, posteriormente, el segmento de CLyt-int, así como la posible proteína completa sin digerir, fueron recuperadas de la columna por lavado con tampón TL más colina 2 % (p/v).

b) Utilizando nanopartículas magnéticas funcionalizadas con DEAE:

Se tomaron 5 mg de nanopartículas magnéticas (fluidMAG-DEAE) previamente equilibradas en tampón TE y se mezclaron suavemente con 1 mL del extracto soluble de CLyt-int-MBP (pET/BI-MBP), equilibrado en el mismo tampón, durante 5 min a 4 °C. Las partículas se separaron utilizando un imán y se lavaron 10 veces con 1 mL de tampón TL para posteriormente ser incubadas con 1 mL de tampón TR a 30 °C durante 24 h. La MBP resultante de la ruptura fue recuperada del sobrenadante tras separar las nanopartículas magnéticas haciendo uso de un imán. Posteriormente, el segmento de CLyt-int, así como la posible proteína completa sin digerir, se eluyeron de las partículas por incubación con 1 mL del tampón TL más colina 2 % (p/v) durante 10 min a 25 °C y en agitación rotatoria.

Para cuantificar el rendimiento global del procedimiento de purificación por separación con inteínas, se ensayaron 250 µg de CLyt-int-MBP pura en una relación de 50 µg de proteína/mg de nanopartícula magnética en un volumen de trabajo de 500 µL, y fracciones proteicas que contenían 100 µg de CLyt-int-MBP junto con 500 µg de otras proteínas solubles de *E. coli* (BLR) (con una relación de 10 µg de CLyt-int-MBP/ mg de nanopartículas magnéticas) en 1 mL de volumen de trabajo.

#### **4.3.2 Eliminación de la etiqueta de afinidad CLyA de la proteína CLyt-int-MBP en fase líquida**

Se empleó el sistema de dos fases formadas por la mezcla de polietilenglicol (PEG) y dextrano descrito por Maestro y cols. (2008) para las proteínas de fusión con la etiqueta C-LyA. Una fracción de proteína conteniendo 0,5 mg mL<sup>-1</sup> de CLyt-int-MBP junto con 1 mg mL<sup>-1</sup> de otras proteínas solubles de *E. coli* (BLR) en un volumen de 20 mL de tampón Tris-HCl 20 mM, pH 8,0 fue repartida suavemente en una mezcla de PEG-8000 (Sigma-Aldrich) al 6 % final (p/v) y dextrano (Sigma-Aldrich), de peso molecular promedio entre 400-500 kDa, al 6 % final (p/v). El sistema de dos fases se generó por centrifugación a 10000xg durante 5 min. La fase superior, rica en PEG, fue recuperada y lavada dos veces durante 5 min (por simple inversión de los tubos) con igual volumen de una mezcla compuesta por un 0,5 % (p/v) de PEG y un 16 % (p/v) de dextrano en tampón Tris-HCl 20 mM, pH 8,0 (una composición similar a la de la fase inferior descartada). Las dos fases se generaron de nuevo por centrifugación a 10000xg durante 5 min. Tras los lavados, la fase superior se mezcló durante 24 h en un agitador rotatorio a 30 y 37 °C con igual volumen de las siguientes variantes de mezclas de elución/ruptura: i) PEG 0,5% (p/v)/dextrano 16 % (p/v) en tampón fosfato

20 mM, pH 6,5; ii) PEG 0,5 % (p/v)/dextrano 16 % (p/v) en tampón fosfato 20 mM, 300 mM colina, pH 6,5; iii) PEG 0,5 % (p/v)/dextrano 16 % (p/v) en tampón fosfato 20 mM, 300 mM KCl, pH 6,5 y iv) PEG 0,5 % (p/v)/dextrano 16 % (p/v) en tampón fosfato 20 mM, 1000 mM KCl, pH 6,5. En cada caso el sistema acuoso de dos fases se volvió a generar por centrifugación a 10000xg durante 5 min. La cuantificación de proteínas en las dos fases se determinó por el método de Bradford (1976) y la pureza de las mismas mediante SDS-PAGE, haciendo uso de la tinción con plata.

#### 4.4 Ensayos de actividad enzimática

##### 4.4.1 Actividad $\beta$ -galactosidasa

La actividad  $\beta$ -galactosidasa se valoró por espectroscopía de absorción (Evolution 201, Thermo Scientific), midiendo a 420 nm la formación de *o*-nitrofenol (ONP,  $\epsilon_{420} = 4500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) producido por la hidrólisis del *o*-nitro-fenil- $\beta$ -D-galactopiranosido (ONPG) 30 mM en tampón de fosfato de sodio 20 mM a pH 7,0, tras parar la reacción con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (0,2 M). Una unidad de actividad enzimática (U) se definió como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 nmol de *o*-nitrofenol por minuto a 28 °C y pH 7,0 (Miller, 1972).

##### 4.4.2 Actividad lacasa

La actividad lacasa de la proteína CueO se ensayó espectrofotométricamente, valorando a 468 nm la oxidación del sustrato 2,6-dimetoxifenol (DMF) 2 mM ( $\epsilon_{468} = 49600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (Grass y Rensing, 2001), en tampón fosfato de sodio 20 mM, pH 7,0. Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 nmol de producto oxidado por minuto a 30 °C y pH 7,0.

##### 4.4.3 Actividad D-aminoácido oxidasa

La actividad D-aminoácido oxidasa de la proteína de fusión CLyt-DAO fue ensayada siguiendo el protocolo descrito por Fonda y Anderson (1967). La formación de ácido benzoil-fórmico ( $\epsilon_{252} = 12253 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), producido por la hidrólisis de D-fenilglicina (15 mM) en tampón de fosfato de sodio 20 mM (pH 7,5), se determinó espectrofotométricamente a 252 nm, tras parar la reacción con ácido acético glacial. Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 nmol de producto por minuto a 25 °C y pH 7,5.

#### 4.5 Preparación de gránulos artificiales de polihidroxicanoatos

Los gránulos artificiales de PHB recubiertos con fosfolípidos (PHBFL) se prepararon de acuerdo al protocolo descrito por Horowitz y Sanders (1994) con unas modificaciones menores. Un volumen de una solución de PHB (Sigma-Aldrich) al 5 % (p/v) en cloroformo se emulsionó en un baño de ultrasonidos (20 kHz, 1-3 min) con 20 volúmenes de una solución acuosa de colato sódico (Sigma-Aldrich) al 2 % (p/v). El cloroformo se eliminó totalmente de la emulsión en condiciones de vacío (40 °C, 60 min), y los gránulos artificiales de PHB recubiertos con colato sódico fueron recogidos por centrifugación a 10000xg durante 10 min, para posteriormente ser lavados dos veces con un volumen igual de agua destilada. A continuación, los gránulos se resuspendieron en un volumen igual de tampón de fosfato de sodio 20 mM, pH 7,0 que contenía los fosfolípidos de yema de huevo L- $\alpha$ -fosfatidil-DL-glicerol (5 mg mL<sup>-1</sup>, Sigma-Aldrich) y L- $\alpha$ -fosfatidilcolina (5 mg mL<sup>-1</sup>, Sigma-Aldrich), previamente solubilizados por sonicación en una solución acuosa de colato sódico 2 % (p/v). La mezcla resultante se dializó exhaustivamente en tampón fosfato de sodio 20 mM (pH 7,0) que contenía 25 g L<sup>-1</sup> de amberlita XAD-2, para remover el colato de sodio. Finalmente los gránulos artificiales de PHBFL se concentraron por liofilización durante 24 h a -80 °C (TELSTAR Cryodos).

Los gránulos artificiales de PHB recubiertos con oleato de sodio (PHBOL) se prepararon utilizando el protocolo descrito por Wang y cols. (2008b).

Por último, la preparación de látex a partir del bioplástico polihidroxiocanoato (PHO, Biopolis) se realizó siguiendo el método descrito por Horowitz y Sanders (1994).

#### 4.6 Inmovilización de proteínas que contienen la etiqueta de afinidad BioF a polihidroxicanoatos

##### 4.6.1 Caracterización de la interacción fasina-bioplástico

Como metodología general, 5 mg de las distintas preparaciones de polihidroxiobutirato: PHB, PHBFL ó PHBOL, se incubaron hasta 72 h con 20-30  $\mu$ g de proteína (PhaF, FLyt ó BioF- $\beta$ gal), en tampón fosfato de sodio 20 mM, pH 7,0 y en un volumen final de 100  $\mu$ L a las temperaturas de 25 y 37 °C. La fracción de proteína no unida al bioplástico fue separada por centrifugación a 10000xg durante 10 min. Los gránulos resultantes se lavaron 5 veces con tampón fosfato de sodio 20 mM más 100 mM NaCl, pH 7,0, y posteriormente se sometieron a varios tratamientos de elución de la proteína retenida con los siguientes detergentes (Sigma-Aldrich): Sarcosil 3 % (p/v), Tween-20 1 %

(p/v), Triton X-100 1 % (v/v), Colato sódico 3 % (p/v) y CHAPS 3 % (p/v). Las fracciones de proteína eluida y retenida en el gránulo se analizaron mediante SDS-PAGE. Se cargaron directamente en los geles de poliacrilamida partículas de bioplástico con proteína unida.

Para estudiar la unión de PhaF y FLYt al polihidroxi octanoato (PHO) en forma de látex, se incubaron 20 µg de proteína con 100 µL de dicho polímero (alrededor de 1.1 mg del peso seco del bioplástico), y se evaluó la estabilidad de la unión a 37 °C durante 48 h de incubación siguiendo una estrategia análoga a la descrita para las distintas preparaciones de PHB.

#### 4.6.2 Desarrollo de plásticos bioactivos

Las proteínas de fusión BioF-βgal y BioF-CueO se inmovilizaron sobre PHB (Sigma-Aldrich) en una relación de 20 µg de proteína/mg de PHB.

La actividad β-galactosidasa de la proteína BioF-βgal inmovilizada en el PHB se evaluó tal y como se describe en el apartado 4.4.1, pero con agitación rotatoria a 25 °C y durante 16 ciclos consecutivos de reacción/lavado. La mezcla de reacción después de cada ciclo fue separada de las partículas de bioplástico por centrifugación a 10000xg durante 1 min, y la reacción se detuvo en un tubo aparte con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,2 M. Entre cada ciclo las partículas de bioplástico se lavaron 3 veces con 1 mL de tampón fosfato de sodio 20 mM más 100 mM NaCl, pH 7,0.

En el caso de la lacasa bacteriana CueO se ensayó la capacidad de esta enzima para degradar la estructura de diferentes colorantes sintéticos (Sigma-Aldrich). Los ensayos se realizaron en agitación orbital (150 rpm) a 25 °C. Los colorantes sintéticos se disolvieron en tampón fosfato sódico 20 mM, pH 7,0, a la concentración que determinó una unidad de densidad óptica para el máximo de absorción descrito de cada colorante: Verde malaquita (**MG**, 1,5 µg mL<sup>-1</sup>), azul de cibacron 3G-A (**CB**, 69,3 µg mL<sup>-1</sup>), negro reactivo 5 (**RB5**, 40 µg mL<sup>-1</sup>), naranja de metilo (**MO**, 14 µg mL<sup>-1</sup>), azul reactivo 19 (**RB19**, 108 µg mL<sup>-1</sup>), Azure B (**AZ**, 7,69 µg mL<sup>-1</sup>), azul ácido 74 (**IC**, 24,8 µg mL<sup>-1</sup>), naranja ácido 74 (**AO**, 56 µg mL<sup>-1</sup>) y rojo ácido 18 (**NC**, 24 µg mL<sup>-1</sup>). La decoloración de las soluciones se determinó por espectrofotometría de absorción en el visible (Evolution 201, Thermo Scientific), valorando en el tiempo la disminución del pico máximo de absorción (en nm) descrito para cada colorante: **MG** (615), **CB** (612), **RB5** (597), **MO** (465), **RB19** (592), **AZ** (647), **IC** (608), **AO** (455) y **NC** (506).

La eliminación de color o decoloración se expresó como:  $[(A_i - A_f) / A_i] \times 100$  (donde  $A_i$  representa la absorbancia inicial de la solución que contiene el colorante y  $A_f$  la absorbancia medida a los diferentes tiempos). Como control se incubaron variantes que contenían el colorante,

el colorante más el bioplástico y la proteína BioF-CueO libre más el colorante, y se trataron todas ellas en las mismas condiciones que las muestras. Además, se obtuvieron los espectros iniciales y finales en la región del visible (800-400 nm) para las diferentes soluciones de colorantes.

#### **4.7 Actividad de la proteína DAO en la proteína de fusión CLyt-DAO inmovilizada en nanobiorreactores**

La actividad enzimática de la proteína DAO en la fusión CLyt-DAO inmovilizada en nanopartículas magnéticas fluidMAG-DEAE, se evaluó tras 1 h de incubación en condiciones diferentes de temperatura y pH, y se comparó en todos los casos tanto con la actividad inicial de la proteína inmovilizada, como con la obtenida por la proteína libre. Los ensayos de actividad se llevaron a cabo después de cada tratamiento en tampón fosfato sódico 20 mM (pH 7,5) como se describe en el apartado 4.4.3, utilizando 10 µg de enzima y 1 mg de nanopartículas. La enzima libre equilibrada a los diferentes pHs se obtuvo mediante diálisis de la misma frente a los tampones: citrato-fosfato sódico 20 mM (para pHs entre 2-6), fosfato sódico 20 mM (pH 7 y 8) y carbonato-bicarbonato 20 mM (pH 9 y 10).

Por último, la actividad de la proteína DAO fusionada a C-LytA e inmovilizada en nanopartículas magnéticas se estudió durante diez ciclos continuos de actividad a 25 °C siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 4.4.3 con objeto de evaluar la capacidad de reutilización de la enzima. Entre cada ciclo de actividad las partículas se lavaron 3 veces con 1 mL de tampón fosfato sódico 20 mM, pH 7,5 para eliminar de las nanopartículas los restos del sustrato D-fenilglicina y los productos de la reacción.

#### **4.8 Terapia enzimática contra células tumorales**

##### **4.8.1 Tratamientos**

Las células se crecieron bajo las condiciones antes mencionadas (apartado 2.1) hasta obtener un 60-70 % de confluencia en placas de cultivo de 6 pocillos (Nunc<sup>®</sup>). Se les retiró el medio de cultivo y se les añadió 1 ml de medio fresco sin antibiótico. A continuación, las células se trataron con 2 U de CLyt-DAO inmovilizada en nanopartículas magnéticas (50 µg) en presencia o ausencia del sustrato D-alanina a una concentración final de 1 mM. Como controles del experimento se incluyeron pocillos a los que se le añadió por separado: *i*) nanopartículas magnéticas, *ii*) CLyt-DAO inmovilizada en nanopartículas magnéticas, y *iii*) D-alanina, a las mismas concentraciones

utilizadas en los pocillos que fueron tratados. Las células se cultivaron bajo estas condiciones a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> durante 24 h.

#### **4.8.2 Estudio de las fases del ciclo celular por citometría de flujo**

Para estudiar las fases del ciclo celular se estudió la distribución del contenido de ADN de las células, ya que este varía en función de la fase del ciclo en que estas se encuentran. La técnica que se describe a continuación está basada en el marcaje del ADN con el agente intercalante fluorescente yoduro de propidio (IP). Este fluoróforo se excita a 480 nm y emite fluorescencia roja a 620 nm. El IP se intercala en los ácidos nucleicos de las células, emitiendo mayor o menor fluorescencia en función de su contenido de ADN.

Tras los distintos tratamientos el medio de cultivo se transfirió a un tubo y las células fueron tratadas con 1 mL de tampón fosfato salino (PBS) 2X-EDTA 0,02 % (p/v) durante 5 min y recogidas en el mismo tubo. Posteriormente las células que permanecieron pegadas en la placa se recogieron, en el mismo tubo, por tratamiento con tripsina durante 5 min con 0,5 mL de tripsina-EDTA (PAA, GmbH). Las células se obtuvieron por centrifugación (1000xg, 5 min, 4 °C), se resuspendieron en 1 mL de PBS 1X y se separaron de las nanopartículas magnéticas haciendo uso de un imán (MagnetoPURE, Chemicell). Las células se fijaron en una solución de etanol 75 % (v/v) durante al menos 30 min a -20 °C. Tras la fijación, las células se precipitaron y resuspendieron en 0,5 mL de PBS 1X con Triton X-100 0,5 % (v/v) para permeabilizar la membrana plasmática. A continuación se incubaron durante 30 min a 25 °C con Ribonucleasa A (SERVA) a una concentración final de 25 µg mL<sup>-1</sup> para degradar el ARN. Finalmente se marcó el ADN añadiendo yoduro de propidio (IP) (Sigma-Aldrich) a una concentración final de 25 ng mL<sup>-1</sup> e incubando durante 15 min a 25 °C en oscuridad.

La distribución de las fases del ciclo celular se determinó mediante citometría de flujo empleando un citómetro BD FACS Canto™ I (BD Biosciences, NJ, EE.UU), el cual está equipado con un láser de argón con una longitud de onda de excitación de 488 nm.

#### **4.8.3 Estudio de la integridad celular por microscopía de fluorescencia**

La fragmentación de la cromatina y la formación de micronúcleos son procesos asociados a la muerte celular programada. En consecuencia el marcaje fluorescente de la cromatina para su observación mediante microscopía de fluorescencia representa un método de estudio de la muerte celular. Para el marcaje de la cromatina se empleó el fluoróforo Hoechst 33342 (Molecular Probes),

el cual penetra en la célula sin necesidad de permeabilización, se une al ADN y permite la distinción entre núcleos fragmentados e íntegros.

Tras los tratamientos, las células cultivadas en placas de 6 pocillos se lavaron con PBS 1X. A continuación se realizó el marcaje de la cromatina incubando las células durante 15 min con Hoechst 33342 a una concentración final de  $3 \mu\text{g mL}^{-1}$  a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  y en oscuridad. Tras la incubación los pocillos se lavaron con PBS 1X y las células se observaron por microscopía de fluorescencia en un microscopio de fluorescencia invertida (Nikon Eclipse TE2000-U, Nikon instruments Inc., NY) provisto de una cámara digital (Nikon DS-1QM). Adicionalmente las células también se marcaron con el agente intercalante del ADN yoduro de propidio (Sigma-Aldrich) a una concentración final de  $25 \text{ ng mL}^{-1}$  e incubando durante 15 min a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  en oscuridad.

#### 4.9 Desarrollo de electrodos enzimáticos

Todos los experimentos de electroquímica relacionados con el desarrollo de electrodos enzimáticos se realizaron utilizando una celda electroquímica de tres electrodos convencionales y en atmósfera de argón. Un alambre espiral de platino fue utilizado como electrodo auxiliar y un electrodo de Ag/AgCl en 3 M KCl, conectado a la celda por un capilar de *Luggin* con la misma solución electrolítica fue utilizado como electrodo de referencia. La célula fue conectada a un potenciostato  $\mu$ Autolab tipo III controlado por el programa GPES. Todos los potenciales a lo largo de este trabajo se citan con relación al electrodo de referencia Ag/AgCl.

##### 4.9.1 Funcionalización de electrodos de grafito con *N,N* dietiletilendiamina mediante el método de sales de diazonio

Se emplearon barras de grafito de Grado 1, espectroscópicamente puras, (TedPella, Inc) de 3 mm de grosor que se modificaron con la sal de diazonio del ácido 4-amino-fenilacético (APA). Para ello, se tomaron 956  $\mu\text{L}$  de una solución 4,2 mM de la amina aromática en 1 M HCl/etanol (50:50, v/v), y se incubaron a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 5 min con 44  $\mu\text{L}$  de una solución de nitrito sódico  $7,6 \text{ mg mL}^{-1}$  preparada en  $\text{H}_2\text{O}$ /etanol (50:50, v/v). La mezcla resultante se añadió a una célula electroquímica ( $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ) que contenía 20 mL de una solución acuosa 100 mM HCl /etanol (50:50, v/v), quedando de esta forma la sal de diazonio del APA a una concentración final de 0,19 mM. El acoplamiento del grupo aromático al electrodo de grafito se logró mediante dos ciclos continuos de voltametría cíclica entre 0,5 y -0,3 V a una velocidad de barrido de  $50 \text{ mVs}^{-1}$  (Dos Santos y cols., 2010). El electrodo modificado se lavó secuencialmente con etanol absoluto y agua destilada, para luego sumergirse

durante 3 h a 4 °C en una solución de dioxano conteniendo *N*-hidroxisuccinimida 100 mM (NHS; Sigma) y 1-etil-3-[3-(dimetilamino) propil]carbodiimida 100 mM (EDAC; Sigma). El electrodo se lavó posteriormente con dioxano 3 veces y se dejó secar al aire (Madoz y cols., 1997). A continuación, se sumergió durante 24 h a 4 °C en una solución acuosa que contenía etanolamina (EA, Sigma) y *N,N*-dietil-etilendiamina (DEAEA, Sigma) en una relación molar 8:1, siendo la EA un espaciador entre las moléculas de DEAEA, la cual es una amina terciaria análoga de colina que se utilizó como punto de anclaje del dominio C-LytA. Finalmente, los electrodos se lavaron con agua destilada y se conservaron a 4 °C en tampón fosfato de sodio 20 mM, pH 7,0.

#### 4.9.2 Funcionalización con DEAE de andamios de nanotubos de carbono multi-pared

Los andamios de nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNTs) funcionalizados con DEAE se prepararon de acuerdo a la metodología descrita por Gutiérrez y cols. (2007), utilizando DEAE-dextrano (Sigma-Aldrich) como agente dispersante de los nanotubos.

#### 4.9.3 Inmovilización de enzimas en electrodos de grafito y andamios de MWCNTs

El área funcionalizada de los electrodos de grafito se puso en contacto con una solución 0,1 g L<sup>-1</sup> de la proteína CLyt-βgal ó CLyt-DAO en tampón fosfato de sodio 20 mM, pH 7,0 durante 15 min a 25 °C. A continuación se lavó durante 15 min a 25 °C en tampón fosfato de sodio 20 mM más 100 mM de NaCl (pH 7,0), para eliminar la proteína unida inespecíficamente. En los experimentos realizados para comprobar la reversibilidad de la unión de CLyt-βgal a los electrodos de grafito funcionalizados, se utilizaron soluciones de cloruro de sodio y de colina a una concentración de 1 M. La enzima β-galactosidasa de *E. coli* (Sigma) se utilizó como control de unión no específica a los electrodos de grafito.

Para la inmovilización de proteínas en los andamios (MWCNTs) funcionalizados con DEAE se procedió de manera similar, pero a diferencia de los electrodos de grafito se sumergió la estructura completa del andamio en la solución proteica.

#### 4.9.4 Evaluación de la proteína inmovilizada mediante voltametría cíclica

Para evaluar la inmovilización de la proteína CLyt-βgal sobre los electrodos funcionalizados, se llevaron a cabo experimentos en una célula conteniendo como electrolito soporte 50 mL de tampón fosfato sódico 20 mM, pH 7,0 y a 25 °C. Como sustrato sintético de la enzima β-galactosidasa se utilizó el *p*-aminofenil β-D-galactopiranosido (PAPG, Sigma), a una concentración final de 2,5 mM

ó 4 mM. La hidrólisis del PAPG se siguió mediante voltametría cíclica (VC) entre los potenciales de 0,4 y -0,2 V ( $100 \text{ mVs}^{-1}$ ), estudiando la aparición de picos de oxidación-reducción debidos a la formación del producto de la reacción *p*-aminofenol (PAP) (Madoz y cols., 1997), que presenta características redox.

En el caso de la proteína CLyt-DAO los experimentos de VC se llevaron a cabo barriendo entre los potenciales comprendidos entre 0,0 y -0,7 V a una velocidad de  $100 \text{ mVs}^{-1}$ , y empleando como electrolito 50 mL de tampón fosfato sódico 20 mM, pH 7,0, suplementado en su caso con D-alanina o D-fenilglicina a una concentración final de 5 mM.

Durante los estudios de estabilidad diferentes electrodos de grafito fueron funcionalizados y almacenados en tampón fosfato de sodio 20 mM, pH 7,0 a 4 °C. Cada 24 h se tomó un electrodo funcionalizado de grafito, se incubó con una solución fresca de la proteína CLyt- $\beta$ gal y se evaluó la actividad  $\beta$ -galactosidasa frente al sustrato PAPG durante tres ciclos continuos por VC. Entre cada determinación, los electrodos se lavaron 3 veces con tampón fosfato de sodio 20 mM más 100 mM de NaCl (pH 7,0), para eliminar los excesos de sustrato y los productos acumulados en la superficie del electrodo durante la reacción.

#### 4.9.5 Amperometría

La amperometría se llevó a cabo en una célula electroquímica con la misma configuración que en el caso de la VC, conteniendo 10 mL de electrolito compuesto por tampón fosfato de sodio 20 mM, pH 7,0 y concentraciones crecientes del sustrato PAPG a una temperatura de 25 °C. La actividad  $\beta$ -galactosidasa de la proteína de fusión CLyt- $\beta$ gal se siguió estudiando la aparición de un pico de oxidación a +170 mV vs Ag/AgCl, debido a la aparición del producto de reacción PAP en el tiempo.



*Capítulo IV*

**RESULTADOS**

UNIVERSITAS

Miguel

Hernández

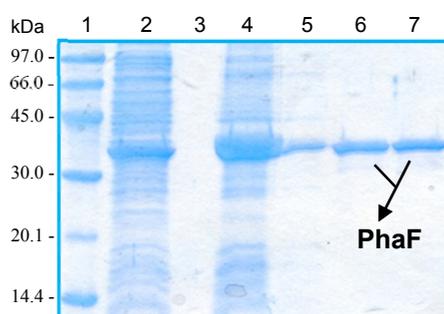


## 1. INMOVILIZACIÓN DE PROTEÍNAS EN POLIHIDROXIALCANOATOS MEDIANTE EL DOMINIO DE UNIÓN A BIOPLÁSTICOS DE LA FASINA PhaF

### 1.1 Caracterización y estabilidad de la interacción PhaF-bioplástico

Como se ha comentado previamente en la Introducción, tanto secuencias completas de fasinas como partes de ellas han sido previamente descritas como etiquetas de afinidad para la inmovilización y purificación de proteínas recombinantes en gránulos de PHAs (Moldes y cols., 2004, 2006; Wang y cols., 2008b; Atwood y Rehm, 2009). En nuestro caso, nos decidimos a profundizar en el estudio de la unión a bioplásticos del dominio N-terminal de la fasina PhaF (BioF) de *Pseudomonas putida* KT2442, cuya función originalmente descrita como etiqueta de afinidad incluía su unión a gránulos nativos de polihidroxicanoatos de cadena media (mcl-PHAs) como el polihidroxiocanoato (PHO) (Moldes y cols., 2004, 2006). Nos propusimos como primer objetivo ampliar este procedimiento de inmovilización a partículas de polihidroxibutirato (PHB), el bioplástico más comercializado en la actualidad, lo cual implicaría por lo tanto expandir el campo de sus aplicaciones biotecnológicas.

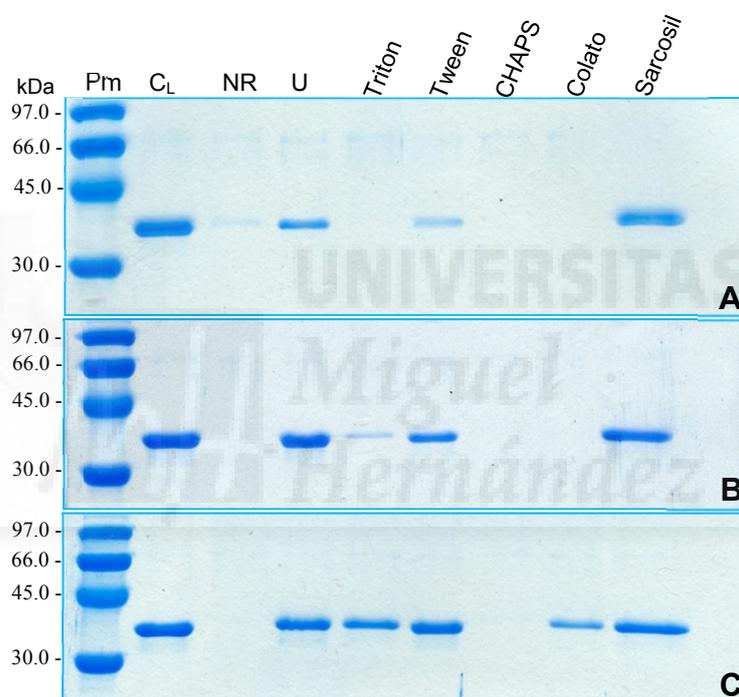
Puesto que el dominio BioF es insoluble cuando se expresa sin fusionar (A. Prieto, comunicación personal), decidimos utilizar en una primera instancia como control la fasina PhaF completa. Para ello, la proteína PhaF fue expresada en *E. coli* BL21(DE3), replegada por dilución rápida a partir de cuerpos de inclusión (solubilizados en urea) y purificada por cromatografía de interacción hidrofóbica en columnas de butil-sefarosa. La Figura 13 muestra el análisis de la expresión y purificación de PhaF por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE).



**Figura 13.** Análisis de la expresión y purificación de PhaF mediante SDS-PAGE (15%). 1, marcador de peso molecular (GE, Healthcare); 2, sonicado de células de *E. coli* BL21 (pETPhaF); 3, vacío; 4, cuerpos de inclusión solubilizados en urea 8M; 5, PhaF replegada por dilución rápida; 6 y 7, fracciones de PhaF purificadas.

La inmovilización de la proteína PhaF pura sobre gránulos de PHB se llevó a cabo tal y como se indica en Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos muestran (Figura 14A) que la proteína se retiene con elevada afinidad a partículas sólidas del bioplástico, lo cual indica que la proteína puede

reconocer PHAs de cadena corta (scl-PHAs). Además, y dado que el PHB comercial no se encuentra recubierto de la capa proteolípida de composición variable que lo acompaña de manera natural, el resultado sugiere que este recubrimiento no es necesario para una unión efectiva de la fasina al gránulo. La estabilidad de la interacción PhaF-PHB fue estudiada por incubación con diferentes detergentes como Sarcosil 3 % (p/v), Triton X-100 1 % (v/v), Tween-20 1 % (p/v), CHAPS 3 % (p/v) y Colato sódico 3 % (p/v), ya que se ha descrito previamente que la fasina puede desprenderse de gránulos de PHO en presencia de surfactantes (Moldes y cols., 2004). Como se muestra en la Figura 14A, PhaF pudo eluirse de manera mayoritaria del bioplástico únicamente con Sarcosil y, en menor medida, con Tween.



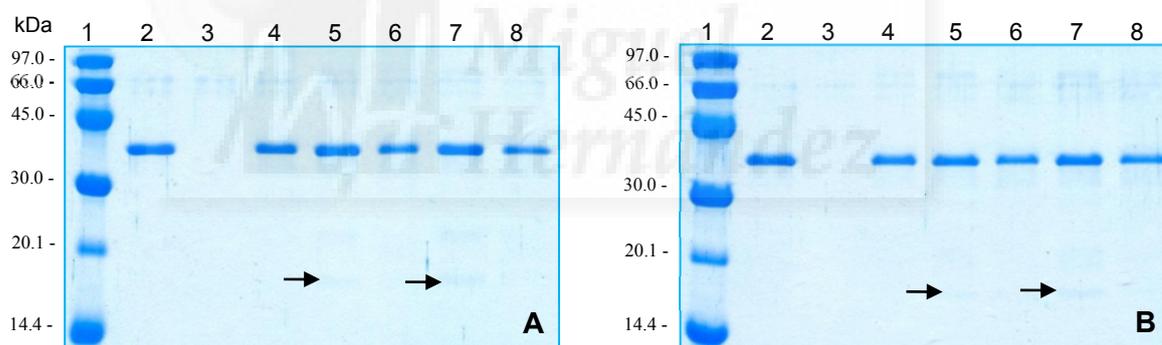
**Figura 14.** Evaluación de la interacción de PhaF (30 µg) con diferentes preparaciones de PHB (5 mg) por incubación con diferentes detergentes mediante SDS-PAGE. A) PHB comercial puro (Sigma-Aldrich); B) PHB recubierto con oleato sódico 10 mM; C) PHB recubierto con fosfatidil glicerol 5 mg mL<sup>-1</sup> y fosfatidil colina 5 mg mL<sup>-1</sup>

Pm, marcador de peso molecular; CL, control de PhaF libre; NR, PhaF no retenida al PHB; U, PhaF unida al PHB

Por otra parte, para evaluar el efecto de un recubrimiento hidrofóbico de la partícula sobre la fortaleza de la interacción entre la fasina y el bioplástico, las partículas de PHB fueron recubiertas con ácido oleico, un componente habitual en las preparaciones artificiales de PHAs (Wang y cols., 2008b). En este caso (Figura 14B) se observó un comportamiento similar, con mayores eficiencias de elución por Sarcosil y Tween y adicionalmente una apreciable eficacia del Triton X-100. Además, con el fin de emular aún más las condiciones naturales del gránulo de plástico en un medio

de composición definida, las partículas de PHB se recubrieron de una mezcla lipídica equivalente de fosfatidil glicerol y fosfatidil colina. En este caso (Figura 14C), la fasa PhaF pudo eluirse con un apreciable rendimiento con todos los detergentes ensayados en el estudio a excepción del CHAPS. Estos resultados sugieren por lo tanto que el recubrimiento hidrofóbico de los gránulos de PHAs debilita su interacción con la fasa PhaF, por lo que se optó con la continuación de los estudios sobre preparaciones de PHAs desprovistas de cualquier cubierta hidrofóbica.

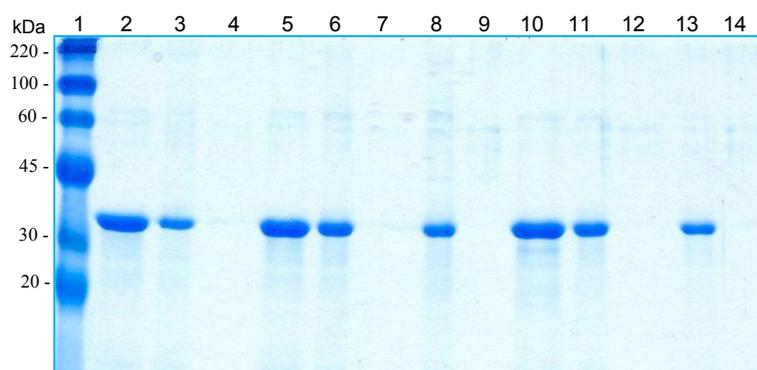
La estabilidad de la unión de PhaF al PHB fue evaluada a 25 y 37 °C. Tras un periodo de incubación de 24 ó 48 h, la fasa permanecía unida de manera estable al bioplástico, sin señales apreciables de degradación (Figura 15), y sin diferencias significativas en cuanto a la temperatura de incubación. Por esta razón, y para posteriores estudios de evaluación de la estabilidad de la unión, se emplearán como tiempo y temperatura de incubación 24 h y 37 °C, respectivamente. Por su parte, el control soluble de PhaF mostró ciertos indicios de degradación en los geles de poliácridamida después de 24 y 48 horas de incubación (Figura 15) que no se observaron cuando la proteína estaba unida al bioplástico, mostrando un efecto protector del mismo.



**Figura 15.** Evaluación de la unión de 30 microgramos de PhaF a partículas de PHB (5 mg) en función del tiempo de incubación a 25 (A) y 37 °C (B) mediante SDS-PAGE (15%). Las flechas indican productos de degradación de PhaF libre.

- |                                      |                                 |
|--------------------------------------|---------------------------------|
| 1, marcador de peso molecular        | 5, control de PhaF libre (24 h) |
| 2, control de PhaF libre (hora cero) | 6, PhaF unida al PHB (24 h)     |
| 3, PhaF no retenida (hora cero)      | 7, control de PhaF libre (48 h) |
| 4, PhaF unida (hora cero)            | 8, PhaF unida al PHB (48 h)     |

Por otro lado, la Figura 16 muestra que la incubación de PhaF con el bioplástico a diferentes pH parece no tener una influencia directa en la unión y en la estabilidad de la misma en el tiempo, ya que, la proteína permanece unida al PHB bajo todas las condiciones de pH (entre 2-9) a 37 °C durante 24 h de incubación.

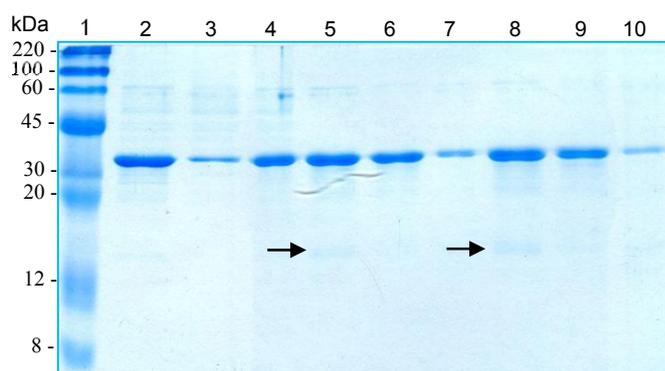


**Figura 16.** Evaluación mediante SDS-PAGE de la unión de 30 microgramos de PhaF a 5 mg de PHB durante 24 h de incubación a 37 °C y a diferentes pH.

- |                                    |  |
|------------------------------------|--|
| 1, marcador de peso molecular      | 8, PhaF unida al PHB, unión a pH 7,0/incubación a pH 9,0       |
| 2, control PhaF libre pH 7,0       | 9, fracción PhaF liberada, unión a pH 7,0/incubación a pH 9,0  |
| 3, PhaF unida al PHB pH 7,0        | 10, control PhaF libre pH 2,0                                  |
| 4, fracción PhaF liberada a pH 7,0 | 11, PhaF unida al PHB pH 2,0                                   |
| 5, control PhaF libre pH 9,0       | 12, fracción PhaF liberada a pH 2,0                            |
| 6, PhaF unida al PHB pH 9,0        | 13, PhaF unida al PHB, unión a pH 7,0/incubación a pH 2,0      |
| 7, fracción PhaF liberada a pH 9,0 | 14, fracción PhaF liberada, unión a pH 7,0/incubación a pH 2,0 |

Por su parte, nos propusimos realizar estudios similares con PHO como ejemplo de polihidroxicanoato de cadena media. Sin embargo, los mcl-PHAs como el PHO no forman gránulos sino láminas y su preparación en sólido es más complicada al ser bioplásticos más amorfos que el PHB. Por este motivo, nos decidimos a analizar la interacción PhaF-PHO mediante la utilización de plástico en suspensión acuosa en forma de látex.

Los estudios de estabilidad realizados con PhaF y polihidroxiocanoato comercial en forma de látex mostraron una unión fasina-bioplástico menos estable, donde la cantidad de proteína no retenida en el látex de PHO se incrementa con el tiempo de incubación, de manera que tras 48 h de incubación casi toda la proteína que se encontraba unida al PHO fue liberada al medio (Figura 17). Es necesario señalar que el PHB no puede obtenerse de manera estable en forma de látex, por lo que no fue posible efectuar el correspondiente estudio comparativo entre los dos tipos de plástico (PHB y PHO) en el mismo tipo de preparación, si bien los resultados sugieren que la estructura más cristalina del PHB promueve una interacción más estable con la fasina. Por su parte, tras 48 h de incubación a 37 °C la proteína libre mostró señales iniciales de degradación que no se detectaron cuando la proteína estaba unida al bioplástico, por lo que al igual que en el caso del PHB sólido, el PHO en forma de látex también estaba protegiendo a PhaF de la degradación.

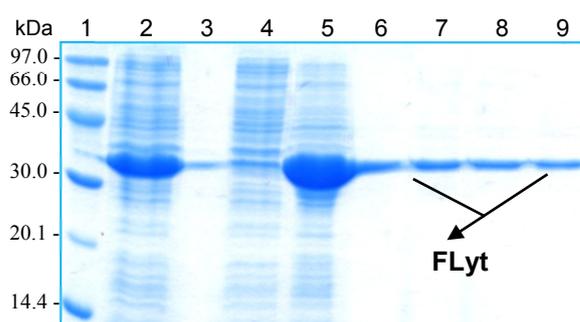


**Figura 17.** Evaluación de la estabilidad de la unión de PhaF (20  $\mu$ g) al PHO látex (1,1 mg) durante 48 h de incubación a 37 °C mediante SDS-PAGE. Las flechas indican productos de degradación de PhaF libre.

- |   |                                      |
|---|--------------------------------------|
| 1, marcador de peso molecular               | 6, PhaF liberada del PHO látex, 24 h |
| 2, PhaF libre, hora cero                    | 7, PhaF retenida al PHO látex, 24 h  |
| 3, PhaF no retenida al PHO látex, hora cero | 8, PhaF libre, 48 h                  |
| 4, PhaF unida al PHO látex, hora cero       | 9, PhaF liberada del PHO látex, 48 h |
| 5, PhaF libre, 24 h                         | 10, PhaF retenida al PHO látex, 48 h |

## 1.2 Adsorción de proteínas de fusión con BioF a PHB comercial

Para demostrar que el dominio de unión al bioplástico de la fasina PhaF (BioF) era capaz de servir como etiqueta de afinidad para anclar proteínas de interés a PHB comercial, empleamos la proteína quimérica FLyt, producto de la fusión del BioF con el módulo C-terminal de la autolisina LytA de *Streptococcus pneumoniae*, que ya había sido previamente estudiada en cuanto a su interacción con el PHO (Moldes y cols., 2004). La proteína FLyt se purificó a partir de cuerpos de inclusión según se detalla en Materiales y Métodos y como se muestra en la Figura 18.

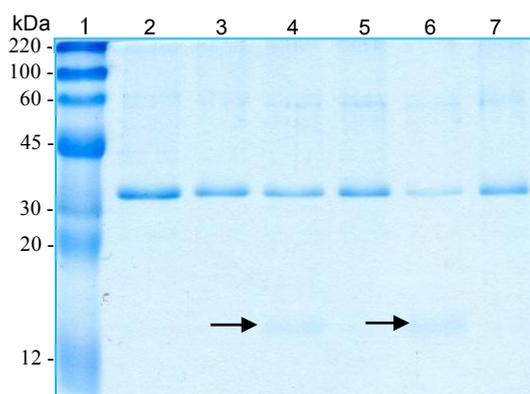


**Figura 18.** Análisis de la expresión y purificación de FLyt por SDS-PAGE.

- |   |
|---|
| 1, marcador de peso molecular                                 |
| 2, sonicado de <i>E.coli</i> CC118 (pNFA2)                    |
| 3, vacío  |
| 4, fracción soluble después de centrifugar el sonicado        |
| 5, cuerpos de inclusión en urea 8M                            |
| 6-9, fracciones puras de FLyt obtenidas por filtración en gel |

FLyt, como PhaF, fue capaz de unirse al PHB comercial libre de lípidos, demostrando la potencialidad de la etiqueta de afinidad BioF para anclar/inmovilizar proteínas de interés biotecnológico a plásticos comerciales biodegradables (Figura 19). Los estudios de estabilidad de la unión del BioF al bioplástico mostraron resultados similares a los que se habían obtenido para la

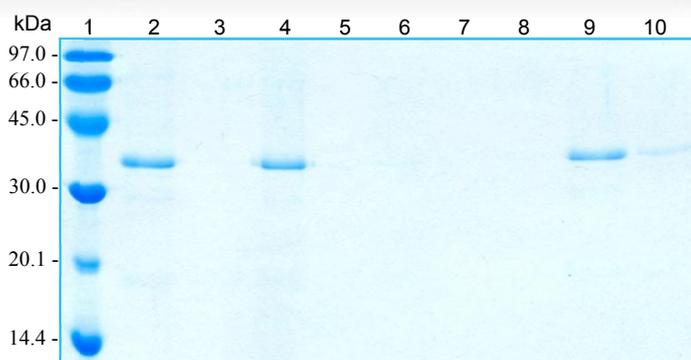
fasina PhaF. Como se muestra en la Figura 19, FLYt libre en solución comenzó a degradarse tras 24 h de incubación a 37 °C con mucha mayor intensidad que PhaF (Figura 15B), mientras que la proteína unida al PHB no mostró señales de degradación después de 48 h de incubación a 37 °C. La unión al bioplástico, al igual que para la fasina, protege por lo tanto a la proteína de fusión de la degradación y de una manera mucho más evidente en este caso.



**Figura 19.** Evaluación de la estabilidad de la unión de 20 microgramos de FLYt a 5 mg PHB durante 48 h de incubación a 37 °C. Las flechas indican productos de degradación de PhaF libre.

- 1, marcador de peso molecular
- 2, control de FLYt libre (hora cero)
- 3, FLYt unida a 5 mg de PHB (hora cero)
- 4, control de FLYt libre (24 h)
- 5, FLYt unida a 5 mg de PHB (24 h)
- 6, control de FLYt libre (48 h)
- 7, FLYt unida a 5 mg de PHB (48 h)

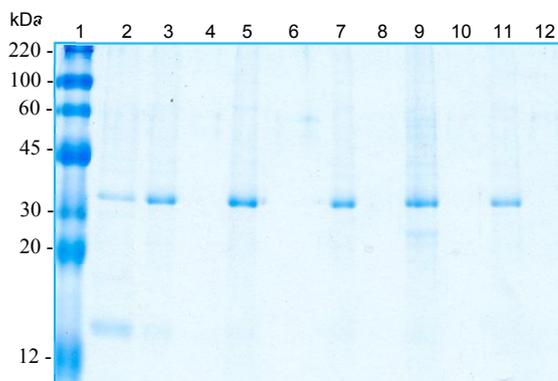
Adicionalmente, al igual que PhaF, FLYt pudo únicamente eluirse del PHB comercial con alto rendimiento con Sarcosil (Figura 20), diferenciándose de la fasina en la capacidad parcial de elución mostrada por el CHAPS y la ineficacia del Tween en este caso.



**Figura 20.** Evaluación de la estabilidad de la interacción de FLYt con el PHB frente a detergentes.

- 1, marcador de peso molecular
- 2, control FLYt libre
- 3, FLYt no retenida al PHB
- 4, FLYt unida al PHB
- 5, vacío
- 6, FLYt eluída del PHB, Triton X-100 1 % (v/v)
- 7, FLYt eluída del PHB, Tween-20 1 % (p/v)
- 8, FLYt eluída del PHB, Colato sódico 3 % (p/v)
- 9, FLYt eluída del PHB, Sarcosil 3 % (p/v)
- 10, FLYt eluída del PHB, CHAPS 3 % (p/v)

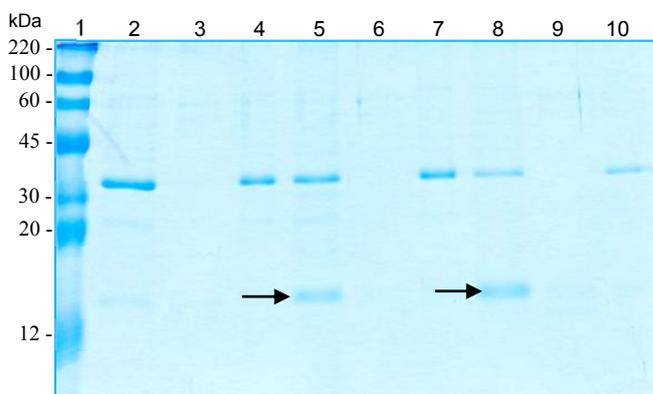
Por su parte la estabilidad de la interacción de la proteína de fusión con el bioplástico no se afectó significativamente por el pH o la concentración salina (Figura 21).



**Figura 21.** Evaluación de la estabilidad de la interacción de FLYt con el PHB frente al pH y la concentración salina durante 24 h de incubación a 37 °C mediante SDS-PAGE.

- |  |   |
|--|---|
| 1, marcador de peso molecular                | 7, FLYt unida al PHB, unión a pH 7,0/incubación a pH 9,0      |
| 2, control de FLYt libre, pH 7,0             | 8, FLYt liberada del PHB, unión a pH 7,0/incubación a pH 9,0  |
| 3, FLYt unida al PHB, pH 7,0                 | 9, FLYt unida al PHB, unión a pH 7,0/incubación a pH 4,0      |
| 4, FLYt liberada del PHB, pH 7,0             | 10, FLYt liberada del PHB, unión a pH 7,0/incubación a pH 4,0 |
| 5, FLYt unida al PHB, pH 7,0, 0,5 M NaCl     | 11, FLYt unida al PHB, unión a pH 7,0/incubación a pH 2,0     |
| 6, FLYt liberada del PHB, pH 7,0, 0,5 M NaCl | 12, FLYt liberada del PHB, unión a pH 7,0/incubación a pH 2,0 |

Adicionalmente, al igual que la fasinasa PhaF, FLYt se unió al PHO en formato de látex. Tras 48 h de incubación a 37 °C la fusión permaneció unida establemente al PHO sin apreciables señales de degradación, demostrándose también el efecto protector de este bioplástico. Las flechas negras en la Figura 22, indican las bandas de degradación de los controles libres de la proteína.



**Figura 22.** Evaluación de la estabilidad de la unión de FLYt al látex de PHO durante 48 h de incubación a 37 °C mediante SDS-PAGE.

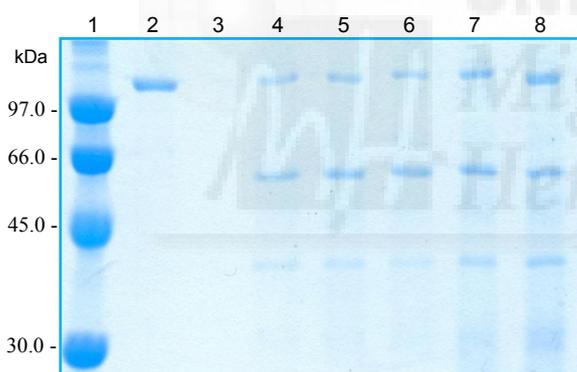
- |   |
|---|
| 1, marcador de peso molecular               |
| 2, FLYt libre, hora cero                    |
| 3, FLYt no retenida al PHO látex, hora cero |
| 4, FLYt unida al PHO látex, hora cero       |
| 5, FLYt libre, 24 h                         |
| 6, FLYt liberada del PHO látex, 24 h        |
| 7, FLYt unida al PHO látex, 24 h            |
| 8, FLYt libre, 48 h                         |
| 9, FLYt liberada del PHO látex, 48 h        |
| 10, FLYt unida al PHO látex, 48 h           |

### 1.3 Aplicaciones biotecnológicas relacionadas con la interacción BioF- bioplástico

#### 1.3.1 Biorreactores enzimáticos

Una vez que se demostró la capacidad y funcionalidad de la etiqueta de afinidad BioF para unirse de manera estable a plásticos biodegradables comerciales como el PHB, se evaluó la capacidad enzimática del sistema con una proteína híbrida donde el BioF se fusionó a la enzima  $\beta$ -galactosidasa (BioF- $\beta$ gal) (Moldes y cols., 2004), con el objeto de evaluar la posibilidad de la utilización de PHAs en la construcción de biorreactores enzimáticos sostenibles y biodegradables.

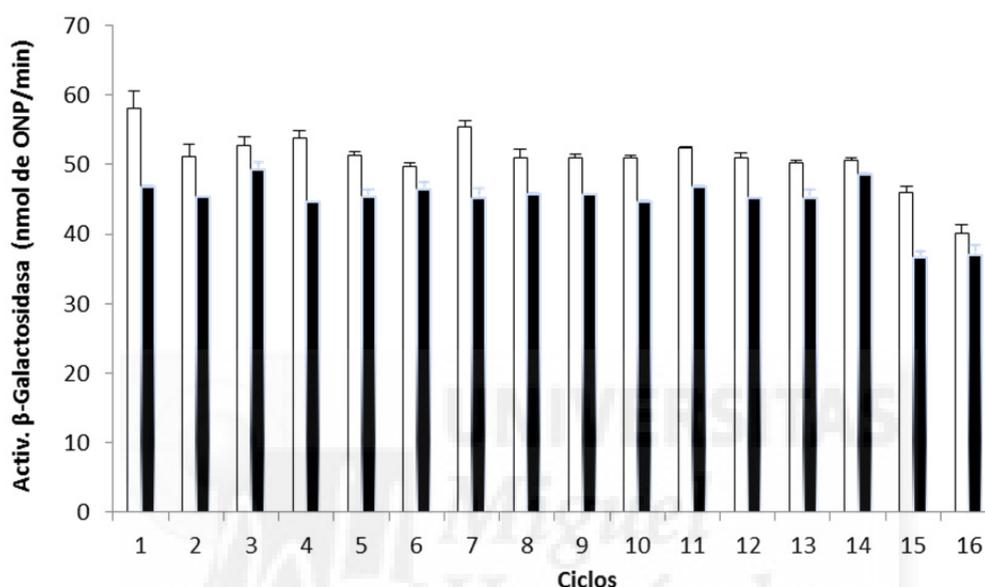
En primer lugar se intentó purificar la proteína de fusión BioF- $\beta$ gal por varios procedimientos, incluyendo cromatografías de interacciones hidrofóbicas (butil-sefarosa), intercambio iónico (DEAE-celulosa, CM-celulosa), filtración en gel (Sefacril 200 HR) y precipitación fraccionada con sulfato de amonio. Sin embargo, en ningún caso se logró la purificación total de la proteína, obteniéndose los mejores resultados tras el empleo de cromatografía de interacciones hidrofóbicas (Figura 23).



**Figura 23.** Análisis de la purificación de BioF- $\beta$ gal mediante SDS-PAGE (10 %). BioF- $\beta$ gal fue purificada parcialmente por interacciones hidrofóbicas en columnas de butil-sefarosa.  
 1, marcador de peso molecular  
 2, control de  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli*  
 3, vacío  
 4-8, fracciones de BioF- $\beta$ gal parcialmente purificadas

Aunque no fue posible establecer un protocolo para la purificación de la enzima a homogeneidad electroforética, decidimos continuar adelante con esta parte del trabajo puesto que los estudios físico-químicos de estabilidad, que requieren la obtención de proteína pura, ya quedaron establecidos con las proteínas PhaF y FLyt (ver más arriba). Además, es necesario recordar que una gran parte de las enzimas utilizadas a nivel industrial no se emplean totalmente purificadas al suponer el proceso de purificación un incremento en los costes que no siempre es aceptable, por lo que consideramos que nuestra aproximación, en la que analizaremos únicamente la actividad enzimática de la proteína, es correcta.

La actividad de la enzima BioF- $\beta$ gal anclada al bioplástico se determinó durante 16 ciclos continuos a 25 °C frente al sustrato sintético *o*-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido (ONPG), cuyo producto de reacción (*o*-nitrofenol) puede seguirse espectroscópicamente. Como se muestra en la Figura 24, la enzima inmovilizada mostró una actividad estable que sólo disminuyó ligeramente después de 48 (ciclo 15) y 96 h (ciclo 16) de incubación, demostrando la inexistencia apreciable de desorción de proteína tras cada ciclo.



**Figura 24.** Formación de *o*-nitrofenol (nmol de ONP/min) a partir de la hidrólisis del *o*-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido (ONPG) 30 mM, durante 16 ciclos continuos de actividad enzimática de BioF- $\beta$ gal inmovilizada sobre 5 mg de PHB comercial. El intervalo de tiempo entre ciclos fue aproximadamente de 20 min. Los ciclos 15 y 16 corresponden a determinaciones de actividad tras 48 y 96 h de incubación, respectivamente. Experimento 1: columnas en blanco, Experimento 2: columnas en negro. Cada experimento es a su vez la media de 3 experimentos simultáneos.

### 1.3.2 Biodecoloración de colorantes textiles

La industria textil, por su intensa actividad y por el elevado consumo de sustancias químicas complejas y de agua, es en la actualidad una de las principales fuentes de contaminación medioambiental a nivel mundial, estimándose incluso que constituye la industria que con su actividad más contamina el agua del planeta (Sarayu y Sandhya, 2012; Verma y cols., 2012; Zaharia y Suteu, 2012). Las sustancias químicas y colorantes remanentes de estas actividades son vertidos como residuos a los cursos de aguas (ríos y lagos) creando un severo problema medioambiental y de salud pública (Verma y cols., 2012; Zaharia y Suteu, 2012). El alto contenido en colorantes complejos de difícil biodegradación hace que estas aguas residuales sean muy coloreadas, lo que dificulta la

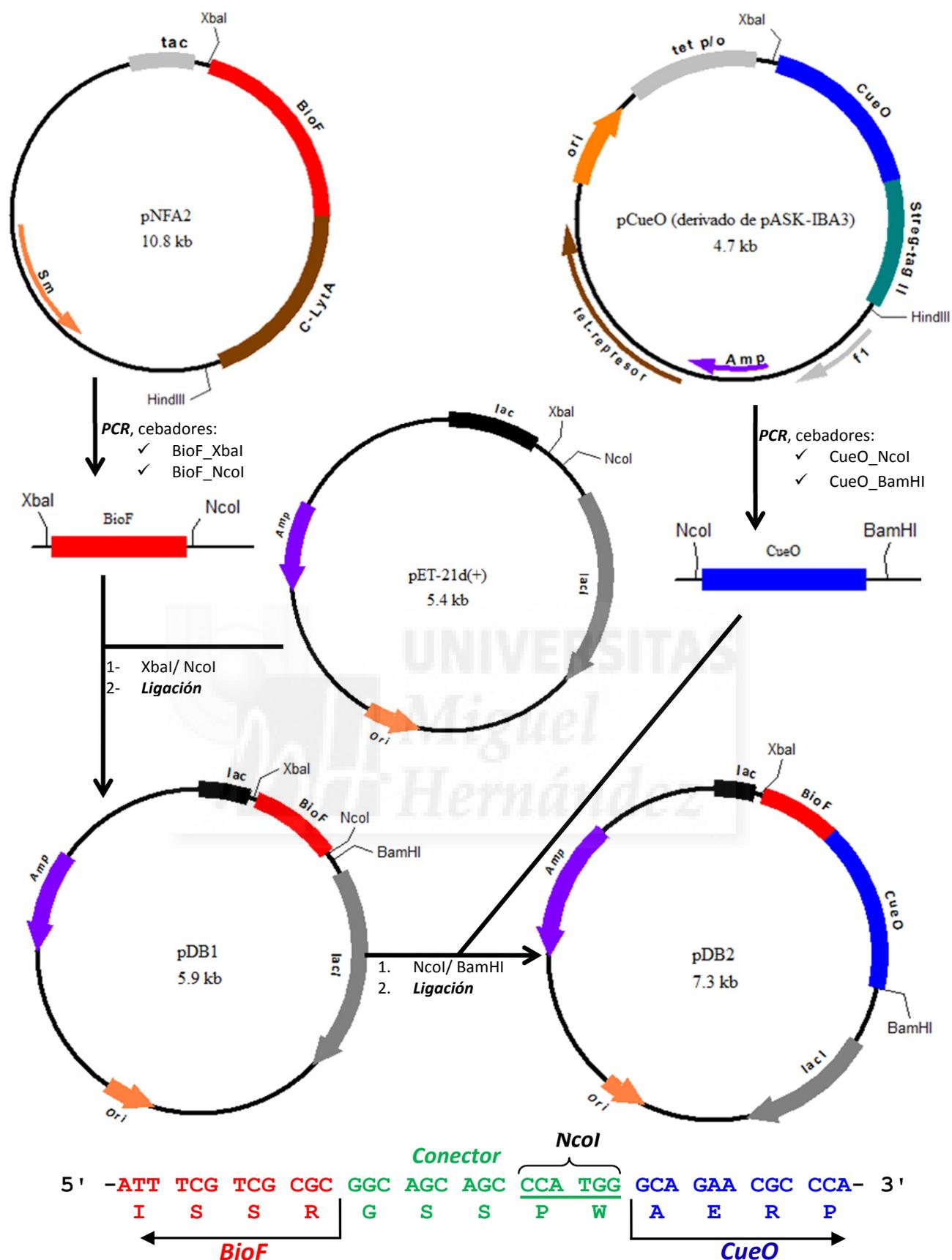
entrada de luz y por tanto el desarrollo normal de los procesos fotosintéticos en las plantas, afectando considerablemente a la fauna acuática. Además, la mayoría de estas sustancias recalcitrantes son tóxicas, y con probados efectos carcinogénicos, mutagénicos o teratogénicos sobre varios organismos acuáticos (Verma y cols., 2012, Zaharia y Suteu, 2012).

Se ha descrito la utilización de microorganismos completos o sus enzimas (libres o inmovilizadas) para lograr la biodegradación de estas estructuras complejas y por tanto la decoloración de las aguas residuales provenientes de la industria textil (Kunamneni y cols., 2008; Majeau y cols., 2010; Mishra y cols., 2011; Wang y cols., 2012b). Entre los microorganismos más empleados se encuentran los hongos de podredumbre blanca (Nyanhongo y cols., 2002; Mishra y cols., 2011) que son poseedores de una batería enzimática compleja y eficiente en la degradación de estos compuestos. Dentro de estas enzimas se ha descrito que la familia de las lacasas, oxido-reductasas (*EC 1.10.3.2*) que contienen cobre en su estructura, juega un papel fundamental en la degradación de estos complejos coloreados (Giardina y cols., 2010; Majeau y cols., 2010).

Aprovechando las características de los PHAs como soportes biodegradables, nos propusimos realizar un estudio básico enfocado a la posible construcción de biorreactores enzimáticos respetuosos con el medio ambiente y capaces de eliminar o reducir la cantidad de colorantes en aguas residuales mediante el uso de lacasas inmovilizadas a través de BioF. A tal fin, elegimos la lacasa CueO de *E. coli*, una enzima dependiente de  $\text{Cu}^{2+}$  que, al igual que las lacasas fúngicas, pertenece a la familia de las oxidasas azules y que fisiológicamente está involucrada en la homeostasis del cobre (Grass y Rensing, 2001). Entre sus ventajas biotecnológicas, al igual que otros miembros de esta familia de enzimas, se ha comprobado *in vitro* que tiene una amplia especificidad de sustrato, pudiendo oxidar, entre otros, iones ferrosos, catecoles y sideróforos (Singh y cols., 2004). La principal ventaja de la utilización de esta enzima procariota con relación a las lacasas fúngicas es la posibilidad de clonarla y sobreexpresarla en *E. coli* (Piscitelli y cols., 2010; Santhanam y cols., 2011). Además se ha descrito que las lacasas de procariotas presentan una mayor termoestabilidad, halotolerancia y un rango de pH óptimo más amplio que el de las lacasas fúngicas (Santhanam y cols., 2011).

### ***1.3.2.1 Obtención de la proteína de fusión BioF-CueO***

Para la construcción del gen híbrido se diseñó una estrategia de clonación para fusionar el dominio BioF a CueO según el esquema representado en la Figura 25.

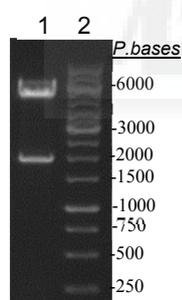


**Figura 25.** Esquema general de clonación para la obtención del plásmido pDB2 (derivado del pET-21d(+), que expresa la proteína de fusión BioF-CueO. En rojo el segmento que se corresponde con el tag de afinidad BioF y a continuación en azul el segmento de ADN que codifica para la lacasa bacteriana CueO (no está a escala).

El fragmento genético que corresponde a la etiqueta de afinidad BioF (426 pares de bases) se amplificó por PCR utilizando como ADN molde el plásmido pNFA2 (Moldes y cols., 2004) y los cebadores BioF\_XbaI y BioF\_NcoI (ver Materiales y Métodos). El fragmento amplificado de BioF fue purificado (Roche) y sometido a doble digestión con las endonucleasas *XbaI* y *NcoI*. A continuación el fragmento digerido se ligó con el vector pET-21d(+) (Novagen), para rendir el plásmido pDB1.

Por otra parte el fragmento que corresponde a la enzima CueO de *E. coli* (1464 pares de bases) fue amplificado por PCR utilizando como ADN molde el plásmido pCueO (Grass y Rensing, 2001) y los cebadores: CueO\_NcoI y CueO\_BamHI (ver Materiales y Métodos). El fragmento amplificado de CueO fue purificado (Roche) y sometido a doble digestión con las endonucleasas *NcoI* y *BamHI*.

El fragmento de ADN perteneciente a CueO fue insertado en el vector pDB1 a continuación de la etiqueta de afinidad BioF para rendir el plásmido pDB2 (Figura 25). La Figura 26 muestra la doble digestión (*XbaI/BamHI*) del plásmido pDB2, donde se obtienen dos fragmentos de un peso aproximado de 2000 y 5000 pares de bases, que se corresponden con el gen híbrido codificante para la proteína de fusión BioF-CueO y el resto del plásmido respectivamente. En todo caso, la integridad del gen híbrido se confirmó por secuenciación de ADN.

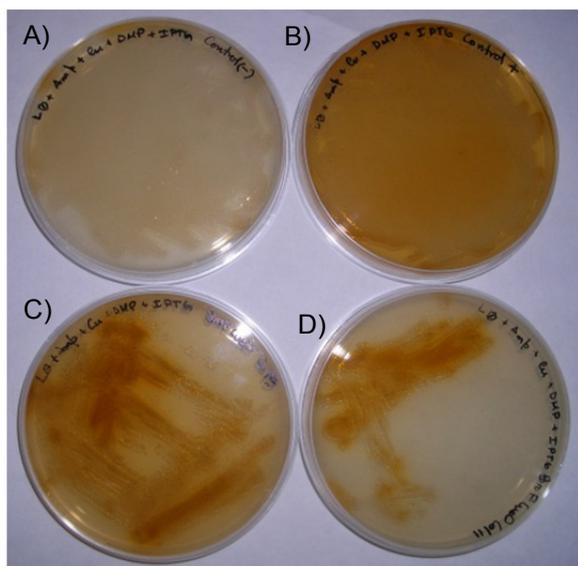


**Figura 26.** Análisis de la doble digestión del pDB2 mediante electroforesis de ADN en geles de agarosa 0,8 % (p/v).

1- doble digestión de pDB2 (*XbaI/BamHI*)  
2- marcador de peso (*Fermentas*)

Se comprobó la actividad de la proteína de fusión en células de *E. coli* (pDB2) crecidas durante 12 h a 37 °C en placas de LB agar que contenían 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de ampicilina, 1 mM de  $\text{CuSO}_4$  (cofactor de CueO), 0,5 mM IPTG (inductor de la expresión) y 2 mM de DMF como sustrato de la CueO.

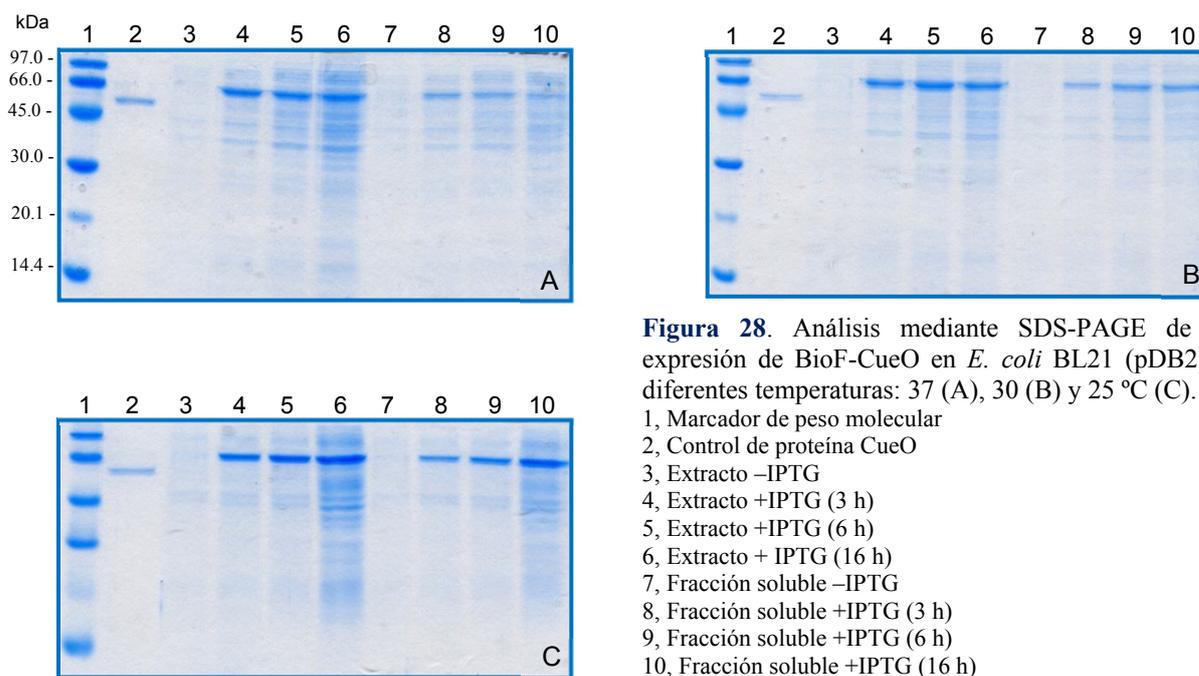
En la Figura 27 se puede observar la oxidación del sustrato 2,6-dimetoxifenol producto de la expresión de la enzima con respecto al control negativo de experimento.



**Figura 27.** Actividad enzimática CueO en presencia de DMF.

- A- *E. coli* (pET-21d (+)), control negativo
- B- *E. coli* (pCueO), control positivo
- C- y D-, dos colonias diferentes de *E. coli* (pDB2)

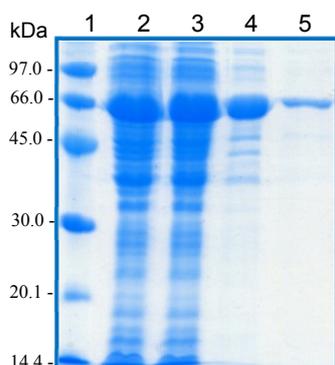
A continuación se realizaron estudios de expresión de la proteína de fusión BioF-CueO. Células de *E. coli* BL21 (DE3) conteniendo el plásmido pDB2 se crecieron a 37 °C y 200 rpm hasta alcanzar una  $DO_{600nm}$  de 0,6, momento en el cual se indujo la expresión del gen *bioF-cueO* mediante la adición de IPTG 0,5 mM y manteniéndose durante 16 h a diferentes temperaturas: 25, 30 y 37 °C. Las células se colectaron por centrifugación, se resuspendieron en tampón fosfato de sodio 20 mM más 1 mM de  $CuSO_4$  (pH 7,0), y se lisaron por sonicación rindiendo una fracción soluble y un precipitado. La Figura 28 muestra que la proteína de fusión se sobreexpresa a las temperaturas ensayadas, con una mayor cantidad de proteína soluble en la variante de expresión a 25 °C.



**Figura 28.** Análisis mediante SDS-PAGE de la expresión de BioF-CueO en *E. coli* BL21 (pDB2) a diferentes temperaturas: 37 (A), 30 (B) y 25 °C (C).

- 1, Marcador de peso molecular
- 2, Control de proteína CueO
- 3, Extracto -IPTG
- 4, Extracto +IPTG (3 h)
- 5, Extracto +IPTG (6 h)
- 6, Extracto + IPTG (16 h)
- 7, Fracción soluble -IPTG
- 8, Fracción soluble +IPTG (3 h)
- 9, Fracción soluble +IPTG (6 h)
- 10, Fracción soluble +IPTG (16 h)

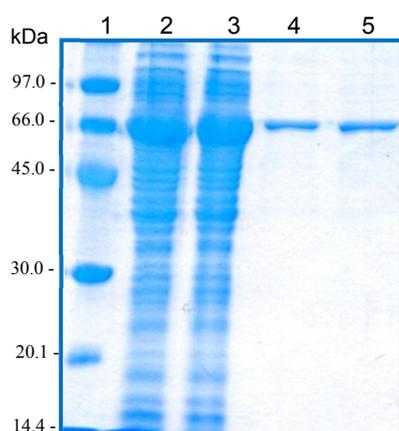
La purificación de la proteína de fusión BioF-CueO se llevó a cabo, al igual que la fusina PhaF, por cromatografía de interacciones hidrofóbicas en columnas que contenían butil-sefarosa como matriz, siguiéndose cada paso de purificación por electroforesis en geles de poliacrilamida (Figura 29).



**Figura 29.** Análisis mediante SDS-PAGE de la expresión y purificación de BioF-CueO.

1. Marcador de peso molecular
2. Extracto total de *E. coli* BL21 (pDB2)
3. Fracción soluble *E. coli* BL21 (pDB2)
4. Fracción soluble *E. coli* BL21 (pDB2) + 0,75 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
5. Fracción pura de BioF-CueO, 0,3 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

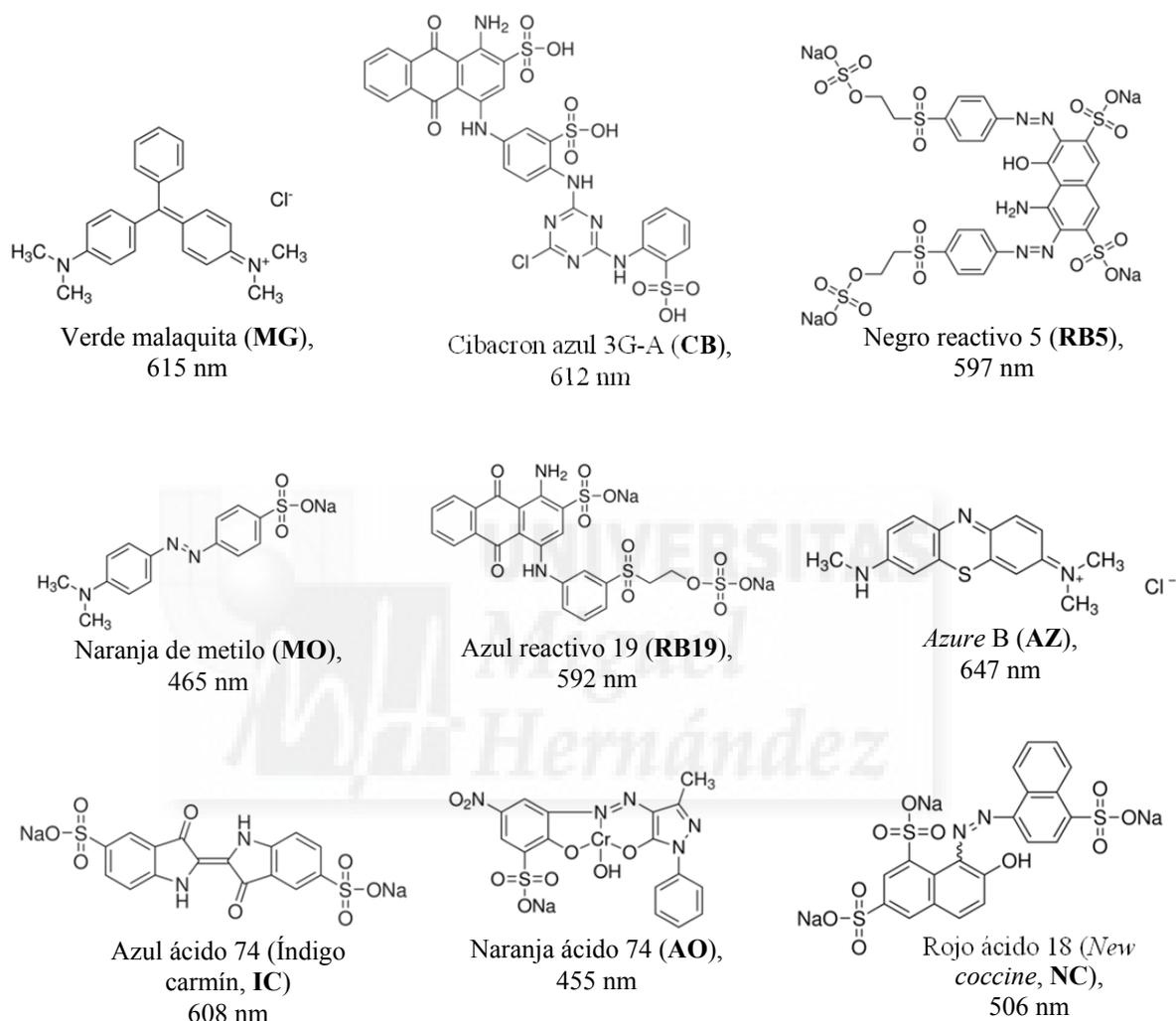
A la fracción soluble de *E. coli* BL21 (pDB2) (carril 3) que se encontraba en tampón fosfato 20 mM, pH 7,0 se le añadió sulfato de amonio hasta una concentración final de 0,75 M (carril 4). Mediante este paso se logró precipitar la mayoría de proteínas contaminantes que acompañan a BioF-CueO en el extracto crudo. La fracción soluble así obtenida se añadió lentamente a la columna de butil-sefarosa y después de un lavado exhaustivo con tampón fosfato de sodio 20 mM, 0,5 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , pH 7,0, la proteína de fusión BioF-CueO se eluyó con el mismo tampón pero con una concentración de 0,3 M de sulfato de amonio. Las fracciones puras de la proteína mostraron una actividad específica frente al sustrato DMF de  $485 \pm 32$  U/mg de proteína ensayada. La Figura 30 muestra que la proteína de fusión BioF-CueO (carril 4) se inmoviliza de manera estable al bioplástico PHB, ya que tras un lavado exhaustivo con tampón fosfato de sodio 20 mM, 1 M NaCl, pH 7,0, la proteína permanece activa y retenida en el bioplástico (carril 5).



**Figura 30.** Análisis mediante SDS-PAGE de la purificación de BioF-CueO y posterior inmovilización en 5 mg de PHB.

1. Marcador de peso molecular
2. Sonicado *E. coli* BL21 (pDB2)
3. Fracción soluble *E. coli* BL21 (pDB2)
4. Fracción pura BioF-CueO (20 µg)
5. Fracción de BioF-CueO (20 µg) inmovilizada en el bioplástico.

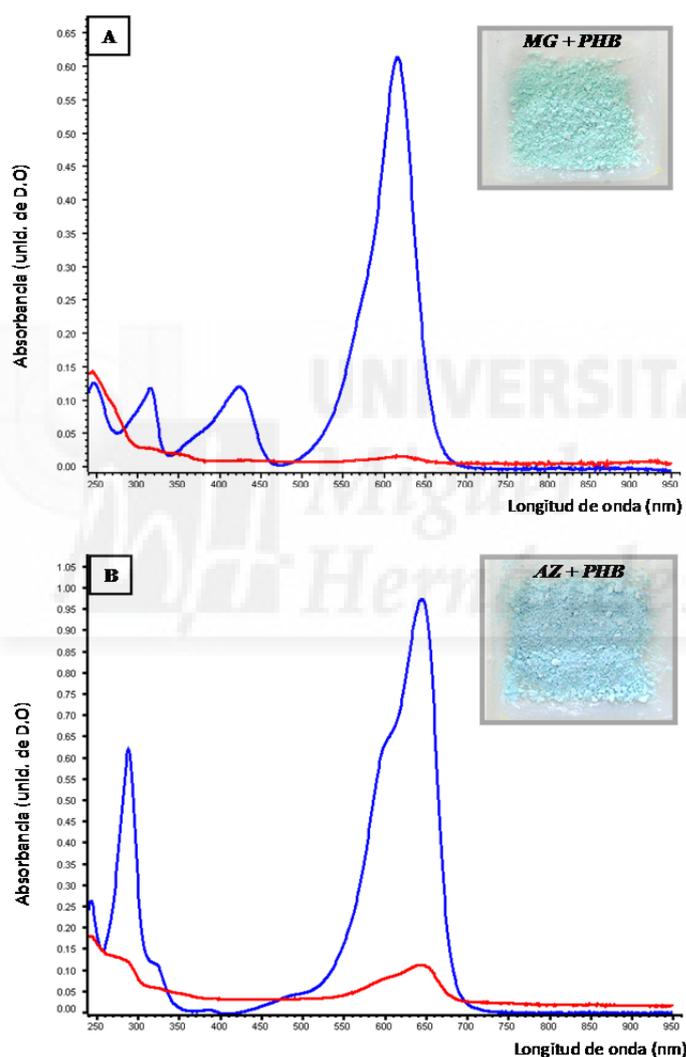
Una vez que se comprobó que la proteína de fusión se unía de manera estable al PHB se iniciaron estudios de decoloración, para lo cual se emplearon disoluciones acuosas de varios colorantes sintéticos (Sigma-Aldrich) (Figura 31).



**Figura 31.** Nombre, estructura y máximos de absorción de los colorantes sintéticos utilizados en los ensayos de decoloración con BioF-CueO.

La proteína de fusión se inmovilizó en el bioplástico (20  $\mu\text{g}$  de enzima /mg de PHB), y se iniciaron ensayos de decoloración en agitación orbital (150 rpm) a 25  $^{\circ}\text{C}$ . Por cada gramo de PHB empleado en el estudio se utilizaron 20 mL de colorante preparado a la concentración que se especifica en Materiales y Métodos. Como controles del experimento se incubaron bajo las mismas condiciones variantes que contenían el colorante, el bioplástico más el colorante y la proteína de fusión libre más el colorante.

En primer lugar, se detectó que varios colorantes se adsorbían al PHB. Los casos más significativos fueron los de los colorantes verde malaquita y *Azure B*, donde más del 90 % del compuesto se encontraba adsorbido en el bioplástico después de 4 h de incubación a 25 °C (Figura 32), mientras que en el caso del naranja ácido, la retención alcanzó más del 70 % en las mismas condiciones (datos no mostrados). La adsorción del verde malaquita al PHB ya había sido previamente descrita en la literatura (Sridewi y cols., 2011), mientras que no había ninguna descripción previa de tal efecto sobre el *Azure B* y el naranja ácido.



**Figura 32.** Análisis de la adsorción de colorantes sintéticos en el bioplástico PHB mediante espectrofotometría UV-Visible (950-250 nm). A) Verde malaquita (MG), B) *Azure B* (AZ). En línea azul se muestra el control de la solución de colorante y en línea roja la misma solución después de haberse incubado con el PHB en agitación (150 rpm) durante 4 h a 25 °C.

La Tabla 6 recoge las máximas decoloraciones obtenidas a 25 °C para los colorantes que presentaron una adsorción nula o parcial al bioplástico control, calculada mediante espectroscopía

al máximo de absorción descrito para cada colorante. Cabe señalar que la enzima, tanto libre como la inmovilizada al PHB, no fue capaz de degradar la estructura química del colorante MO. Es importante destacar que los controles de los colorantes (sin enzima) no sufrieron degradación alguna durante el desarrollo de estos estudios. A continuación procederemos a ampliar los detalles sobre cada uno de los colorantes ensayados.

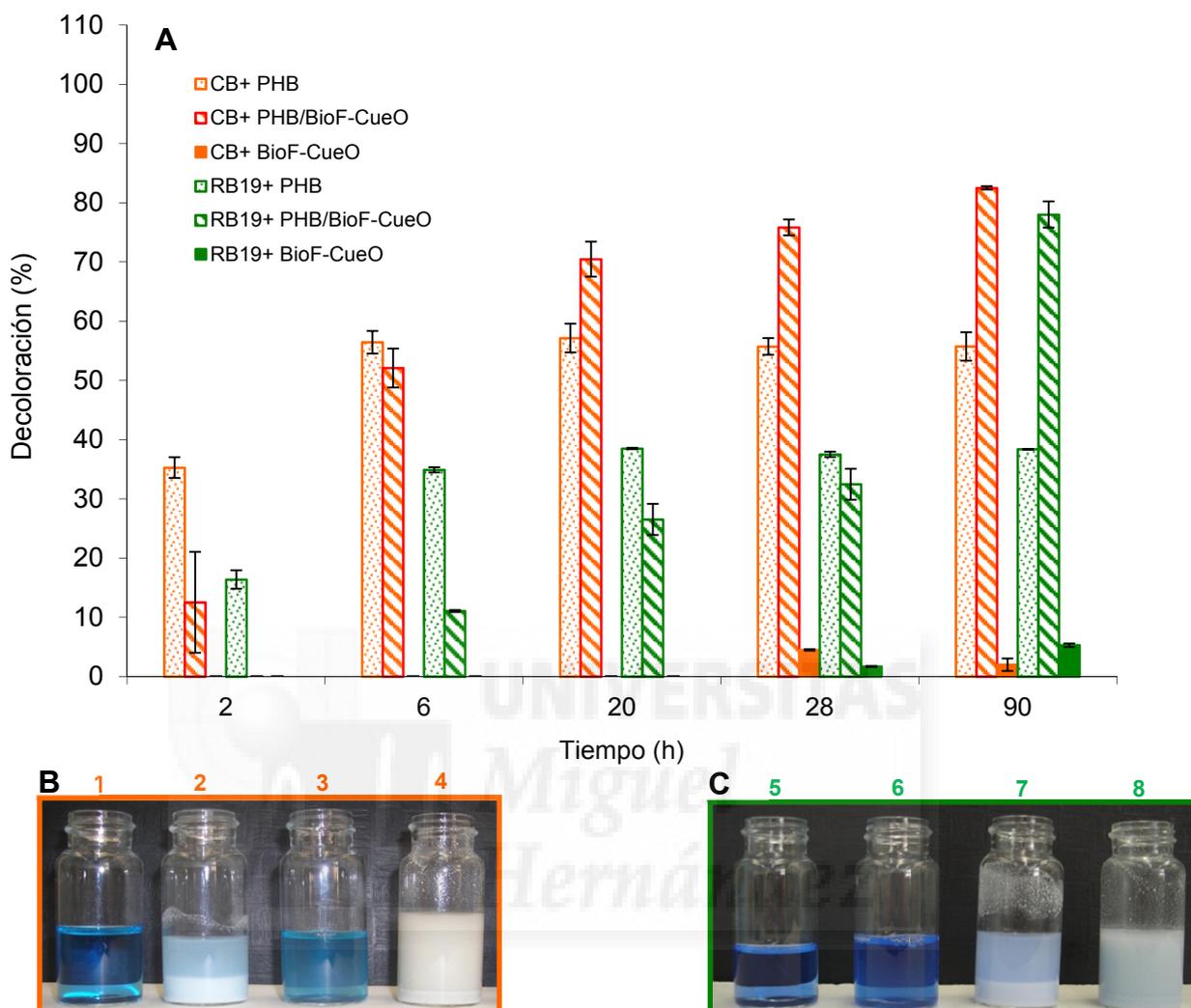
Tabla 6. Máximos porcentajes de decoloración obtenidos a 25 °C para los colorantes que no se adsorbieron y los que se adsorbieron parcialmente al PHB. Se indica para cada colorante la longitud de onda a la que se hizo la medición.

Colorante	Longitud de onda (nm)	Decoloración (enzima inmovilizada) (%)	Tiempo ( h )	Colorante Adsorbido al PHB Sí/No, (%)
Índigo carmín (IC)	608	> 98	20	No
<i>New coccine</i> (NC)	506	> 40	144	No
Negro reactivo 5 (RB5)	597	> 87	24	No
Cibacron azul (CB)	612	> 82	90	Sí, (55)
Azul reactivo 19 (RB19)	592	> 77	90	Sí, (40)
Naranja de metilo (MO)	465	0	144	No

En la Figura 33 se muestra el efecto sobre la degradación del CB y del RB19 en el tiempo. La adsorción inespecífica de ambos colorantes al PHB parece llegar a su máximo después de 6 h de incubación, mientras que en el caso del bioplástico que contiene inmovilizada la CueO la decoloración continua por acción de la enzima, lo que indica que la misma continua activa tras este período de incubación.

En el caso del CB alrededor de un 55 % del colorante se quedó adsorbido al bioplástico inespecíficamente en ausencia de enzima. A pesar de esto, la enzima inmovilizada logra degradar parcialmente la estructura del colorante hasta alcanzar porcentajes de decoloración superiores al 82 % tras 90 horas de incubación a 25 °C. Esto contrasta con las decoloraciones obtenidas para la enzima libre donde no se superó el 5 % de eliminación del colorante, y apunta a un efecto sinérgico del soporte plástico y la enzima.

Resultados similares se detectaron para el colorante RB19, donde parte del colorante se retuvo en el bioplástico (alrededor de un 40 %) y la variante con la enzima inmovilizada superó el 77 % de decoloración (Figura 33). La variante libre de la enzima produjo únicamente decoloraciones alrededor del 5 % después de 90 horas de incubación a 25 °C.

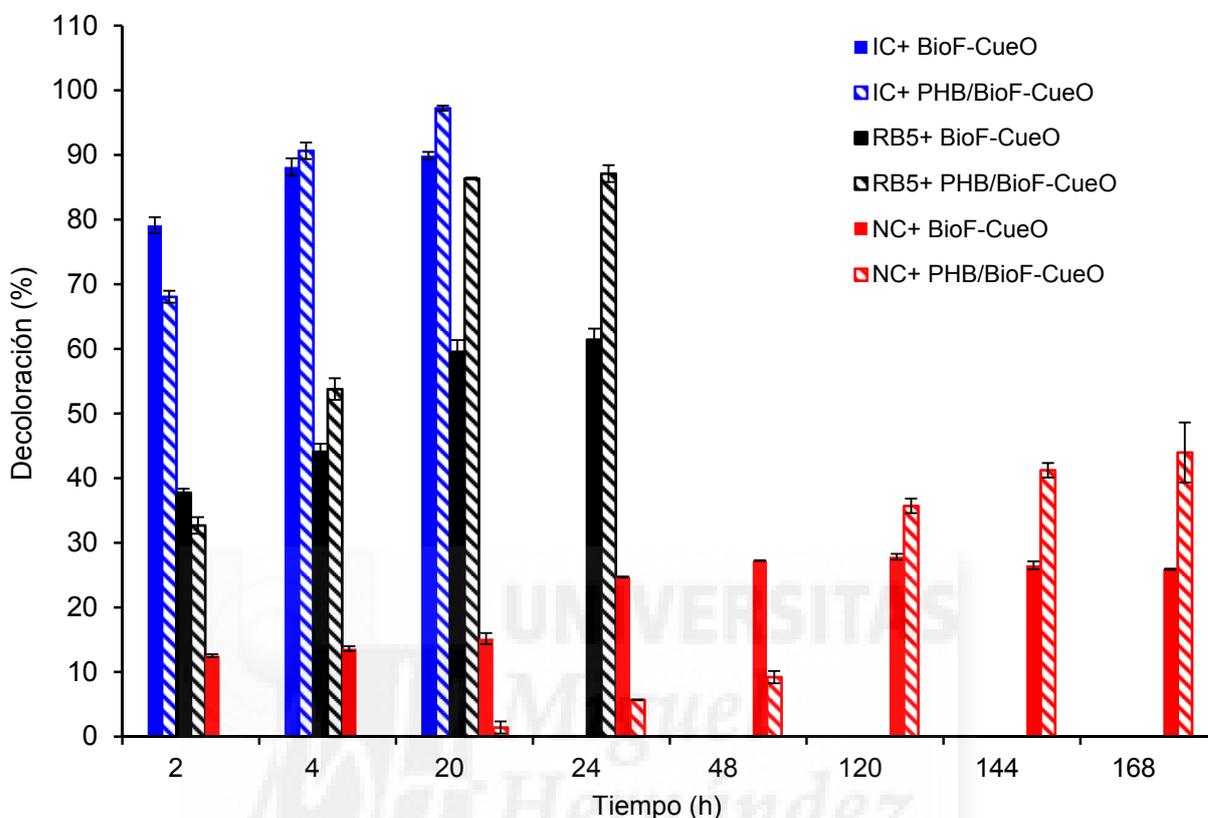


**Figura 33.** Análisis de la decoloración de diluciones de los colorantes sintéticos (antroquinona-derivados) tras 90 h de incubación a 25 °C y en agitación (150 rpm): Cibacron azul (CB) en segmentos color naranja, y Azul reactivo 19 (RB19) en segmentos color verde. La gráfica en A muestra los porcentajes de decoloración obtenidos con respecto a las mediciones iniciales para cada variante. En B y C se muestran fotografías de la decoloración después de 90 h de incubación a 25 °C.

- |                       |                         |
|-----------------------|-------------------------|
| 1. CB                 | 5. RB19                 |
| 2. CB + PHB           | 6. RB19 + BioF-CueO     |
| 3. CB + BioF-CueO     | 7. RB19 + PHB           |
| 4. CB + PHB/BioF-CueO | 8. RB19 + PHB/BioF-CueO |

Por su parte, los colorantes IC, RB5 y NC no se adsorbieron apreciablemente al PHB, y mostraron una mayor susceptibilidad a la degradación por la enzima libre (Figura 34). En la Figura 35 se muestran los espectros de las soluciones de colorante antes y después del tratamiento enzimático, donde se observa en general una disminución en la intensidad en la región de la longitud de onda del máximo de absorción. Es interesante observar que, en los tres casos,

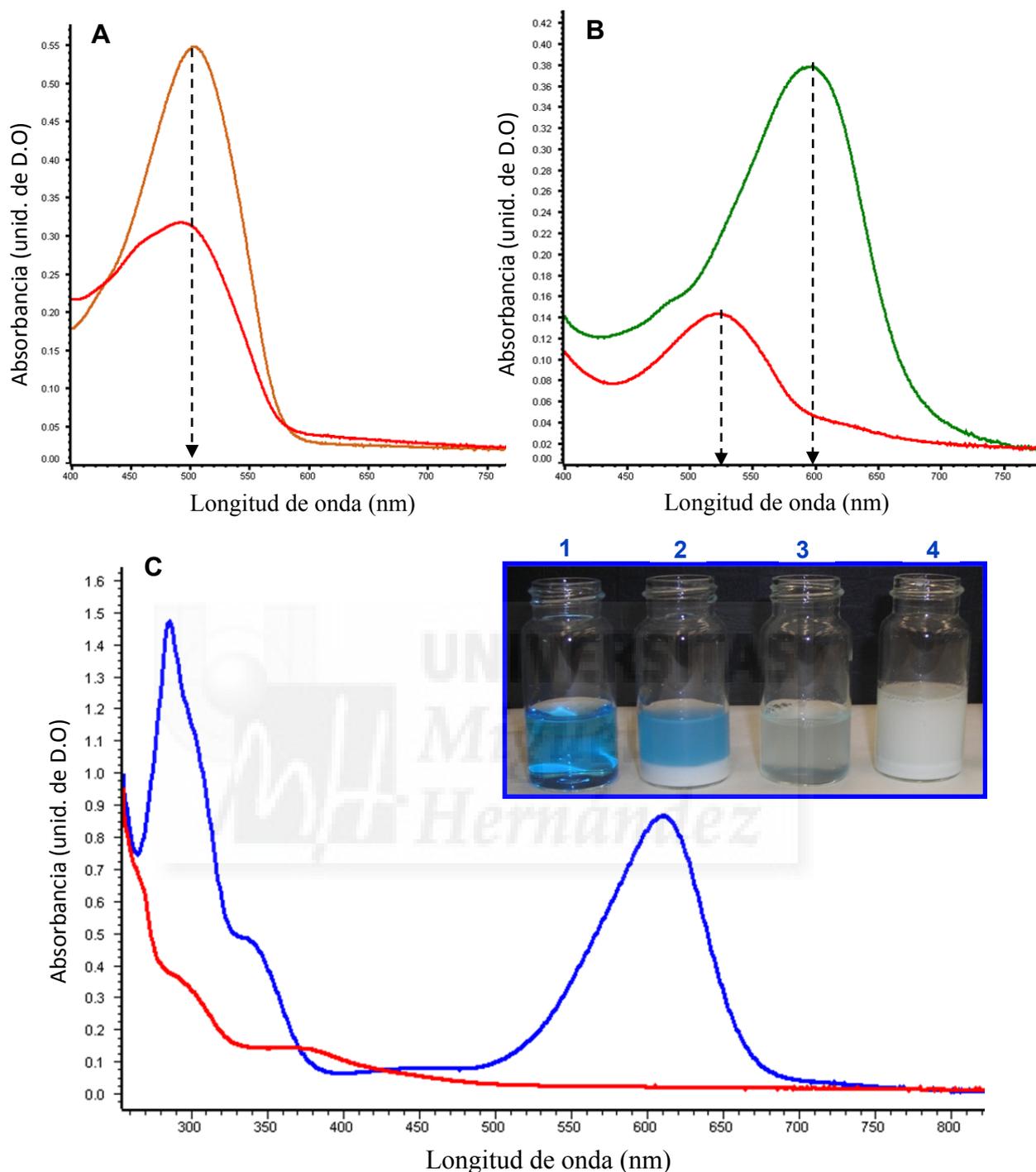
inicialmente el efecto decolorante de la enzima libre es significativamente mayor que el de la enzima inmovilizada, si bien ésta última actúa a más largo plazo y con mayor rendimiento.



**Figura 34.** Análisis de la decoloración de diluciones de los colorantes sintéticos (azo-derivados): Índigo carmín (IC) en azul, Negro reactivo 5 (RB5) en negro y *New coccine* (NC) en rojo. La gráfica muestra los porcentajes de decoloración obtenidos con respecto a las mediciones iniciales para cada variante (25 °C, 150 rpm).

El análisis del espectro de absorción obtenido para el NC revela que la enzima es capaz de degradar parte de la cantidad de colorante ensayado en este estudio (> 40 %) (Figura 35A). En el caso del RB5 se obtuvo una decoloración que superó el 87 %, observándose además un cambio en el espectro del visible tras el tratamiento con la enzima, con un máximo de absorción desplazado a 525 nm, debido posiblemente a una degradación parcial de la estructura del colorante (Figura 35B).

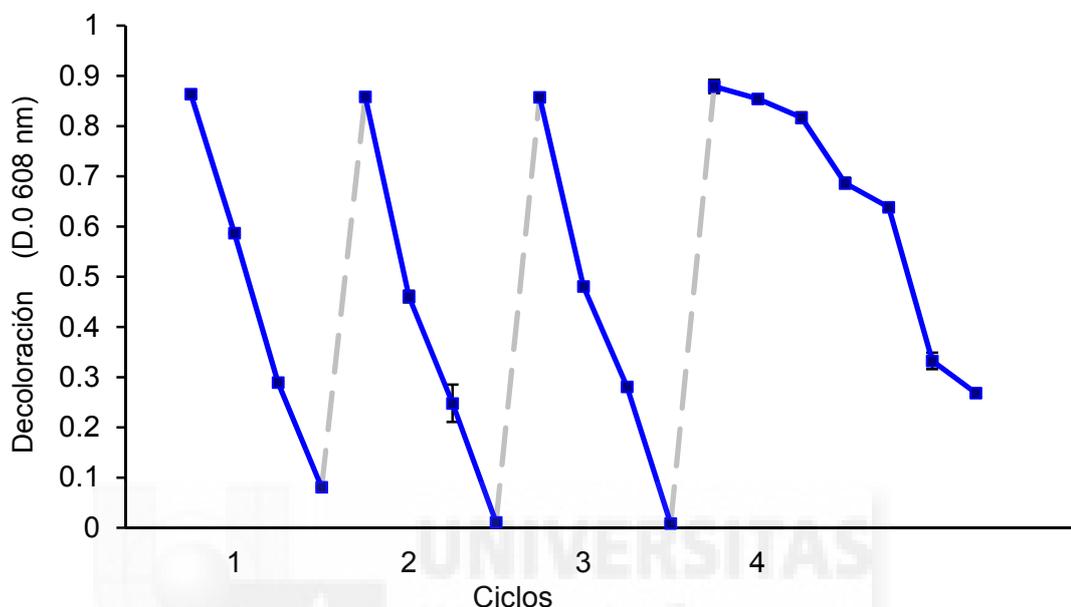
Los mejores resultados en cuanto a porcentaje y velocidad de decoloración se obtuvieron para el colorante IC. Tanto la enzima libre como inmovilizada fueron capaces de eliminar más del 90 % del color durante sólo 20 horas de incubación a 25 °C (Figuras 34 y 35). Como se puede apreciar en fotografía de la Figura 35C, la mayoría del color inicial se eliminó por efecto tanto de la enzima libre como por la variante inmovilizada, aunque de nuevo con mayor rendimiento en este último caso.



**Figura 35.** Análisis de la decoloración en el tiempo (25 °C) de diluciones de colorantes sintéticos por acción de la enzima CueO inmovilizada a través del BioF en el bioplástico PHB.

- A) Espectro de absorción en el visible (800-400 nm), a tiempo inicial (marrón) y final, 168 h (rojo) para el colorante *New coccine* (NC).
- B) Espectro de absorción en el visible (800-400 nm), a tiempo inicial (verde) y final, 24 h (rojo) para el colorante Negro reactivo 5 (RB5).
- C) Espectro de absorción en el UV-visible (800-250 nm), a tiempo inicial (azul) y final, 20 h (rojo) para el colorante Índigo carmín (IC). La Fotografía muestra la decoloración obtenida para: **1**, control IC; **2**, IC+ PHB; **3**, IC+ BioF-CueO; **4**, IC+ PHB/BioF-CueO.

Por último, el colorante IC nos sirvió para comprobar el grado de reutilización del biorreactor. La Figura 36 muestra la decoloración durante 4 ciclos continuos de incubación del IC con la enzima inmovilizada en el PHB.



**Figura 36.** Análisis de la reutilización continua de la enzima BioF-CueO inmovilizada en el bioplástico PHB para la decoloración de soluciones que contienen el colorante sintético IC. Los ciclos 1-3 tuvieron una duración de 20 h y el cuarto ciclo de 116 h.

Al finalizar cada ciclo, el plástico que contenía la enzima inmovilizada fue lavado y vuelto a incubar con el colorante. Durante los tres primeros ciclos se logró eliminar casi el 100 % del colorante en 20 h. En el cuarto ciclo la enzima mostró una menor actividad, y el proceso de decoloración fue mucho más lento, llegándose a alcanzar porcentajes de decoloración cercanos al 70 % tras 116 h de incubación. Este resultado añade una importante ventaja en cuanto a la utilización de la enzima inmovilizada con respecto a la libre para este tipo de procesos.

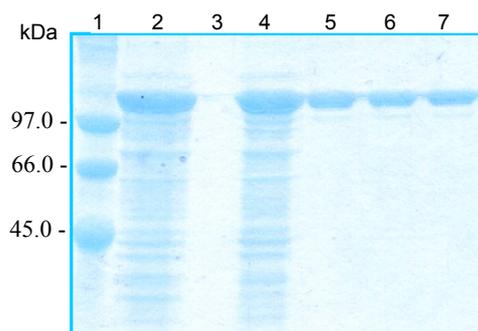
## 2. LAS APLICACIONES DEL MÓDULO DE UNIÓN A COLINA

### 2.1 Desarrollo de electrodos enzimáticos

#### 2.1.1 Prueba de concepto: inmovilización de CLyt-βgal sobre electrodos de grafito

La afinidad del módulo C-terminal de la autolisina LytA de neumococo (C-LytA) por colina y sus análogos estructurales ha posibilitado la construcción de electrodos enzimáticos de oro funcionalizados con análogos de colina que actúan como ligandos de anclaje de una fusión C-LytA-β-galactosidasa (Madoz y cols., 1997). Con objeto de ampliar el uso de este módulo al desarrollo de biosensores enzimáticos, y en colaboración con el laboratorio de los Profs. Juan M. Feliu y Víctor Climent (Universidad de Alicante), decidimos estudiar la inmovilización de proteínas de fusión con C-LytA sobre soportes de grafito funcionalizados con análogos de colina. El grafito, además de resultar más económico y disponible que el oro (lo que facilita su utilización en procesos a mayor escala), posee aceptables propiedades electroquímicas por lo que es considerado como un material muy atractivo para el desarrollo de electrodos enzimáticos y biosensores, aprovechando además que la tecnología de modificación covalente de este material con sales de diazonio se ha venido aplicando con éxito (Dos Santos y cols., 2010; Moreno-Guzmán y cols., 2012). Para la puesta a punto del sistema se eligió como proteína modelo inicial la fusión CLyt-βgal (donde la enzima β-galactosidasa se encuentra fusionada a C-LytA en su extremo C-terminal; Sánchez-Puelles y cols., 1992), habida cuenta que el compuesto *p*-aminofenil-β-D-galactopiranosido (PAPG) es un sustrato de la misma que genera un producto electroactivo (*p*-aminofenol, PAP), lo que posibilitaba la evaluación de la inmovilización mediante la técnica de voltametría cíclica, como se había descrito previamente (Madoz y cols., 1997).

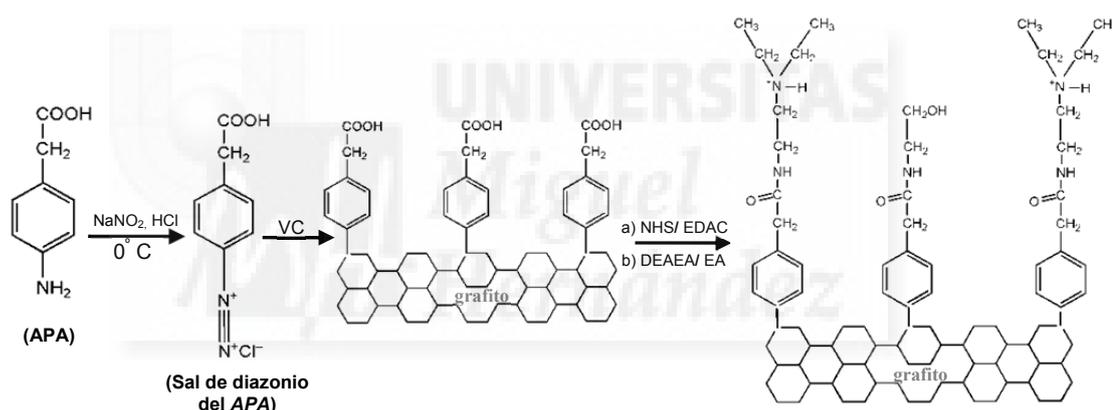
La proteína CLyt-βgal se purificó por cromatografía de afinidad en columnas de DEAE-celulosa y se analizó su expresión y grado de pureza por electroforesis en geles de poliacrilamida (10 %, p/v) en condiciones desnaturalizantes, tal y como se muestra en la Figura 37.



**Figura 37.** Análisis de la expresión y purificación de la proteína CLyt-βgal mediante SDS-PAGE (10%).  
1, marcador de peso molecular  
2, sonication de *E.coli* BL21 (pEG40)  
3, vacío  
4, fracción soluble obtenida por centrifugación del sonication  
5-7, fracciones purificadas de CLyt-βgal

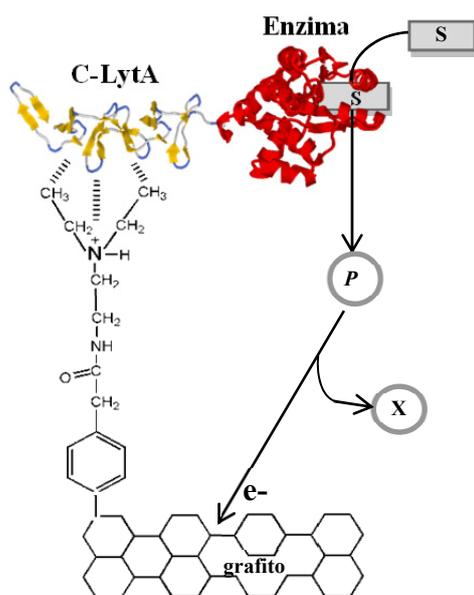
Los electrodos de grafito funcionalizados con análogos de colina se prepararon tal y como se describe en el apartado de Materiales y Métodos, y según el esquema que se muestra en la Figura 38. La sal de diazonio del ácido 4-aminofenil acético (APA) se obtuvo mediante la incubación del ácido a 0 °C durante 5 min en una solución que contenía ácido clorhídrico y nitrito sódico. Posteriormente, la adsorción reductiva de la sal de diazonio así formada sobre el electrodo de grafito se llevó a cabo mediante voltametría cíclica.

Los grupos carboxílicos expuestos en la superficie del electrodo modificado se activaron con *N*-hidroxisuccinimida (NHS), y se hicieron reaccionar con la amina terciaria *N,N*-dietil-etilendiamina (DEAEA), empleada para servir como soporte de unión a la etiqueta C-LytA, así como con etanolamina (EA) (Figura 38), empleada como espaciador de las moléculas de DEAEA, con objeto de eliminar posibles impedimentos estéricos entre las proteínas unidas a las moléculas de DEAEA.



**Figura 38.** Representación esquemática de los pasos secuenciales y las reacciones químicas relacionadas con el desarrollo y obtención de electrodos de grafito funcionalizados con análogos de colina. VC: voltametría cíclica, APA: ácido 4-aminofenil acético, EDAC: 1-etil-3-[3-(dimetilamino) propil]carbodiimida, NHS: *N*-hidroxisuccinimida, DEAEA: *N,N*-dietil-etilendiamina, EA: etanolamina.

La Figura 39 muestra de manera esquemática el sistema de inmovilización propuesto para la unión específica de una enzima al electrodo través de C-LytA. Como ejemplo, la  $\beta$ -galactosidasa unida al electrodo hidroliza el sustrato PAPG (S) rindiendo un producto electroactivo (*p*-aminofenol, P), el cual al oxidarse genera *p*-iminoquinona (X) y electrones que son transferidos al electrodo produciendo un incremento en la intensidad de la corriente que puede ser registrado por técnicas electroquímicas.



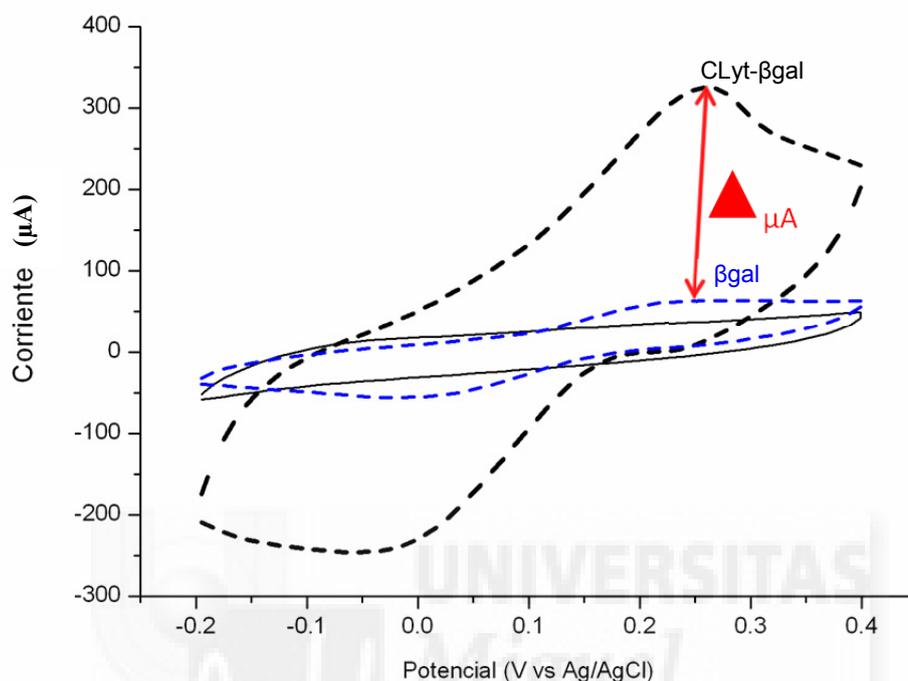
**Figura 39.** Representación esquemática de la actividad catalítica de una enzima inmovilizada en la superficie de un electrodo funcionalizado a través de la etiqueta de afinidad C-LytA (no está a escala y los detalles moleculares no son exactos)

El electrodo funcionalizado se incubó con una solución  $0,1 \text{ g L}^{-1}$  de CLyt- $\beta$ gal, y se lavó con  $100 \text{ mM}$  de NaCl para eliminar restos de proteína no unida específicamente. La correcta funcionalización del electrodo se comprobó espectrofotométricamente por la formación del producto coloreado *o*-nitrofenol (ONP), producto de la hidrólisis del sustrato sintético de la  $\beta$ -galactosidasa *o*-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido (ONPG). Como control de unión no específica del experimento se utilizó  $\beta$ -galactosidasa sin fusionar a C-LytA a la misma concentración. Se determinó en primer lugar que la adsorción inespecífica de la  $\beta$ -galactosidasa se podía minimizar por lavados continuos del electrodo con tampón fosfato sódico  $20 \text{ mM}$ ,  $100 \text{ mM}$  de NaCl, pH  $7,0$ . Adicionalmente, se comprobó que una relación molar EA/DEAEA (8:1) es la óptima para la funcionalización del electrodo, logrando una mayor actividad de la enzima. Estos resultados fueron confirmados mediante voltametría cíclica como se verá a continuación.

Los electrodos se incubaron con soluciones de las proteínas CLyt- $\beta$ gal o  $\beta$ -galactosidasa, y, tras los correspondientes lavados, se introdujeron en dos celdas electroquímicas a las que se les adicionó PAPG. La Figura 40 muestra el análisis por VC de la actividad  $\beta$ -galactosidasa de las proteínas inmovilizadas sobre el electrodo funcionalizado.

En el caso de la proteína de fusión, CLyt- $\beta$ gal (línea discontinua negra), a medida que transcurre la reacción enzimática, el producto de la hidrólisis del PAPG (PAP) se acumula en la superficie del electrodo, observándose un incremento en la intensidad de la corriente de oxidación y reducción. Por su parte, en el caso del control con la proteína  $\beta$ -galactosidasa también se aprecia cierta señal por VC, si bien esta es en torno a 30 veces inferior a la que se obtiene en el caso de la quimera.

Estos resultados indican, en primer lugar, que la actividad de la enzima fusionada al electrodo a través de C-LytA puede ser evaluada mediante la técnica de VC, y en segundo lugar que esta construcción permite la unión selectiva y específica de enzimas sobre electrodos de grafito funcionalizados con análogos estructurales de la colina.

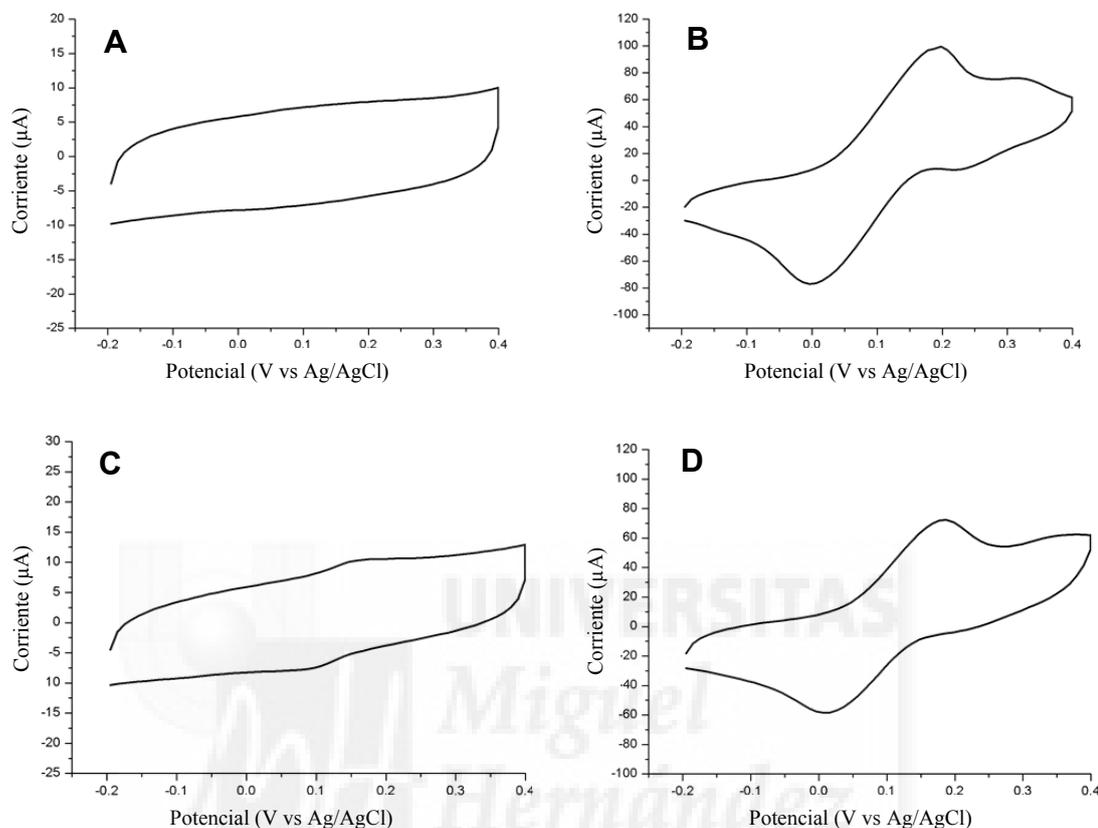


**Figura 40.** Actividad catalítica  $\beta$ -galactosidasa de la proteína libre y fusionada a C-LytA sobre electrodos de grafito modificados, estudiada a 25 °C. La actividad se evaluó mediante voltametría cíclica, siguiendo la formación de *p*-aminofenol entre los potenciales de 0,4 y -0,2 V y a una velocidad de 100 mVs<sup>-1</sup>. El electrolito contenía tampón fosfato sódico 20 mM, 4 mM de PAPG, pH 7,0

- control del electrolito
- - - control de unión inespecífica ( $\beta$ -galactosidasa libre)
- - - unión específica de CLyt- $\beta$ gal a los electrodos funcionalizados

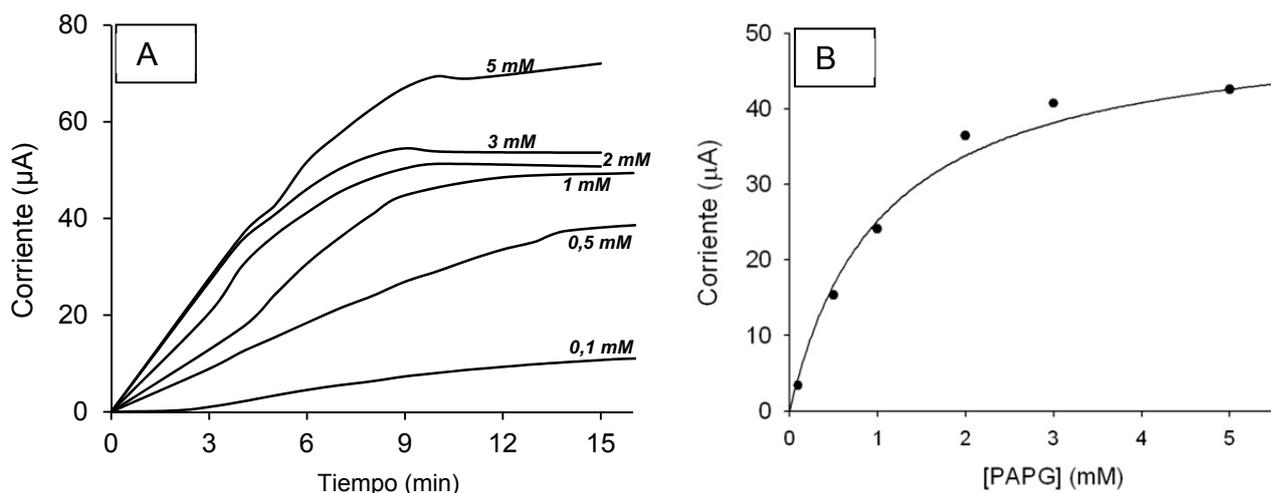
Para confirmar la especificidad de la inmovilización, y para evaluar la reversibilidad de esta interacción, el electrodo funcionalizado se incubó con CLyt- $\beta$ gal en soluciones conteniendo 1 M de colina o 1 M de NaCl. En la Figura 41A se observa que la hidrólisis del PAPG no se produce si la proteína se incubaba en presencia de colina, lo cual sugiere que las moléculas de colina saturan los sitios de unión presentes en la proteína, impidiendo de esta forma la unión de la misma a los análogos estructurales expuestos en la superficie del electrodo. Esta falta de unión no es debida a un mero incremento de la fuerza iónica, ya que la proteína se inmoviliza adecuadamente en presencia de 1 M NaCl (Figura 41B). Además, cuando una vez inmovilizada la enzima el electrodo se incubaba en una solución 1 M de colina, la capacidad de hidrolizar el PAPG se pierde (Figura 41C), lo cual indica que la colina de la solución eluye a la proteína del electrodo, abriendo la posibilidad de reutilizar el mismo. Para comprobar este hecho, el electrodo con la proteína así eluída se lavó para

eliminar restos de colina y se sumergió nuevamente en una solución conteniendo la proteína de fusión. En la Figura 41D se observa que la actividad  $\beta$ -galactosidasa se restaura, aproximadamente, en un 70 %, lo que demuestra la reversibilidad del sistema.



**Figure 41.** Análisis por voltametría cíclica de la actividad de CLyt- $\beta$ gal inmovilizada en electrodos de grafito funcionalizados con análogos de colina. El electrolito contiene tampón fosfato sódico 20 mM, 2,5 mM de PAPG, pH 7,0. Los electrodos funcionalizados se sumergieron en: (A) CLyt- $\beta$ gal + 1 M colina; (B) CLyt- $\beta$ gal + 1 M NaCl; (C) electrodo utilizado en (B) después de 10 min de incubación en 1 M de colina; (D) electrodo utilizado en (C), lavado con 1 M NaCl y reincubado en una solución de CLyt- $\beta$ gal + 1 M NaCl.

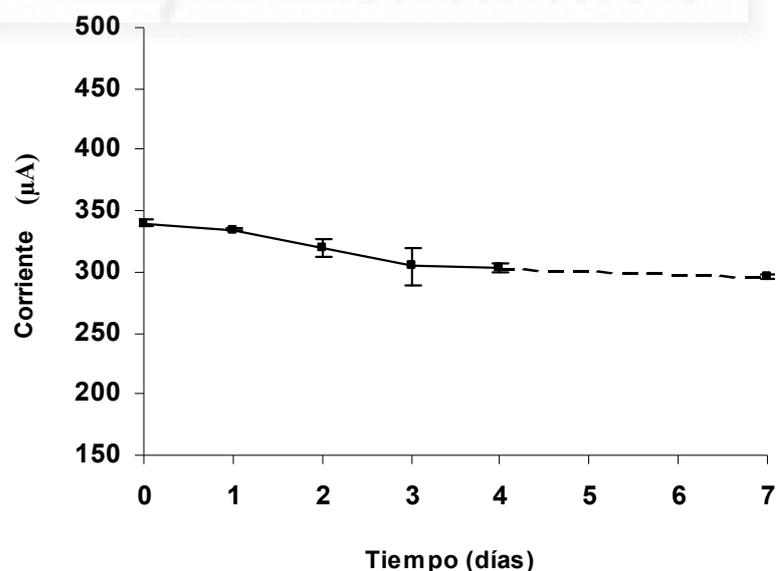
Con objeto de profundizar en la actividad enzimática de la proteína de fusión inmovilizada, y obtener datos cinéticos, se evaluó la respuesta amperométrica (+170 mV vs Ag/AgCl) del producto PAP obtenido por la hidrólisis enzimática a concentraciones crecientes de PAPG. La intensidad de la corriente se incrementa con el tiempo, rindiendo curvas sigmoideas típicas a cada concentración de sustrato (Figura 42A) en las que la pendiente, así como el valor máximo depende directamente de la concentración de PAPG utilizada en cada ensayo. Los datos obtenidos después de 5 min de incubación de la enzima inmovilizada para las diferentes concentraciones de PAPG se pueden ajustar a la ecuación de Michaelis-Menten, obteniéndose una  $K_m$  de  $1,0 \pm 0,3$  mM (Figura 42B).



**Figura 42.** A) Respuesta amperométrica (+170 mV vs Ag/AgCl) del *p*-aminofenol como resultado de la hidrólisis del PAPG por la CLyt-βgal inmovilizada en la superficie del electrodo de grafito funcionalizado. El electrolito contenía tampón fosfato sódico 20 mM, pH 7,0 y concentraciones crecientes de PAPG (0,1-5,0 mM).

B) Intensidad de la corriente obtenida después de 5 min de incubación a las diferentes concentraciones de sustrato evaluadas, y ajuste a la ecuación de Michaelis-Menten.

La estabilidad de los electrodos de grafito funcionalizados con análogos de colina almacenados en tampón fosfato a 4 °C, se evaluó determinando la formación de PAP por voltametría cíclica cada 24 h. Después de siete días, la actividad β-galactosidasa se conservó en un 87 %, demostrándose de esta forma la estabilidad de las modificaciones químicas realizadas sobre la superficie de los electrodos y la estabilidad de la proteína inmovilizada (Figura 43).



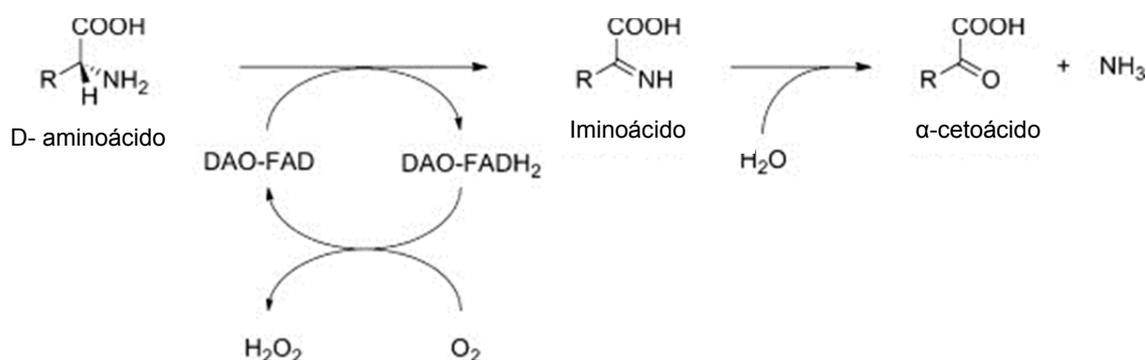
**Figura 43.** Respuesta amperométrica (+170 mV vs Ag/AgCl) del *p*-aminofenol como resultado de la actividad enzimática de CLyt-βgal inmovilizada en el electrodo cada 24 horas de permanencia a 4 °C. La actividad se evaluó mediante VC entre los potenciales de 0,4 y -0,2 V, a 100 mVs<sup>-1</sup> y a 25 °C. El electrolito contenía tampón fosfato sódico 20 mM, 4 mM de PAPG, pH 7,0. El valor de la intensidad de la corriente representa la media de tres mediciones para un mismo electrodo.

## 2.1.2 Transferencia directa de electrones: inmovilización de CLyt-DAO

### 2.1.2.1 Inmovilización sobre electrodos de grafito

La interacción específica de CLyt-βgal con el electrodo de grafito funcionalizado se detecta electroquímicamente por la difusión del producto de hidrólisis del sustrato PAPG a la superficie del electrodo. Sin embargo, las tendencias actuales en el desarrollo de electrodos enzimáticos están dirigidas a buscar la transferencia directa de electrones desde el centro activo de una proteína redox a la superficie del electrodo. Esto constituye la base de la conocida como tercera generación de biosensores.

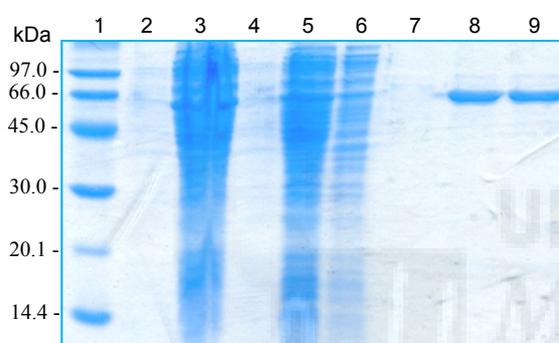
Como objetivo de esta parte del trabajo se contemplaba que la disposición espacial del análogo de colina en la superficie del electrodo de grafito permitiera la unión específica de la etiqueta de afinidad C-LytA, mientras que el centro activo de la proteína fusionada a la etiqueta de afinidad podría quedar orientado para poder establecer una comunicación directa con el electrodo, permitiendo así la medición local de las corrientes de oxidación-reducción generadas por la transferencia directa de electrones desde el centro activo a la superficie del electrodo y mejorando por lo tanto la eficiencia en la transmisión de la señal al no depender de la difusión de moléculas por la disolución. Al mismo tiempo, deseábamos corroborar los estudios de inmovilización de proteínas en electrodos a través de la proteína C-LytA utilizando una enzima de interés para la industria de los biosensores. Por ello, como enzima redox para estos estudios se empleó la flavoenzima D-aminoácido oxidasa (DAO) de *Rhodotorula gracilis* (EC 1.4.3.3) que cataliza la desaminación oxidativa de D-aminoácidos utilizando como coenzima el FAD (Figura 44).



**Figura 44.** Desaminación oxidativa de D-aminoácidos por la D-aminoácido oxidasa (DAO).

La utilización de esta reacción estereoespecífica podría conferirle selectividad a un biosensor para detectar y cuantificar trazas de D-aminoácidos en muestras de diferente origen. Un ejemplo de lo anterior lo constituye la utilización de estos biosensores en el seguimiento y control de procesos fermentativos (Inaba y cols., 2003) y en el control de la calidad y la detección temprana de contaminaciones microbiológicas en productos alimenticios, al ser los D-aminoácidos componentes principales de la pared celular de las bacterias (Rosini y cols., 2008).

El gen que codifica para la DAO se fusionó al que codifica para el módulo de unión a colina CLytA (Moldes, 2003), y la proteína híbrida resultante (CLyt-DAO) de la expresión del gen en *E. coli* (BL21) se purificó por cromatografía de afinidad en columnas de DEAE-celulosa. La Figura 45 muestra el análisis de la expresión y purificación de CLyt-DAO.



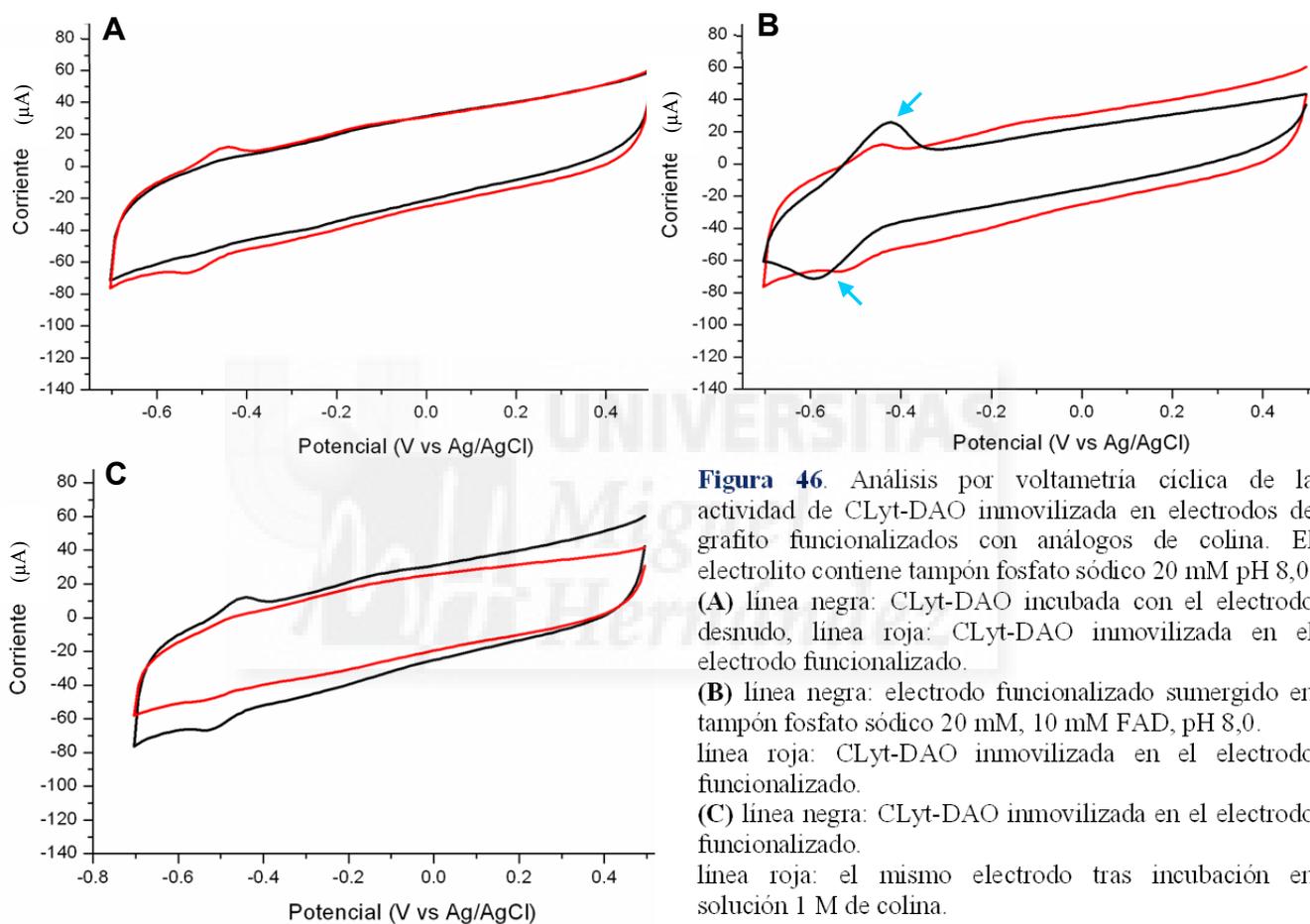
**Figura 45.** Análisis de la expresión y purificación de CLyt-DAO mediante SDS-PAGE.

- 1, marcador de peso molecular
- 2, vacío
- 3, sonicado *E. coli* BL21 (pCPC21) (+IPTG)
- 4, vacío
- 5, fracción soluble (+IPTG)
- 6, extracto soluble (+IPTG) no retenido en DEAE-celulosa
- 7, vacío
- 8-9, fracciones puras de CLyt-DAO

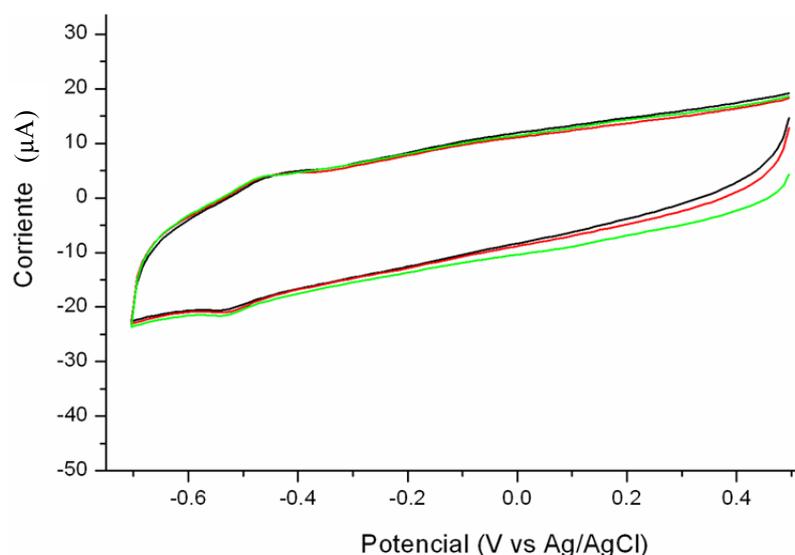
Los electrodos funcionalizados de grafito (Figura 38) se incubaron con una solución  $0,1 \text{ g L}^{-1}$  de proteína CLyt-DAO, se lavaron en presencia de sal para eliminar la proteína unida de manera inespecífica, y se sumergieron en soluciones que contenían D-fenilglicina  $5 \text{ mM}$  como sustrato. Como control negativo se empleó un electrodo de grafito desnudo (sin funcionalizar). Mediante espectrofotometría a  $252 \text{ nm}$  se detectó la formación de ácido benzoilfórmico debida a la desaminación de la D-fenilglicina por la actividad DAO (Figura 44), sólo en el caso de los grafitos que previamente habían sido modificados, aunque resultó especialmente baja (datos no mostrados). Este resultado sugiere que la proteína se une de manera específica al electrodo funcionalizado con el análogo de colina, lo cual se comprobó a continuación por voltametría cíclica.

En este sentido, el voltagrama obtenido con la proteína CLyt-DAO inmovilizada revela un pico de oxidación-reducción en el caso del electrodo funcionalizado, lo que no se observa en el caso del electrodo desnudo (Figura 46A). Además, el producto de oxidación-reducción obtenido tiene un potencial aproximado de  $-0,5 \text{ V}$  (vs Ag/AgCl), muy cercano al potencial redox determinado para una solución de coenzima FAD libre ( $10 \text{ mM}$ ) bajo las mismas condiciones experimentales (Figura

46B, flechas azules). Estos resultados sugieren que el centro activo de la enzima queda bien orientado para permitir la transferencia directa de electrones entre de la enzima DAO y la superficie del electrodo. Por otra parte, la incubación del electrodo que contiene CLyt-DAO inmovilizada en 1 M de colina provoca la pérdida de actividad probablemente por elución de la enzima, lo que demuestra la especificidad y reversibilidad de la interacción entre la proteína híbrida y los análogos de colina en la superficie del electrodo (Figura 46C).



La Figura 47 muestra el voltagrama obtenido tras la adición a la célula electroquímica del sustrato de la DAO D-fenilglicina. A pesar de los resultados anteriores que evidenciaban que la enzima se encuentra bien orientada para permitir la transferencia directa de electrones, la actividad de la misma en presencia de 5 mM de D-fenilglicina no aumenta en el tiempo. Esto pudiera deberse a problemas relacionados con la accesibilidad del sustrato al centro activo de la enzima.



**Figura 47.** Análisis por voltametría cíclica de la actividad de CLyt-DAO inmovilizada en electrodos de grafito funcionalizados con análogos de colina. El electrolito contiene tampón fosfato 20 mM pH 8,0  
 línea verde: CLyt-DAO inmovilizada en el electrodo funcionalizado, en ausencia de sustrato  
 línea negra: el mismo electrodo después de 10 min en presencia de 5 mM de D-fenilglicina.  
 línea roja: el mismo electrodo después de 30 min en presencia de 5 mM de D-fenilglicina.

### 2.1.2.2 Inmovilización sobre nanotubos de carbono de pared múltiple

Con objeto de ampliar y dar mayor versatilidad al sistema de inmovilización de proteínas en electrodos a través de la etiqueta de afinidad C-LytA y en colaboración con el laboratorio de la Dra. María Luisa Ferrer (Instituto de Materiales, CSIC, Madrid), se utilizaron andamios de nanotubos de carbono multi-pared (MWCNTs) funcionalizados con DEAE. Estos materiales ofrecen importantes ventajas con respecto a las barras de grafito, ya que su porosidad permite disponer de una mayor superficie específica para la inmovilización de proteína, lo cual pudiera favorecer el aumento de las señales de oxidación-reducción que habíamos obtenido para la CLyt-DAO inmovilizada en las barras de grafito funcionalizadas. Además, estos materiales poseen excelentes propiedades mecánicas, eléctricas y electroquímicas, lo que ha potenciado su utilización como material para la construcción de biosensores y electrodos enzimáticos (revisado por Vashist y cols., 2011).

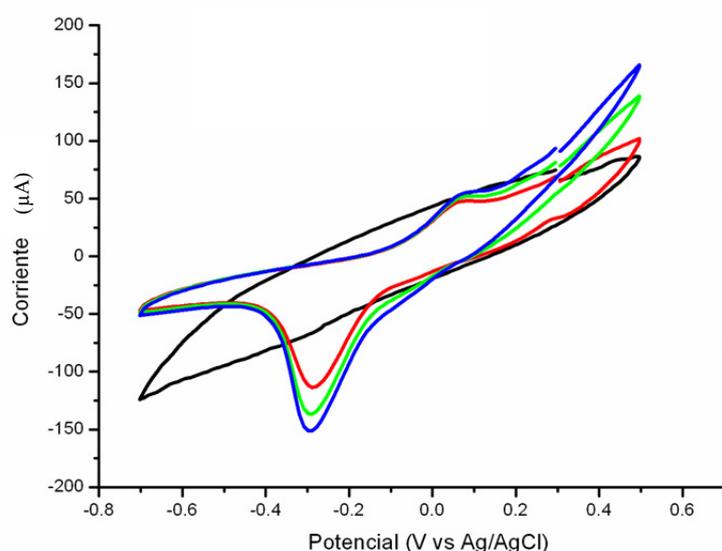
Para el comienzo de estos estudios se eligió como control una fusión de C-LytA con la proteína fluorescente verde (GFP), ya que permite comprobar visualmente la unión de manera rápida y sencilla. La Figura 48 muestra que una cantidad de CLyt-GFP se une a los andamios de manera específica y estable, ya que la proteína permanece unida después de lavar los andamios con 1 M de NaCl. Además, la unión es reversible pues la elución de la proteína es posible con la adición de colina al 2 % (p/v).



**Figura 48.** Análisis de la unión de CLyt-GFP a los andamios de MWCNTs funcionalizados con DEAE. A: incubación de CLyt-GFP con el andamio (a tiempo cero); B: proteína no retenida en el andamio (después de 10 min); C: andamio de (A) en presencia de 1 M NaCl (10 min); D: andamio de (C) en colina 2 % (p/v) (10 min).

Una vez comprobada la capacidad de los andamios funcionalizados con DEAE para unir de manera específica y reversible proteínas que contienen la etiqueta de afinidad C-LytA, se estudió por voltametría cíclica la unión de la proteína CLyt-DAO a dichas estructuras funcionalizadas. En la Figura 49 se muestra que, como resultado de la interacción de CLyt-DAO con el electrodo, se obtiene una señal de oxidación-reducción con un potencial alrededor de  $-0,1$  V vs Ag/AgCl, algo desplazado en comparación con el potencial redox que previamente había sido obtenido para el caso de la misma proteína inmovilizada sobre los electrodos de grafito ( $-0,5$  V).

Por otra parte, y al igual que en los electrodos de grafito funcionalizados, la señal de la corriente de oxidación-reducción no aumentó después de 10 min en presencia del sustrato D-alanina (Figura 49), lo que probablemente sea debido a que el centro activo no se encuentra accesible al sustrato, de igual manera que en los electrodos de grafito funcionalizados (Figura 47).



**Figura 49.** Análisis por voltametría cíclica de la actividad de CLyt-DAO inmovilizada en los andamios de MWCNTs funcionalizados con DEAE. El electrolito contenía tampón fosfato sódico 20 mM, pH 8,0.  
 -línea negra: control de electrolito  
 -línea azul: electrodo con CLyt-DAO inmovilizada (10 min),  
 -línea verde: el electrodo anterior después de 30 min,  
 -línea roja: el mismo electrodo en presencia de D-alanina 5 mM (10 min)

## 2.2 Desarrollo de nanobiorreactores enzimáticos

Los soportes de inmovilización de proteínas condicionan evidentemente la utilidad de una determinada enzima cuando ésta se encuentra inmovilizada. Algunas de las características fundamentales relacionadas con estos soportes son la posibilidad de dotar un área superficial y una densidad de grupos funcionales altas que faciliten la inmovilización de grandes cantidades de enzima en un reducido espacio, garantizando a su vez la adecuada difusión de sustratos y productos de la reacción enzimática.

Parte de los problemas relacionados con las limitaciones de los soportes sólidos en la inmovilización de proteínas pueden contrarrestarse empleando nanomateriales. En este sentido, el empleo de nanopartículas magnéticas está recibiendo un creciente interés en la comunidad científica. Sus características de uniformidad de tamaño, área superficial, biocompatibilidad y supramagnetismo son fácilmente controlables durante su síntesis, y les confieren un gran espectro de poderosas aplicaciones biotecnológicas entre las que destacan las relacionadas con la biomedicina, incluyendo el desarrollo de equipamiento y técnicas de diagnóstico (resonancia magnética de imagen), y como sistemas de transporte y localización de fármacos para el tratamiento de diversas enfermedades (Dobson, 2006; Schüth y cols., 2007; Akbarzadeh y cols., 2012; Kim y cols., 2012; Yoo y cols., 2012).

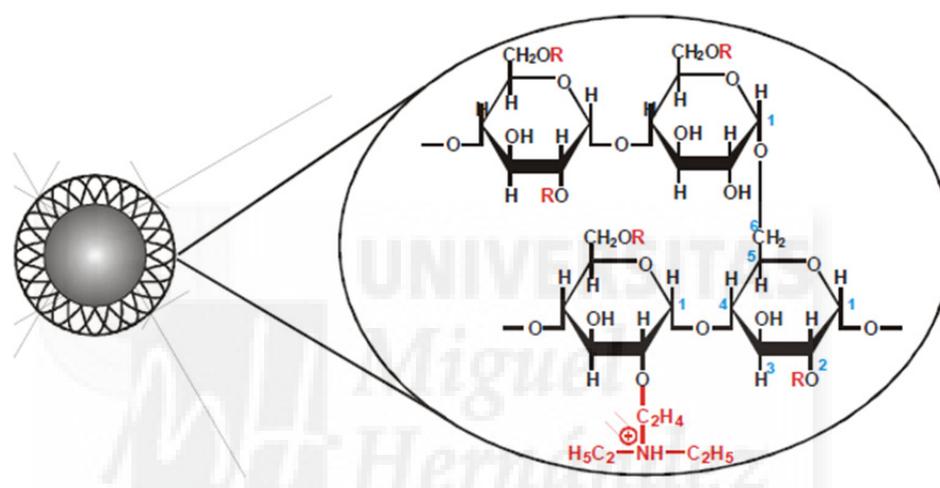
En este sentido, en nuestro laboratorio se había puesto a punto un sistema de purificación de proteínas en nanopartículas magnéticas comerciales funcionalizadas con DEAE a través de la etiqueta de afinidad C-LytA (Retamosa y cols., manuscrito en preparación), por lo que resultaba de interés estudiar las propiedades y el comportamiento de enzimas de interés biotecnológico inmovilizadas en dichas partículas, con objeto de evaluar su uso como biorreactores enzimáticos, y como sistemas de distribución de enzimas de interés biomédico dentro del cuerpo humano.

Para estos estudios se eligió la proteína de fusión CLyt-DAO como prueba de concepto. Se ha descrito previamente la inmovilización de la enzima DAO en partículas magnéticas empleando métodos covalentes (Hsieh y cols., 2009; Bava y cols., 2013) y no covalentes, esencialmente basados en reacciones de afinidad mediante el sistema de la cola de histidinas (Chien y Lee, 2008; Kuan y cols., 2008; Wang y cols., 2008a), y teníamos interés en comprobar si nuestro sistema pudiera ser más ventajoso en algún aspecto.

Como se ha comentado anteriormente, la proteína DAO posee importantes aplicaciones biotecnológicas (Pollegioni y Molla., 2011), pero además, posee un indudable interés biomédico

puesto que se ha probado que su actividad catalítica tiene un efecto citotóxico *in vitro* en varias líneas celulares tumorales de mamíferos (Rosini y cols., 2009; Bava y cols., 2013).

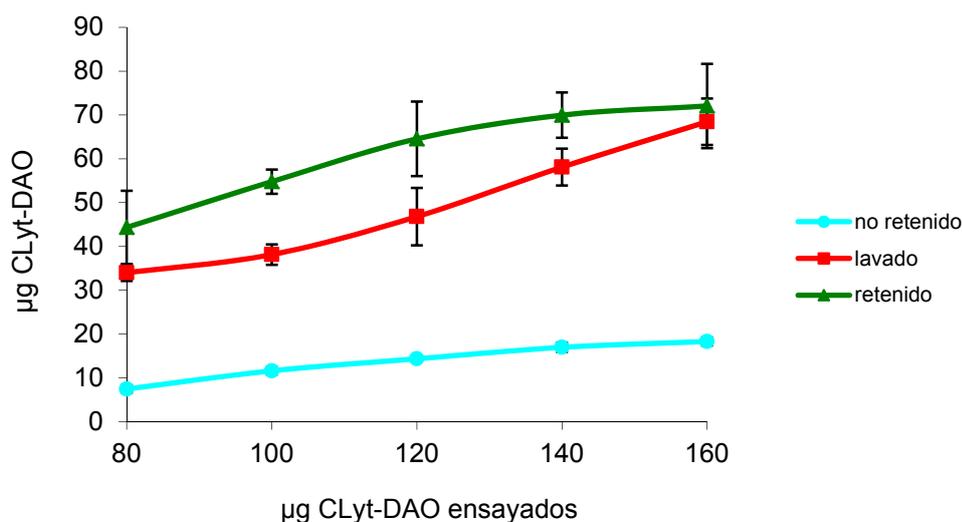
Nuestra hipótesis de partida contemplaba el uso de las nanopartículas magnéticas como transportadoras de la DAO *in vivo* junto con la aplicación de un campo magnético externo para dirigir y acumular el principio activo en la proximidad del tumor, aumentando así su eficacia y reduciendo la aparición de efectos secundarios (Mejías y cols., 2011). Las nanopartículas magnéticas empleadas están recubiertas de almidón funcionalizado con di-etilaminoetanol (DEAE) y son de 200 nm de tamaño medio (fluidMAG-DEAE, Chemicell) (Figura 50).



**Figura 50.** Nanopartícula magnética funcionalizada con DEAE (en rojo, no a escala). El núcleo de las partículas está compuesto de magnetita recubierto con almidón. Tomado de [www.chemicell.com](http://www.chemicell.com)

### 2.2.1 Estudio de la capacidad de carga de CLyt-DAO en nanopartículas magnéticas

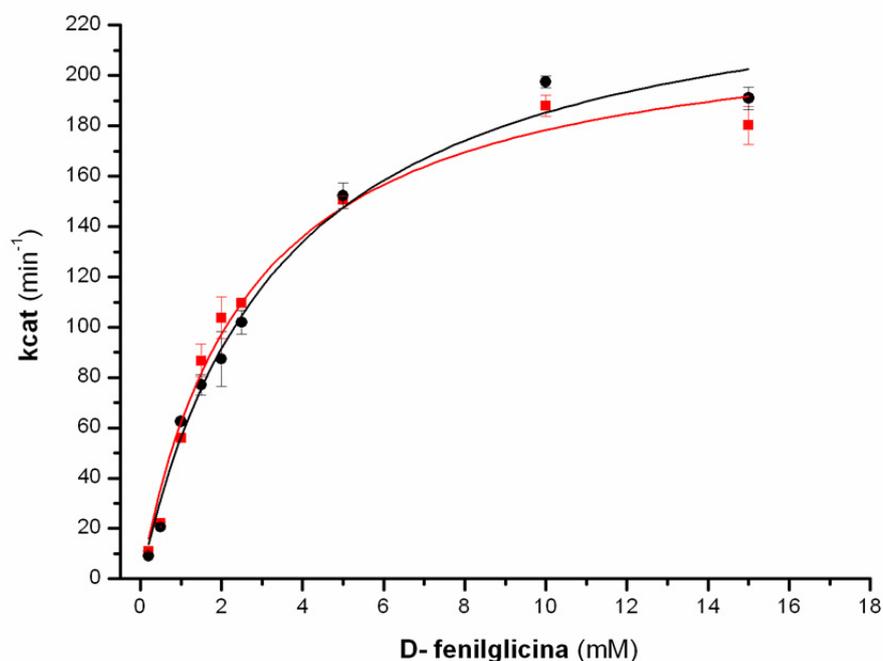
Como se desprende de la Figura 51, la concentración de proteína retenida (obtenida al cuantificar la diferencia entre la cantidad de proteína añadida y la proteína no retenida más la eluída durante los lavados), aumenta con cantidades crecientes de CLyt-DAO ensayadas, con un límite, que representa la saturación de la carga enzimática, y que resultó ser de  $70 \pm 5 \mu\text{g}$  de CLyt-DAO por miligramo de nanopartícula magnética ensayada (Figura 51).



**Figura 51.** Análisis de la capacidad de carga de CLyt-DAO en nanopartículas magnéticas funcionalizadas con DEAE. Experimento realizado en base a 1 mg de partículas.

### 2.2.2 Caracterización de la actividad de la enzima inmovilizada sobre las nanopartículas magnéticas

La actividad enzimática específica de la proteína de fusión libre e inmovilizada en las nanopartículas magnéticas se determinó a 25 °C, pH 7,5 utilizando como sustrato la D-fenilglicina y analizando la formación del ácido benzoilfórmico con el tiempo a 252 nm, según se detalla en Materiales y Métodos. La Tabla 7 muestra que la actividad específica de la enzima libre es de  $3608,33 \pm 42,29$  U/mg de proteína y en el caso de la enzima inmovilizada en nanopartículas magnéticas es de  $3433,33 \pm 77,17$  U/mg de proteína ensayada. Estos resultados concuerdan con lo que previamente había obtenido Moldes (2003) para la proteína híbrida libre y con los estudios realizados para la enzima nativa por Fonda y Anderson (1967). Adicionalmente se determinaron los principales parámetros cinéticos de la proteína CLyt-DAO libre e inmovilizada, a concentraciones crecientes de D-fenilglicina (0,2-15 mM). Como se observa en la Figura 52 las dos variantes de la enzima (libre e inmovilizada) muestran una cinética de Michaelis-Menten muy similar, lo que sugiere que el proceso de inmovilización no afecta de manera significativa a la actividad de la DAO de *Rhodotorula gracilis*. Los parámetros cinéticos de  $k_{cat}$ ,  $K_m$  y  $k_{cat}/K_m$  se muestran en la Tabla 7. También se indican los datos cinéticos para la enzima nativa obtenidos durante la reacción de desaminación del sustrato D-fenilglicina midiendo, a diferencia de este trabajo, el consumo de oxígeno a 25 °C, pH 8,5, y en condiciones de saturación de aire (Caligiuri y cols., 2008).



**Figura 52.** Representación gráfica de la velocidad inicial de reacción obtenida a concentraciones crecientes de D-fenilglicina para la CLyt-DAO libre (línea negra) y la CLyt-DAO inmovilizada en nanopartículas magnéticas (línea roja). Cada punto representa la media de tres determinaciones experimentales independientes. Se emplearon 10  $\mu$ g de enzima en cada ensayo.

Tabla 7. Parámetros cinéticos aparentes para CLyt-DAO libre e inmovilizada en nanopartículas magnéticas y para la DAO nativa de *Rhodotorula gracilis*.

Enzima	AE (U/mg) <sup>a</sup>	$k_{cat}$ (min <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	$K_m$ , ap.(mM) <sup>b</sup>	$k_{cat}/K_m$ , ap. (min <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> )
<b>libre</b>	<b>3608,33 ± 42,29</b>	<b>248,89 ± 13,15</b>	<b>3,44 ± 0,45</b>	<b>72,35</b>
<b>inmovilizada</b>	<b>3433,33 ± 77,17</b>	<b>225,10 ± 11,12</b>	<b>2,62 ± 0,35</b>	<b>85,91</b>
<b>DAO*</b>	-	<b>560 ± 25</b>	<b>3,5 ± 0,5</b>	<b>160</b>

<sup>a</sup> los datos de actividad enzimática se obtuvieron al promediar tres determinaciones independientes.

<sup>b</sup> los parámetros cinéticos se obtuvieron ajustando los datos de velocidad inicial obtenidos a concentraciones crecientes de D-fenilglicina a la ecuación de Michaelis-Menten.

\* parámetros cinéticos obtenidos para la DAO nativa de *Rhodotorula gracilis* frente al sustrato D-fenilglicina (Caligiuri y cols., 2008).

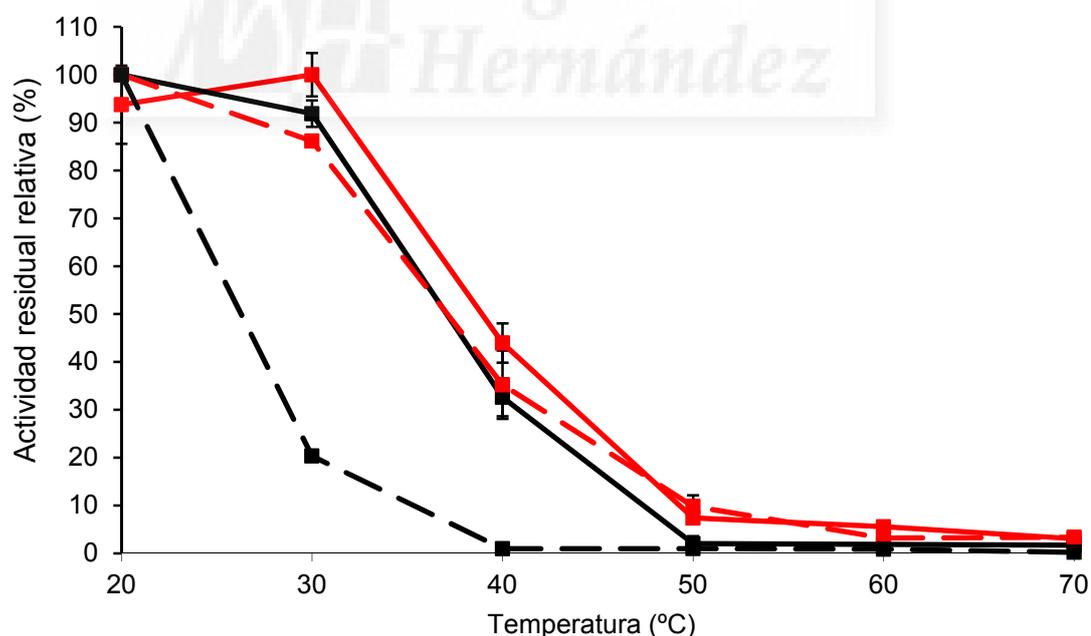
### 2.2.3 Estabilidad de la proteína inmovilizada frente a temperatura, pH y fuerza iónica

A continuación nos propusimos estudiar el efecto de parámetros tales como la temperatura, el pH o la concentración de sal en la estabilidad de la unión y en la actividad de la enzima. Por ello, en primer lugar se determinó la actividad enzimática residual de la proteína CLyt-DAO libre e inmovilizada en las nanopartículas después de una incubación de una hora a temperaturas crecientes entre los 20 y 70 °C. Los ensayos de actividad se llevaron a cabo después de cada tratamiento en

tampón fosfato sódico 20 mM, pH 7,5 a 25 °C como se describe en el capítulo de Materiales y Métodos. Estos estudios también se realizaron en presencia de glicerol (10 %, p/v), ya que se conoce que este compuesto estabiliza la estructura de la DAO (Pollegioni y cols., 1992; Pollegioni y Pilone, 1992).

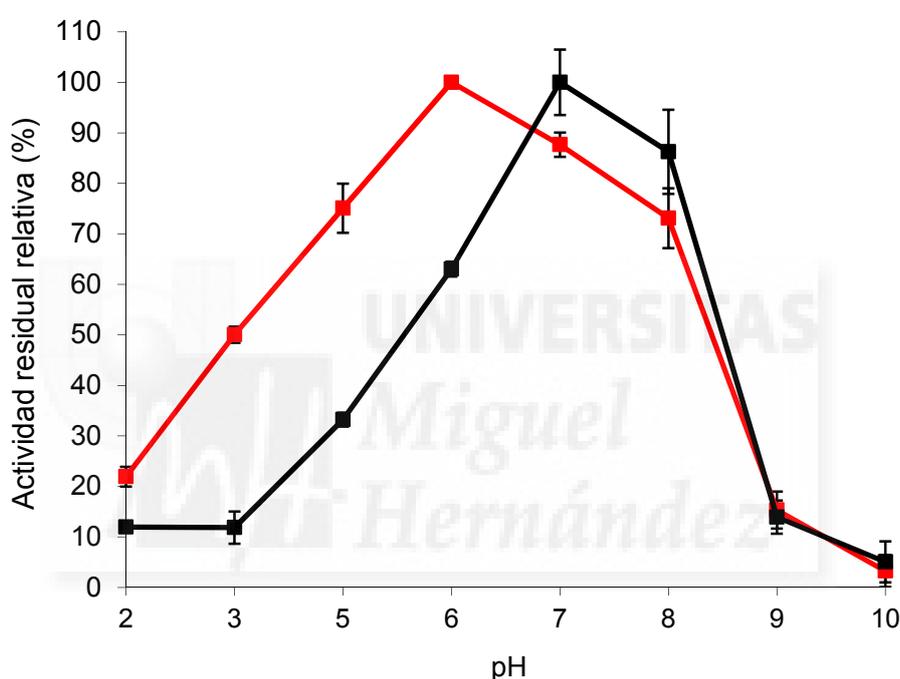
Como se puede observar en la Figura 53, en ausencia de glicerol, a medida que la temperatura de incubación aumenta, la actividad residual relativa decrece, si bien en mayor medida para la enzima libre que para la enzima inmovilizada. Esta diferencia resulta muy evidente después de incubar las dos variantes durante 1 h a 30 °C, puesto que la enzima inmovilizada mantiene alrededor de un 90 % de la actividad inicial y la enzima libre alrededor de un 20 %. Además, a 40 °C la enzima libre pierde toda la actividad, mientras que la enzima inmovilizada retiene alrededor de un 40 % de la actividad inicial. Estos datos indican que la inmovilización induce un aumento de la estabilidad térmica de la enzima en ausencia de glicerol y serán de gran importancia en cuanto al diseño de experimentos sobre las aplicaciones biomédicas de ésta proteína (ver más adelante).

En presencia de glicerol (Figura 53) las diferencias detectadas con anterioridad para la enzima libre e inmovilizada se reducen sustancialmente, lo que confirma un efecto estabilizador del glicerol frente a la temperatura, especialmente sobre la enzima libre.



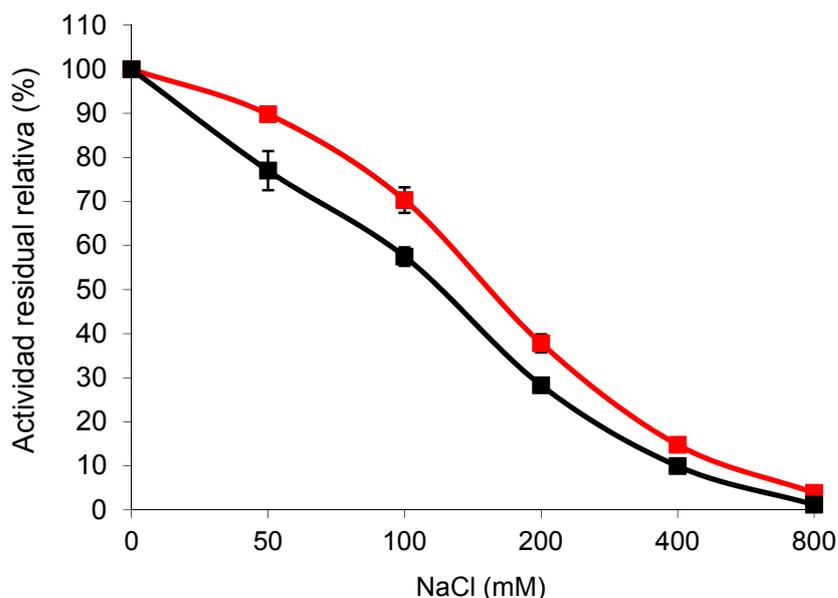
**Figura 53.** Efecto de la temperatura en la actividad enzimática residual de la CLyt-DAO libre (en negro) e inmovilizada a nanopartículas (en rojo) tras una incubación de una hora a diferentes temperaturas. La actividad residual se ensayó empleando 10 µg de enzima y 15 mM de D-fenilglicina en tampón fosfato 20 mM, pH 7,5, a 25 °C y durante 10 min. Las líneas continuas significan que en el experimento se incorporó glicerol 10 % (p/v). Los valores representan la media de tres determinaciones individuales y son relativos al máximo de actividad obtenido para cada variante de enzima bajo las condiciones ensayadas.

En un estudio similar se analizó el efecto del pH en la actividad enzimática residual de la proteína libre e inmovilizada. En el caso de la enzima libre la mayor actividad enzimática residual se obtuvo cuando la proteína se incubó a pH 7,0 (Figura 54). Por su parte, la proteína inmovilizada muestra un perfil de pH desplazado hacia valores más bajos, presentando la mayor actividad residual a pH 6,0, indicando que el soporte protege a la enzima frente a pH ácidos en comparación con la enzima libre, mientras que la actividad a pH alcalino apenas registró variaciones. Por lo tanto, el experimento indica una mejora biotecnológica, producto de la inmovilización, al haber ampliado el rango de pH de actividad de la enzima.



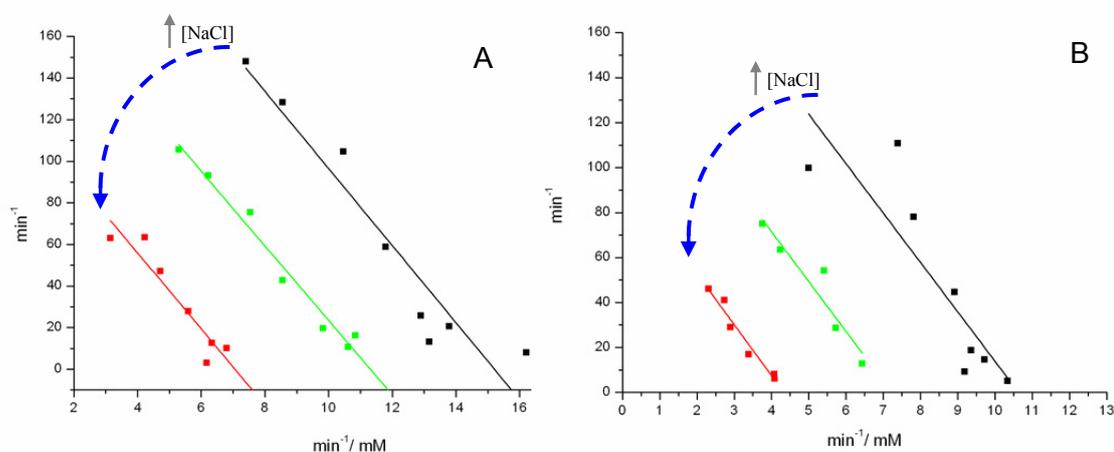
**Figura 54.** Efecto del pH en la actividad enzimática residual de la CLyt-DAO libre (negro) e inmovilizada en nanopartículas magnéticas (rojo) después de una incubación de una hora a 25 °C a diferentes pH. La actividad residual se ensayó frente a 15 mM de D-fenilglicina en tampón fosfato sódico 20 mM, pH 7,5 a 25 °C durante 10 min. Se emplearon 10 µg de enzima. Los valores representan la media de tres determinaciones individuales y son relativos al máximo de actividad obtenido para cada variante de enzima bajo las condiciones ensayadas.

Adicionalmente, se estudió el efecto de la presencia de NaCl a diferentes concentraciones en la actividad de la enzima libre e inmovilizada (Figura 55), comprobándose que disminuye de manera acusada, llegando a estar por debajo del 50 % a 200 mM de NaCl para las dos variantes. Sin embargo, este efecto de inhibición es menor cuando la enzima se encuentra unida a las partículas magnéticas, sugiriendo de nuevo un efecto protector de la inmovilización.



**Figura 55.** Efecto de la concentración de NaCl en la actividad enzimática de la CLyt-DAO libre (en negro) e inmovilizada en nanopartículas magnéticas (en rojo). La actividad enzimática se ensayó frente a 15 mM de D-fenilglicina en tampón fosfato sódico 20 mM, pH 7,5 a 25 °C durante 10 min. Se emplearon 10 µg de enzima. Los valores representan la media de tres determinaciones individuales y son relativos al máximo de actividad obtenido para cada variante de enzima bajo las condiciones ensayadas.

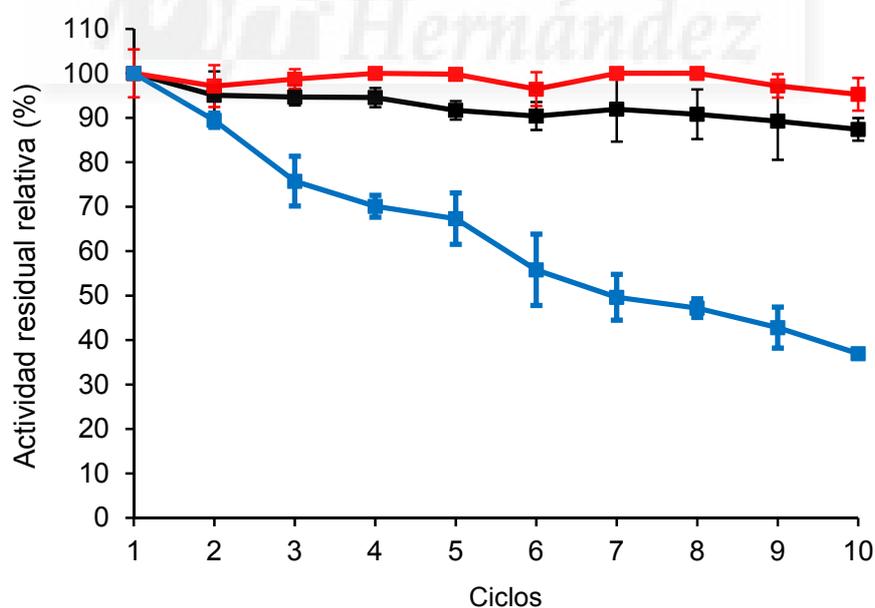
Para determinar el tipo de inhibición que producía el NaCl en la actividad de CLyt-DAO, se realizaron estudios a concentraciones crecientes de D-fenilglicina. Al hacer la representación gráfica de Eadie-Hofstee (Figura 56) para las tres concentraciones ensayadas de sal (40-80-120 mM) se observó que la constante de Michaelis ( $K_m$ ) no varía, pero que la velocidad máxima aparente disminuye a medida que aumenta la concentración salina, lo cual indica una posible inhibición no competitiva. Las constantes de inhibición obtenidas para la enzima libre e inmovilizada fueron de  $112 \pm 45$  y  $184 \pm 28$  mM respectivamente, lo que indica que la enzima inmovilizada se inhibe en alguna menor medida por el NaCl en comparación con la enzima libre.



**Figura 56.** Representación gráfica de Eadie-Hofstee ( $v$  vs  $v/[s]$ ) a diferentes concentraciones de NaCl: 40 mM (negro), 80 mM (verde) y 120 mM (en rojo). A) 10 µg de CLyt-DAO inmovilizada en nanopartículas B) 10 µg de enzima libre. La actividad enzimática se ensayó frente a concentraciones crecientes de D-fenilglicina (0,5-1,0-1,5-2,0-5,0-10-15-20 mM) en tampón fosfato sódico 20 mM, pH 7,5 a 25 °C durante 10 min.

### 2.2.4 Actividad de la enzima CLyt-DAO en ciclos sucesivos

Un parámetro importante que es necesario caracterizar a la hora de evaluar las posibilidades de un biorreactor enzimático es su capacidad de reutilización, puesto que al final de cada paso catalítico puede haber problemas de desorción o inactivación de la enzima. Para comprobar este extremo en nuestro caso, la actividad residual de la CLyt-DAO inmovilizada se analizó durante diez ciclos consecutivos de actividad a 25 °C (de 15 min cada uno) (Figura 57). Durante el experimento cada 15 min (o ciclo) se realizaron determinaciones puntuales de actividad enzimática, separando el sobrenadante de las partículas, lavando las mismas con tampón de fosfato sódico 20 mM, pH 7,5 y añadiendo una nueva disolución fresca del sustrato sobre las partículas. Para evaluar el efecto del tiempo del experimento sobre la actividad de la proteína, como control se analizó en paralelo la actividad tanto de la enzima libre como de enzima inmovilizada en tantas muestras independientes como ciclos de reutilización. Como se observa en la Figura 57, la actividad de la enzima libre e inmovilizada en nanopartículas no reutilizadas se mantiene estable durante el tiempo correspondiente a los diez ciclos de medición. En contraste, la actividad residual de las partículas que fueron reutilizadas durante diez ciclos continuos de medición cayó progresivamente, manteniendo alrededor de un 40 % de la actividad enzimática inicial después de diez ciclos de medición.

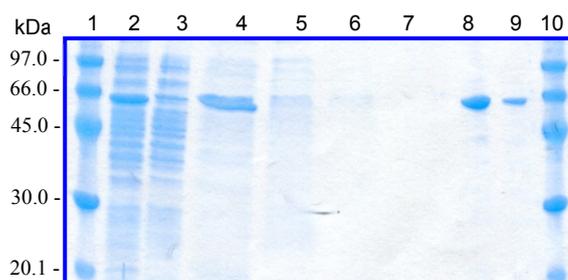


**Figura 57.** Evaluación de la capacidad de reutilización de la CLyt-DAO inmovilizada en nanopartículas magnéticas durante 10 ciclos continuos de actividad (en azul) frente a 15 mM de D-fenilglicina, tampón fosfato 20 mM, pH 7,5 a 25 °C. Como control se analizó en paralelo la actividad tanto de la enzima libre (negro) como de la enzima inmovilizada (rojo) en tantas muestras independientes como ciclos de reutilización. Se emplearon 10 µg de enzima. Los valores representan la media de tres determinaciones individuales y son relativos a la actividad obtenida durante el primer ciclo de medición.

### 2.2.5 Estudio de la inmovilización y purificación de CLyt-DAO en nanopartículas magnéticas a partir de extractos crudos

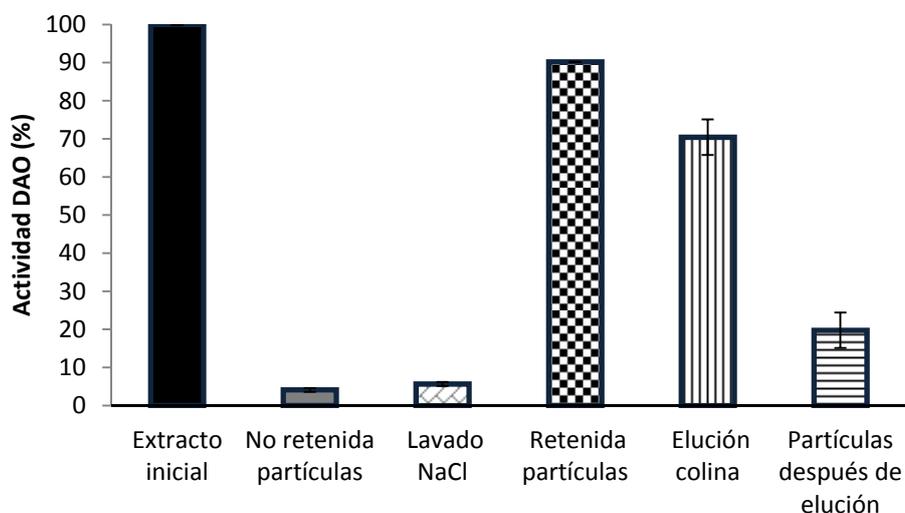
La facilidad con la que la proteína CLyt-DAO se une a nanopartículas magnéticas junto con la sencillez de manejo de las mismas nos indujo a poner a punto un sistema de purificación de esta proteína a partir de extractos bacterianos que fuera rápido y simple a la par que eficiente. Para este fin, se realizaron experimentos de recuperación de CLyt-DAO a partir de extractos celulares utilizando nanopartículas magnéticas, y se comprobó la pureza y actividad específica de las fracciones que resultaron de esta purificación. Para esto se utilizó como muestra de partida 1 mL de una matriz proteica que contenía 125  $\mu\text{g}$  CLyt-DAO y 875  $\mu\text{g}$  de proteínas celulares de la estirpe BL21 de *E. coli* no relacionadas con la proteína híbrida y 12,5 mg de nanopartículas magnéticas (Figura 58, carril 2). El extracto proteico se incubó con las nanopartículas magnéticas (apartado 4.3 de Materiales y Métodos), y como se observa en la Figura 58 (carriles 3 y 4) la mayoría de la proteína híbrida se retiene en las partículas, mientras que una pequeña parte se desprende por lavados sucesivos con 1,5 M NaCl (carriles 5-7). La proteína se consigue eluir con aceptable pureza de las nanopartículas por incubación con colina 2 % (p/v) + 1,5 M NaCl (carriles 8 y 9).

Con respecto a los rendimientos, se logró retener en las partículas magnéticas después de los lavados un  $90 \pm 1$  % de la actividad DAO que se encontraba en el extracto proteico inicial. De la proteína unida se logró eluir por lavados sucesivos con colina un  $71 \pm 5$  %, valorándose la actividad residual retenida en las nanopartículas (no eluida por colina) en un  $20 \pm 5$  % (Figura 59).



**Figura 58.** Análisis de la purificación de CLyt-DAO mediante SDS-PAGE, empleando 12,5 mg de nanopartículas magnéticas funcionalizadas con DEAE.

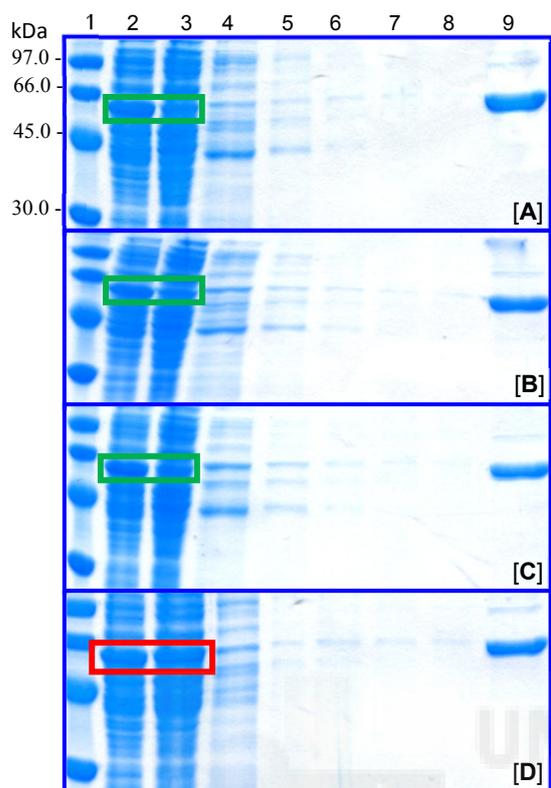
- 1, marcador de peso molecular
- 2, mezcla CLyt-DAO (125  $\mu\text{g}$ ) + proteínas no relacionada (875  $\mu\text{g}$ )
- 3, no retenido en las partículas
- 4, retenido en las partículas
- 5-7, lavados sucesivos 1,5 M NaCl
- 8-9, eluciones sucesivas con colina 2 % (p/v) + 1,5 M NaCl
- 10, marcador de peso molecular



**Figura 59.** Análisis de la cantidad de CLyt-DAO obtenida en las distintas etapas de su purificación utilizando nanopartículas magnéticas (12,5 mg) y una matriz proteica que contenía 125  $\mu\text{g}$  de CLyt-DAO y 875  $\mu\text{g}$  de proteínas celulares de la estirpe BL21 de *E. coli*.

Finalmente, la actividad específica de la proteína eluida frente al sustrato D-fenilglicina (15 mM) fue de  $3148,77 \pm 88,40$  U/mg de proteína, un valor muy similar al obtenido para la CLyt-DAO de partida que presentó una actividad específica de  $3259,26 \pm 180,56$  U/mg. Estos resultados indican que el proceso de inmovilización de la CLyt-DAO en las nanopartículas magnéticas y su posterior elución es específico, reversible y no afecta de manera significativa a la actividad específica de la enzima, por lo que es posible preparar este tipo de nanobiorreactores directamente a partir del extracto celular, sin necesidad de purificar previamente la enzima.

En el experimento anterior se obtuvo que una cantidad de la enzima (alrededor de un 20 %) se queda unida después de la elución con colina en las nanopartículas. Para evitar esto, así como para dificultar que proteínas del extracto saturaran inespecíficamente sitios de DEAE, se realizó un estudio similar donde se ensayó la influencia de la sal y de varios detergentes en la inmovilización de CLyt-DAO a 12,5 mg de nanopartículas magnéticas pero utilizando 1 mL de extracto proteico crudo ( $10 \text{ g L}^{-1}$ ) de *E. coli* BL21 (pCPC21). La Figura 60 muestra el análisis mediante SDS-PAGE.

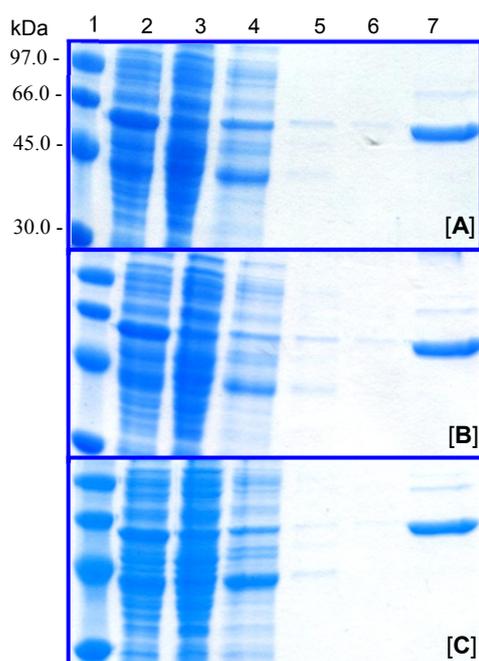


**Figura 60.** Análisis de la inmovilización de CLyt-DAO en nanopartículas magnéticas mediante SDS-PAGE. Al extracto proteico inicial de *E. coli* BL21 (pCPC21) se le adicionó: CHAPS 0,1 % (p/v) [A], colato sódico 0,1 % (p/v) [B], Sarcosil 0,1 % (p/v) [C] y NaCl 0,5 M [D].

- 1, marcador de peso molecular
- 2, extracto proteico de partida ( $10 \text{ g L}^{-1}$ )
- 3, no retenido en las partículas
- 4-8, lavados sucesivos 1,5 M NaCl
- 9- elución con colina 2 % (p/v) + 1,5 M NaCl

La presencia de detergentes como CHAPS, Colato sódico o Sarcosil o de 0,5 M de NaCl en el extracto no impide la inmovilización de CLyt-DAO en las nanopartículas magnéticas, proteína que puede ser eluída de las mismas en presencia de colina al 2 % (p/v) con elevada pureza. Sin embargo, tal y como se observa en la Figura 60D (véase rectángulo rojo), en condiciones de alta concentración de sal (0,5 M NaCl), en comparación con las otras variantes, hay una mayor cantidad de CLyt-DAO que no se retiene en las partículas magnéticas.

Debido a que el resultado que se obtuvo para los detergentes fue similar, y que por otra parte el CHAPS es un detergente dializable muy utilizado en el procesamiento de proteínas, se realizó un estudio donde se evaluó la influencia de la concentración de este detergente en la inmovilización de la CLyt-DAO. En apariencia, tras inspección visual de los geles (Figura 61), todos los casos se comportan de manera similar.



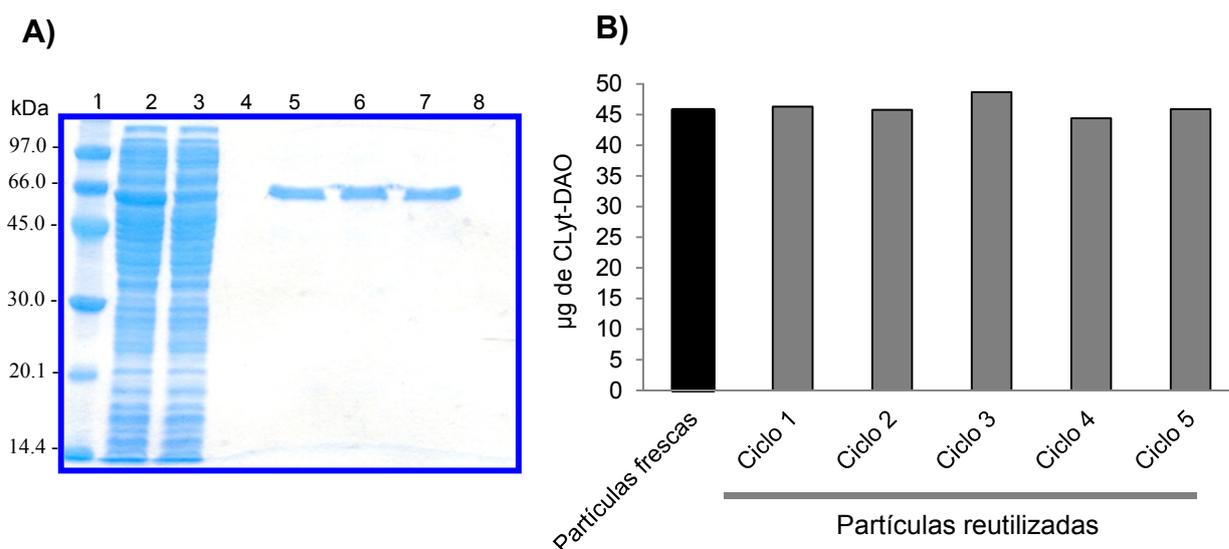
**Figura 61.** Análisis de la inmovilización de CLyt-DAO a nanopartículas magnéticas mediante SDS-PAGE. Al extracto proteico inicial de *E. coli* BL21 (pCPC21) se le adicionó: CHAPS 0,01% (p/v) [A], CHAPS 0,1% (p/v) [B] y CHAPS 1% (p/v) [C].

1, marcador de peso molecular  
 2, extracto proteico de partida  $10 \text{ g L}^{-1}$   
 3, no retenido en las partículas  
 4-8, lavados sucesivos  $1,5 \text{ M NaCl}$   
 9, elución con colina 2 % (p/v) +  $1,5 \text{ M NaCl}$

### 2.2.6 Regeneración de las nanopartículas magnéticas

El hecho de poder recuperar las nanopartículas libres a conveniencia puede resultar de gran valor para la industria que trabaja con biorreactores biológicos, por ejemplo para su limpieza, o cuando el enzima se haya inactivado. En el caso que nos ocupa, como se menciona más arriba, no toda la proteína puede ser eluída de las nanopartículas mediante incubación por colina, por lo que se hace necesario un paso drástico de limpieza de las mismas antes de poder ser reutilizadas. Tras los pasos de purificación de CLyt-DAO a partir de  $500 \mu\text{L}$  del mismo extracto crudo empleado con anterioridad ( $10 \text{ g L}^{-1}$ ) y  $5 \text{ mg}$  de nanopartículas magnéticas, las mismas se incubaron a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  durante toda la noche con  $500 \mu\text{L}$  de una solución  $50 \text{ mM}$  de SDS. Para poder reutilizar las nanopartículas el detergente fue eliminado mediante 10 lavados continuos de  $5 \text{ min}$ , en agitación rotatoria, con  $1 \text{ mL}$  de tampón de fosfato sódico  $20 \text{ mM}$ ,  $\text{pH } 7,0$ .

La Figura 62 muestra que las partículas regeneradas pueden emplearse para una nueva inmovilización de proteína, la cual queda retenida con una pureza alta y con un rendimiento muy similar durante 5 ciclos de inmovilización continuos al comparar con las partículas frescas. Como promedio de todos los ciclos y partiendo de un extracto crudo se lograron recuperar alrededor de  $9,2 \pm 1,4 \mu\text{g}$  de CLyt-DAO por  $\text{mg}$  de nanopartícula magnética empleado por ciclo.



**Figura 62.** A) Análisis electroforético de la purificación de CLyt-DAO con nanopartículas magnéticas regeneradas por incubación con SDS 50 mM.

1, marcador de peso molecular; 2, extracto soluble de partida  $10 \text{ g L}^{-1}$ ; 3, no retenido en las partículas; 4, libre; 5, elución con colina 2 % (p/v) (partículas frescas); 6, elución con colina 2 % (p/v) (partículas reutilizadas, ciclo 3); 7, elución con colina 2 % (p/v) (partículas reutilizadas, ciclo 5); 8, libre.

B) Cuantificación por Bradford (1976) de la cantidad de proteína eluída en cada ciclo empleando 5 mg de nanopartículas magnéticas.

### 2.3 Terapia enzimática contra células tumorales

El cáncer es un término que define de manera global un conjunto de enfermedades de muy diversa naturaleza, pero que constituye una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todas las regiones del planeta, constituyendo un grave problema sanitario (Bray y cols., 2012). Al ser una enfermedad muy heterogénea y multifactorial su combate es muy difícil, por lo que a lo largo de mucho tiempo las estrategias terapéuticas para abordarlo han sido múltiples. En este sentido, la nanooncología, la aplicación de la nanobiotecnología en investigaciones relacionadas con el cáncer, es en la actualidad un tema muy prometedor (Bava y cols., 2013).

En el presente trabajo se aborda la terapia enzimática del cáncer haciendo uso de nanopartículas magnéticas y de la D-aminoácido oxidasa de *Rhodotorula gracilis*, que ya tiene probados efectos citotóxicos sobre células cancerígenas a través de la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) (Bava y cols., 2013) (véase la reacción catalizada por la DAO, Figura 44).

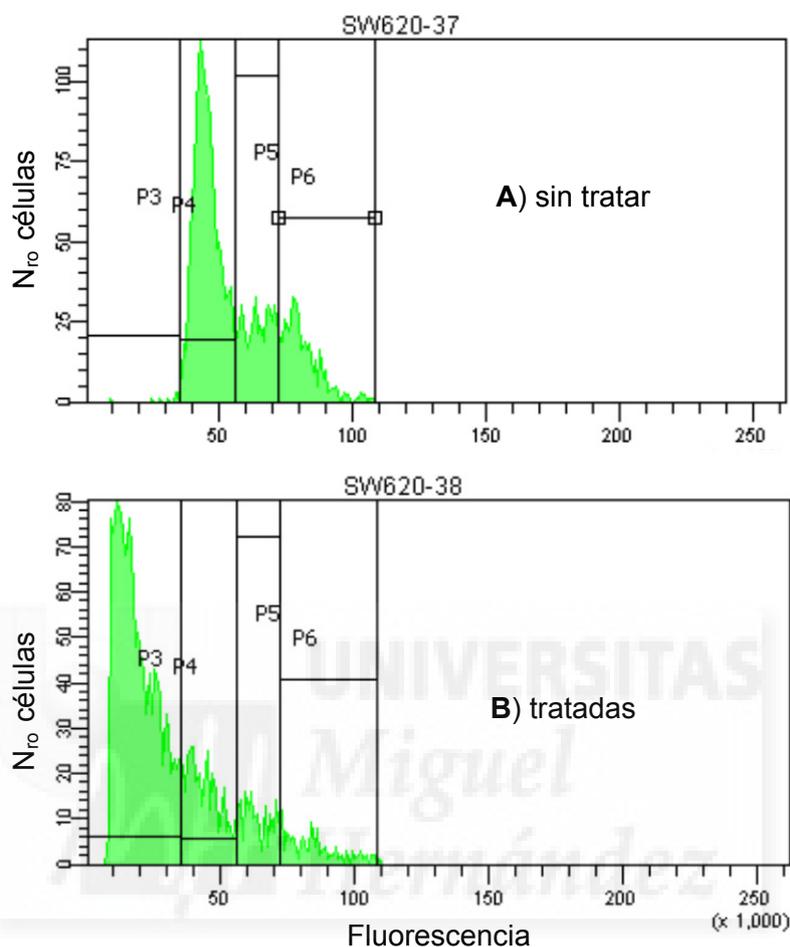
La posibilidad de emplear estas ROS en terapia antitumoral ya se evaluó desde finales de la década del 50 hasta inicios de la década del 70, cuando se llevaron a cabo estudios donde se inyectó  $\text{H}_2\text{O}_2$  a tumores, si bien con poco éxito terapéutico (Paillard, 1998). Posteriormente se utilizaron enzimas generadoras de peróxido como la glucosa o la xantina oxidasa (Ben-Yoseph y Ross, 1994) pero su estabilidad *in vivo* era muy baja y además sus sustratos eran moléculas endógenas y por

tanto era muy difícil controlar su concentración *in vivo* (Connors, 1995). Debido a esto comenzaron a utilizarse otras oxidasas en la que su actividad pudiera ser regulada con facilidad (Stegman y cols., 1998). La DAO representa una opción prometedora en este sentido, porque sus sustratos principales, los D-aminoácidos, se encuentran endógenamente en el organismo humano a concentraciones casi despreciables (Stegman y cols., 1998; Bava y cols, 2013). Sin embargo, como en cualquier terapia enzimática, uno de los obstáculos principales es el relacionado con la estabilidad enzimática, y en este sentido hay que recordar que la estabilidad de la DAO es limitada a 37 °C (Figura 53). En esta línea, ya se ha descrito un método para administrar esta enzima inmovilizada covalentemente sobre nanopartículas magnéticas (Bava y cols, 2013). En nuestro caso nos propusimos evaluar las posibilidades antitumorales de nuestro sistema de inmovilización a nanopartículas magnéticas funcionalizadas con DEAE a través del módulo de unión a colina C-LytA, que ya ha demostrado un importante incremento en la estabilización de la enzima (Figuras 53-55, apartado 2.2.3).

Teniendo en cuenta lo anterior la proteína de fusión CLyt-DAO pura y en condiciones de esterilidad fue inmovilizada a nanopartículas magnéticas funcionalizadas con DEAE siguiendo los procedimientos descritos con anterioridad. A continuación, los estudios se realizaron con la línea celular SW620 de carcinoma de colon. En los tratamientos se emplearon 2 unidades de actividad de la enzima inmovilizada en 50 µg de nanopartículas magnéticas y una concentración final de 1 mM de sustrato D-alanina. La Figura 63 muestra el ciclo celular obtenido por citometría de flujo para las células sin tratar y tratadas durante 24 h de cultivo. En el caso de las SW620 tratadas se observa que una gran cantidad de células se encuentran en fase Sub-G1 (P3), lo que es indicativo de muerte celular (Figura 63) (Mittag y Tarnok, 2011). Las células muertas al tener el ADN fragmentado emiten una fluorescencia, debido a la sonda yoduro de propidio (IP), de menor intensidad que las células vivas que tienen el ADN íntegro. En el caso de las células sin tratar (control) se obtiene un ciclo celular típico para esta línea, donde una parte de la población se encuentra en fase G1 (P4), otra en fase S o de síntesis (P5) y otra parte de la población en fase G2/M (P6), que al superar la fase de síntesis ya han duplicado su material genético y por tanto emiten una fluorescencia de mayor intensidad por citometría de flujo en presencia de IP (Mittag y Tarnok, 2011).

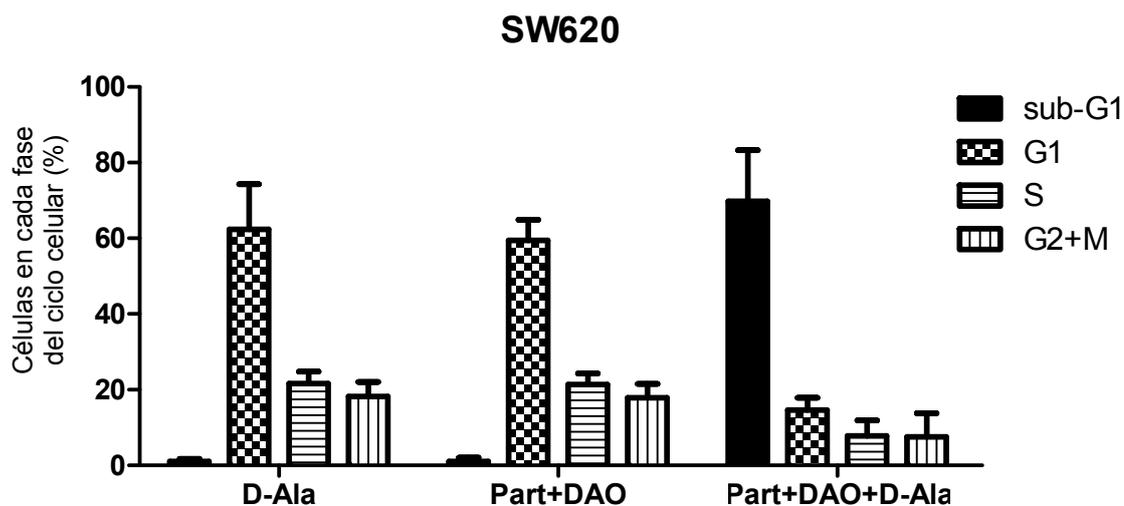
La cuantificación de un experimento típico de este estudio se muestra en la Figura 64. En primer lugar se observa que las nanopartículas con la CLyt-DAO inmovilizada y el sustrato D-alanina por separado no tienen ningún efecto citotóxico apreciable sobre las células SW620 (Figura 64). Por su parte, la enzima inmovilizada en presencia del sustrato desencadena un importante efecto citotóxico

en más de un 70 % de la población de células analizadas, como se refleja en el hecho de que la mayoría de las células tratadas se encuentren en fase sub-G1 (P3).

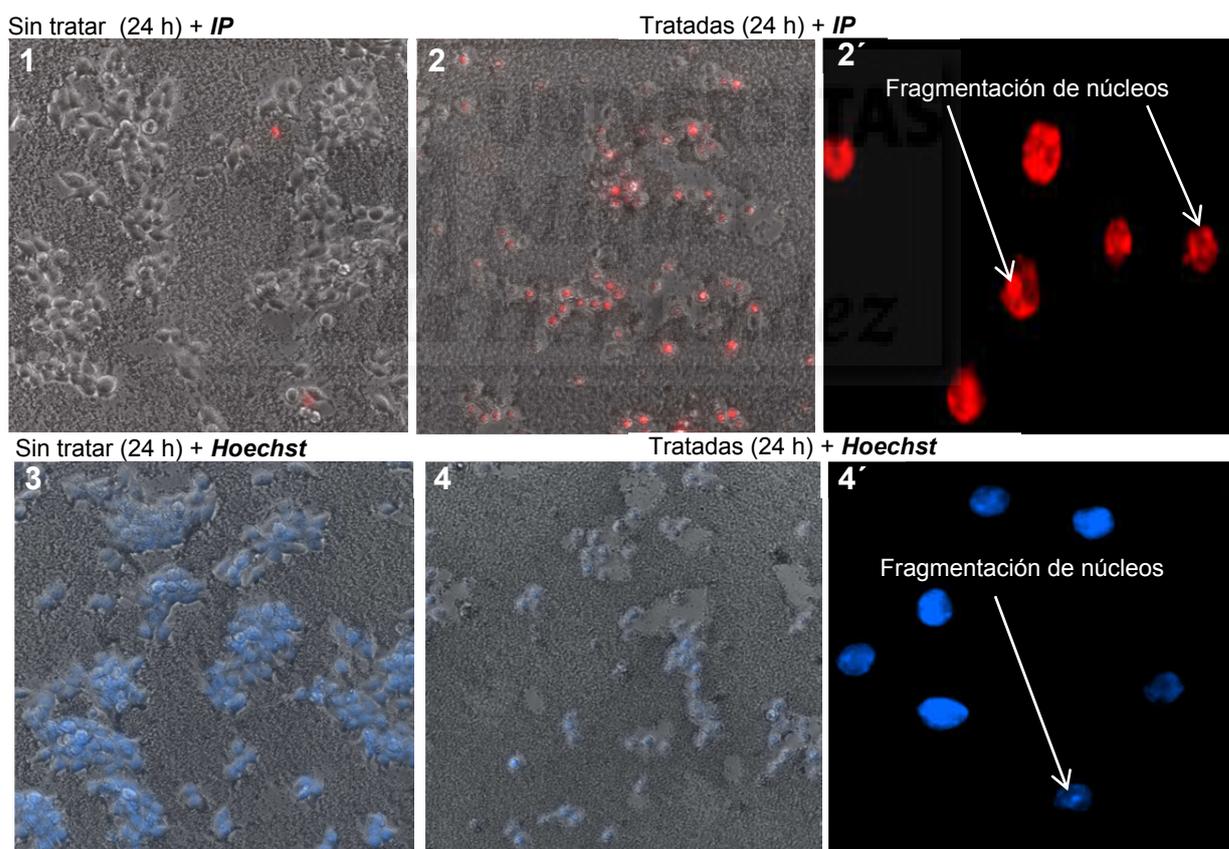


**Figura 63.** Análisis del ciclo celular por citometría de flujo para células SW620 tratadas durante 24 h a 37 °C con CLyt-DAO inmovilizada en nanopartículas magnéticas. Se emplearon 2 unidades de actividad de la enzima inmovilizada en 50  $\mu\text{g}$  de nanopartículas magnéticas y una concentración final de 1 mM del sustrato D-alanina. El yoduro de propidio se utilizó como agente intercalante fluorescente del ADN a una concentración final de 25  $\text{ng mL}^{-1}$ . P3: fase sub-G1, P4: fase G1; P5: fase S; P6: fase G2/M.

De estos estudios se obtuvieron por microscopía de fluorescencia imágenes antes y después de 24 h de tratamiento con la DAO inmovilizada en las nanopartículas y en presencia de D-alanina (Figura 65). Se emplearon los agentes intercalantes fluorescentes IP y el Hoechst 33342, que a diferencia del IP es un colorante vital que se intercala en el ADN sin necesidad de permeabilización de la membrana celular y permite la distinción entre núcleos fragmentados e íntegros.



**Figura 64.** Análisis del porcentaje de células SW620 en cada fase del ciclo celular. Los datos se obtuvieron por citometría de flujo, el yoduro de propidio se utilizó como agente intercalante fluorescente del ADN a una concentración final de  $25 \text{ ng mL}^{-1}$ .



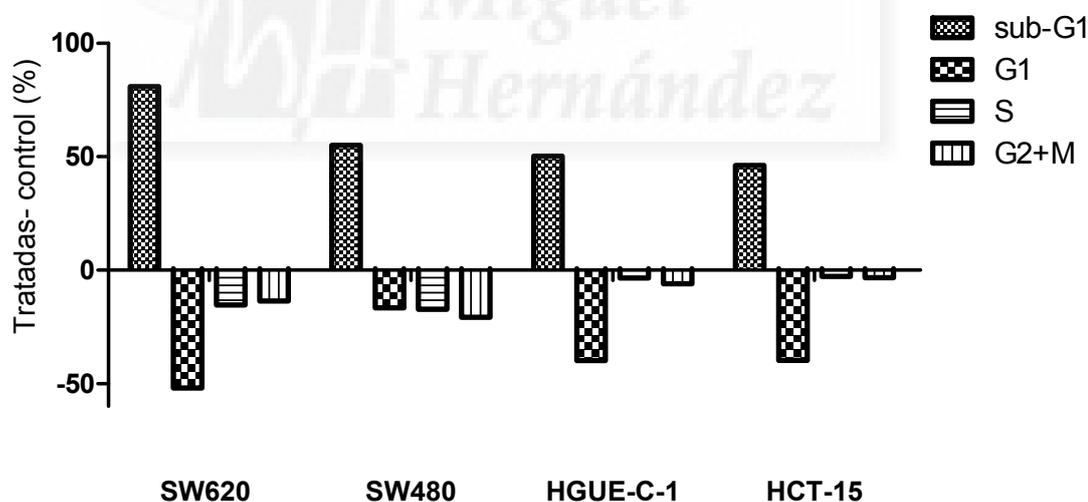
**Figura 65.** Análisis de la integridad celular por microscopía de fluorescencia de células SW620 cultivadas durante 24 horas en ausencia y presencia de la DAO inmovilizada en las nanopartículas magnéticas más el sustrato D-alanina  $1 \text{ mM}$ . Microscopio de fluorescencia invertida Nikon Eclipse TE2000-U (Objetivo 20X).

1-Sin tratar, IP  $25 \text{ ng mL}^{-1}$  (control); 2-Tratadas, IP  $25 \text{ ng mL}^{-1}$ ; 2'- Ampliación de 2.

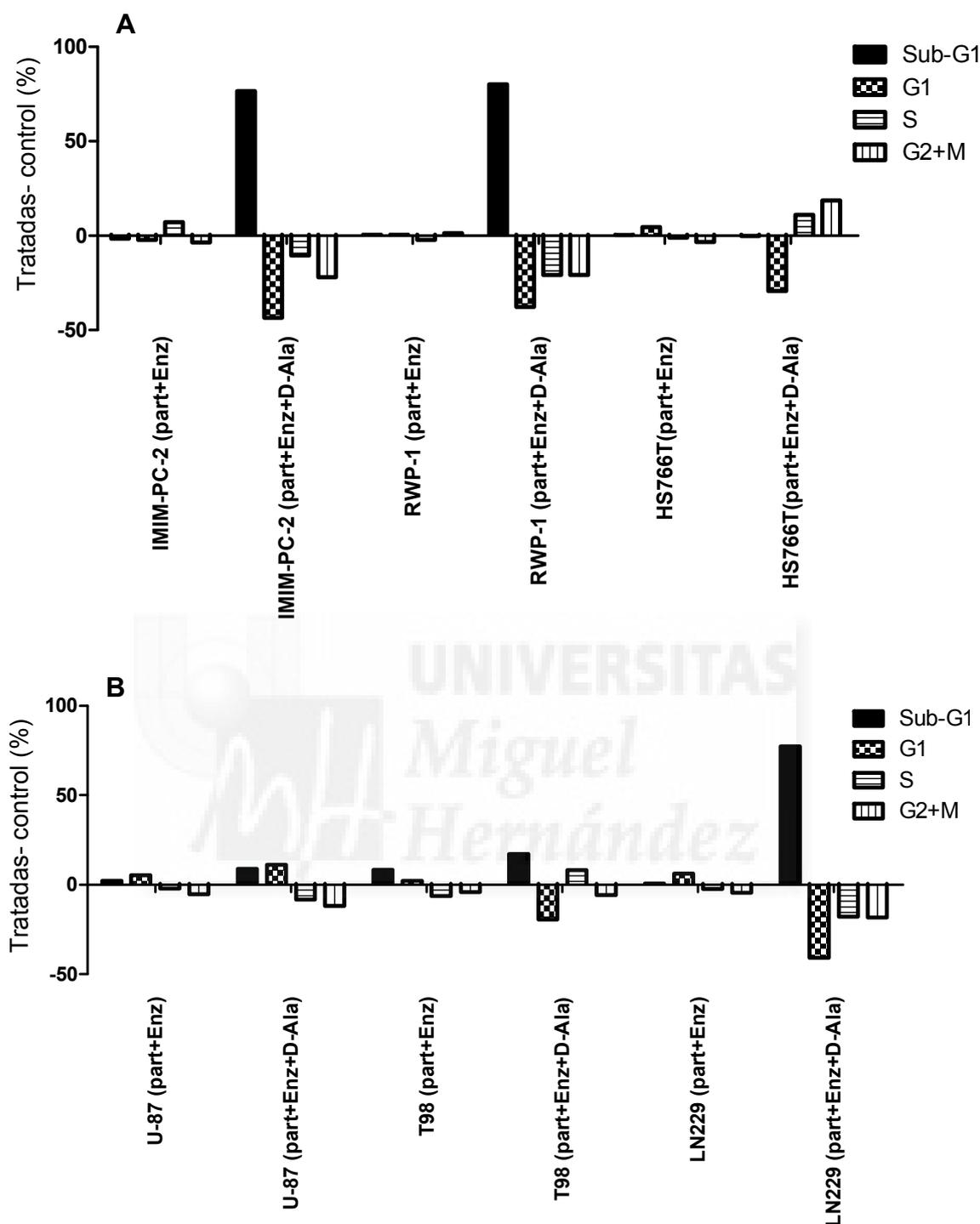
3-Sin tratar, Hoechst  $3 \text{ μg mL}^{-1}$  (control); 4- Tratadas, Hoechst  $3 \text{ μg mL}^{-1}$ ; 4'- Ampliación de 4.

Después de 24 h de tratamiento la mayoría de las células están muertas, observándose cierta fragmentación de los núcleos por tinción del material genético con los agentes intercalantes del ADN IP y Hoechst (Figura 65-2' y 65-4').

A continuación se realizó un estudio para comprobar si este efecto citotóxico se podía reproducir en otras líneas celulares de carcinoma de colon. Como se aprecia en la Figura 66, la DAO inmovilizada a través de C-LytA en las nanopartículas magnéticas en presencia del sustrato D-alanina 1mM, produjo en las líneas de carcinoma de colon analizadas un efecto similar al que ya se había obtenido para las SW620, al encontrarse un alto porcentaje de células en la fase sub-G1 o de muerte celular. Este efecto citotóxico también se reprodujo en varias líneas celulares de carcinoma de páncreas y glioblastoma multiforme (Figura 67), lo cual pudiera potenciar la utilización de la terapia enzimática propuesta para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer. Sin embargo, resulta importante destacar que la línea HS766T de carcinoma de páncreas y las líneas U87 y T98 de glioblastoma multiforme mostraron cierto grado de resistencia al tratamiento. Esto último concuerda con los resultados obtenidos por Bava y cols. (2013) para la línea celular U87.

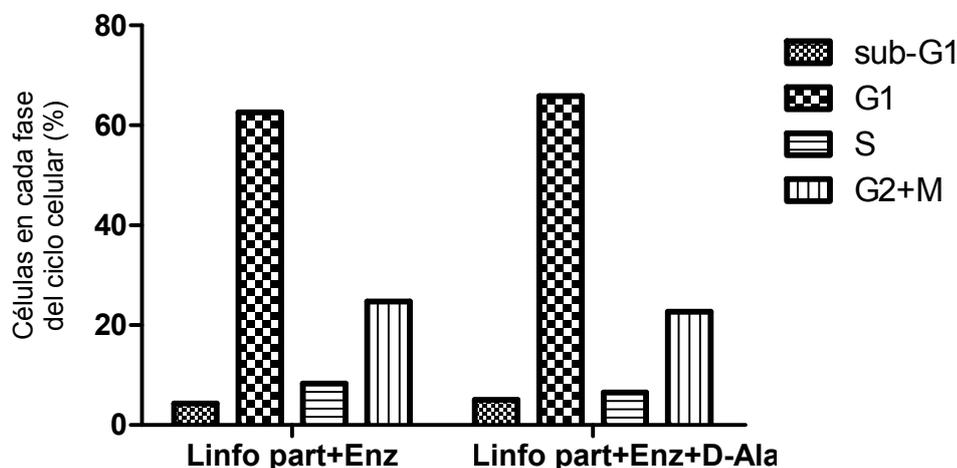


**Figura 66.** Análisis del porcentaje de células en cada fase del ciclo celular, con respecto a células sin tratar, para las líneas de carcinoma de colon: SW620, SW480, HGUE-C-1 y HCT-15. Los datos se obtuvieron por citometría de flujo, el yoduro de propidio se utilizó como agente intercalante fluorescente del ADN a una concentración final de 25 ng mL<sup>-1</sup>.



**Figura 67.** Análisis del porcentaje de células en cada fase del ciclo celular, con respecto a células sin tratar, para las líneas de carcinoma de páncreas (A): IMIM-PC-2, RWP-1, HS766T, y para las líneas de glioblastoma multiforme (B): U87, T98 y LN229. Los datos se obtuvieron por citometría de flujo, el yoduro de propidio se utilizó como agente intercalante fluorescente del ADN a una concentración final de 25 ng mL<sup>-1</sup>.

Los tratamientos no tuvieron ningún efecto citotóxico apreciable en líneas controles de linfocitos (Figura 68), lo que resulta muy importante a fin de evitar la muerte a células sanas vecinas del tumor que pudieran verse afectadas por cercanía por la terapia enzimática.



**Figura 68.** Análisis del porcentaje de células en cada fase del ciclo celular para linfocitos tratados con la DAO inmovilizada en las nanopartículas, en presencia y ausencia del sustrato D-alanina a una concentración final de 1 mM. Los datos se obtuvieron por citometría de flujo, el yoduro de propidio se utilizó como agente intercalante fluorescente del ADN a una concentración final de 25 ng mL<sup>-1</sup>.

#### 2.4 Nuevo sistema de purificación de proteínas recombinantes a partir de las proteínas de fusión con C-LytA mediante el empleo de inteínas

El desarrollo de sistemas simples y de alta eficiencia para la producción y posterior obtención de proteínas recombinantes resulta un tema de singular importancia. Actualmente, la mayoría de las investigaciones en el campo de la biología molecular y celular pasan por la caracterización de proteínas y de sus interacciones, para lo cual casi siempre resulta muy necesario la obtención de cantidades apreciables de la misma de una elevada pureza.

El empleo de segmentos polipéptidicos (etiquetas) en la expresión de proteínas de fusión es una práctica común para la producción de proteínas recombinantes. Muchos de ellos confieren solubilidad a la proteína de interés y pueden exponer puntos de anclaje por afinidad que facilitan el proceso de purificación de la proteína de interés (etiquetas de afinidad). Sin embargo, un problema muy recurrente continúa siendo el cómo eliminar en muchos casos estas etiquetas del producto final. La eliminación de la etiqueta de afinidad en el sistema de purificación de C-LytA ha sido probada con agentes proteolíticos, como la trombina (Moldes, 2003) y la enteroquinasa (Biomedal S.L.).

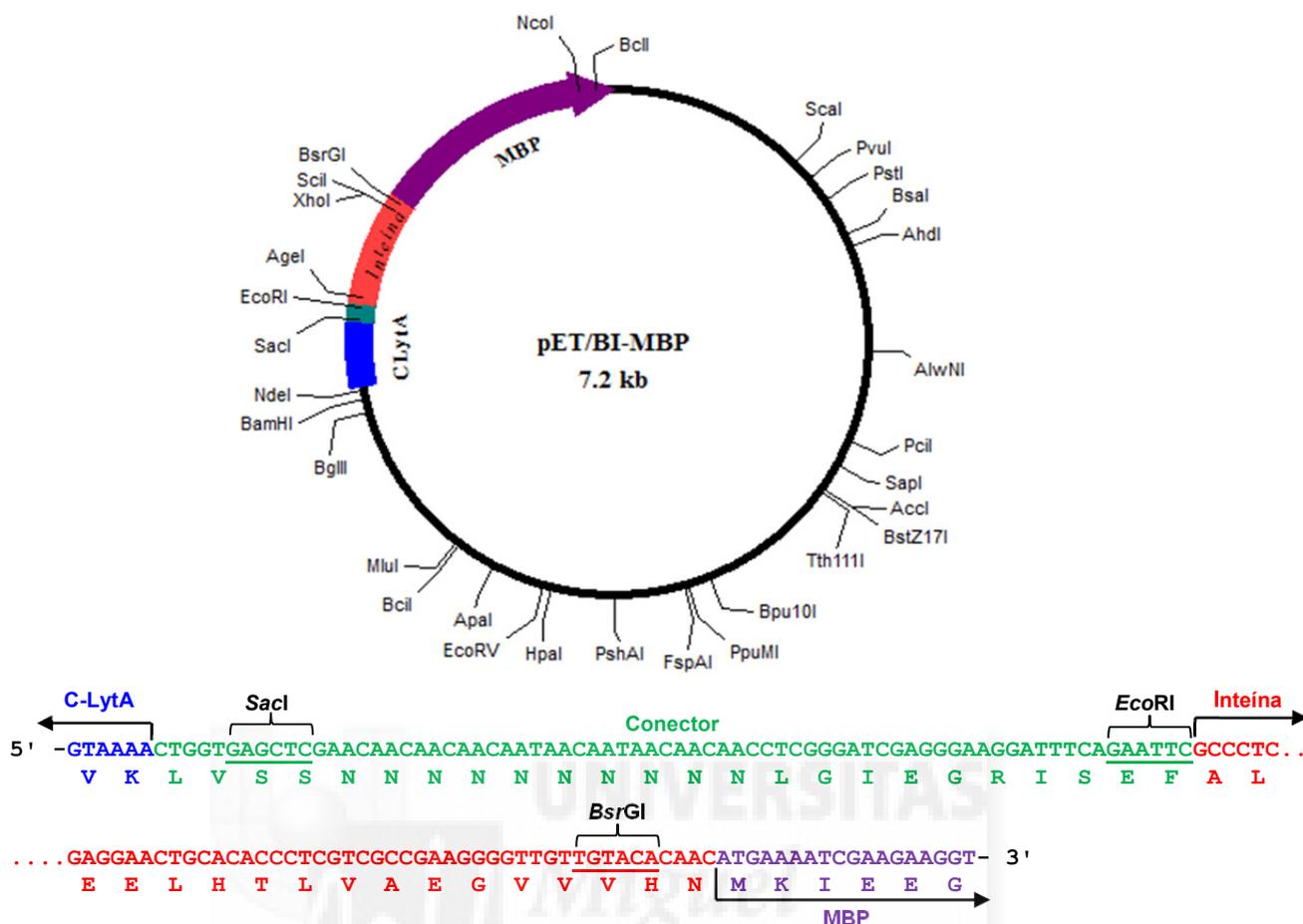
La trombina (y en general cualquier proteasa) tiene una eficacia limitada y variable dependiendo de la proteína a digerir (Waugh, 2011). Por su parte la utilización de la enteroquinasa choca con el elevado precio de esta enzima, lo cual encarecería mucho el proceso. La escisión de la etiqueta de afinidad C-LytA continuaba siendo un problema que de resolverse proporcionaría a este sistema un elevado valor añadido que impulsaría su diseminación.

En este sentido se han descrito segmentos proteicos que poseen actividad proteolítica inducible. La combinación de estos polipéptidos que se escinden a sí mismos con etiquetas de afinidad provee una herramienta simple y muy efectiva para lograr la separación por afinidad y posterior obtención por ruptura, de la proteína de interés con un alto grado de pureza. En el presente trabajo nos propusimos estudiar el empleo de inteínas como segmentos proteicos que pueden escindir a sí mismos bajo ciertas condiciones ambientales para la purificación de la proteína de interés (Perler y cols., 1994; Banki y Wood, 2005; Fong y cols., 2010; Li, 2011). Para esto, en colaboración con el laboratorio del Dr. David Wood (Universidad de Ohio, EE.UU) se combinó la etiqueta de afinidad C-LytA con el segmento de inteína ( $\Delta$ I-CM) de *Saccharomyces cerevisiae* con actividad auto-proteolítica inducible por pH 6,5 en su extremo C-terminal (Banki y cols., 2005; Gillies y cols., 2008).

#### 2.4.1 Purificación en fase sólida

En una primera aproximación se trabajó la purificación de proteínas recombinantes utilizando el sistema propuesto con anterioridad sobre fase sólida. La metodología general comprende en primer lugar la inmovilización de la proteína de fusión a una superficie o soporte funcionalizado con análogos de colina y posteriormente la obtención de la proteína de interés por un cambio de pH en el medio (Figura 5). La reducción del pH provoca la ruptura específica de la proteína por la secuencia de la inteína rindiendo la proteína de interés, que aparece en la fase móvil, y quedando inmovilizada a la superficie funcionalizada la parte correspondiente al módulo de unión colina.

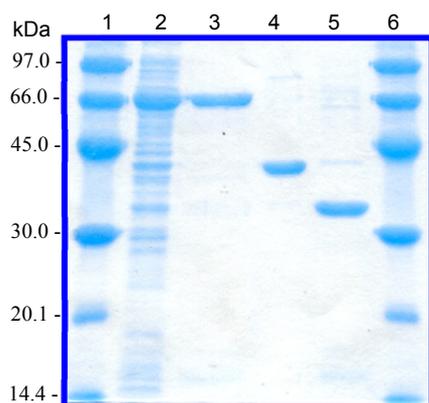
Se utilizó como modelo de estudio la purificación de la proteína de unión a maltosa (MBP) a partir de la proteína de fusión que contiene la etiqueta de afinidad C-LytA y un segmento de inteína con actividad auto-proteolítica dependiente de pH (CLyt-int-MBP, donde "int" significa inteína) (Figura 69). La obtención de proteína recombinante se ensayó sobre dos fases sólidas: DEAE-celulosa, el soporte tradicional para la purificación de proteínas conteniendo C-LytA, y nanopartículas magnéticas funcionalizadas con DEAE (fluidMAG-DEAE, Chemicell), empleadas en esta Tesis.



**Figura 69.** Mapa de la construcción que contiene la proteína de fusión CLyt-int-MBP en el plásmido pET. En azul se muestra la etiqueta de afinidad C-LytA, en rojo el segmento de inteína ( $\Delta$ I-CM) y en morado el segmento correspondiente a la proteína de unión a maltosa (MBP) (gentilmente cedido por el Dr. David Wood).

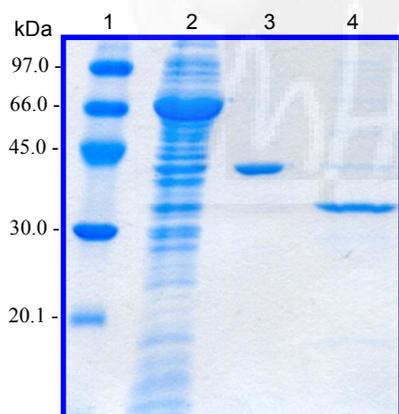
En un primer estudio la Figura 70 muestra la purificación de la CLyt-int-MBP en columna empleando como matriz la resina de DEAE-celulosa. Como se observa, partiendo de un extracto crudo se logra purificar la proteína de fusión por elución con colina 2 % (p/v) con una elevada pureza, empleando tampones a pH 8,5 para evitar la hidrólisis prematura de la proteína (Figura 70, carril 3). En un ensayo paralelo, y bajo las mismas condiciones experimentales, se promovió la ruptura de la proteína de fusión inmovilizada en la columna por incubación en tampón fosfato 20 mM pH 6,5 durante 24 horas a 30 °C. Ésto provocó la liberación de la proteína MBP, que fue eluida soluble de la columna (Figura 70, carril 4), manteniéndose el resto de la proteína unida a la matriz de DEAE-celulosa a través de la C-LytA. Este fragmento se recuperó posteriormente por adición a la columna de colina 2 % (p/v) (carril 5). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por el grupo de trabajo del Dr. Wood (comunicación personal).

En segundo lugar, prosiguiendo con nuestra intención de buscar nuevas utilidades y soportes novedosos, se ensayaron a este fin las nanopartículas magnéticas funcionalizadas con DEAE arriba mencionadas. Como se observa en la Figura 71 la obtención de proteína MBP pura de una manera rápida y eficaz es posible tras la incubación de la proteína de fusión inmovilizada en tampón a pH 6,5.



**Figura 70.** Análisis de la purificación de CLyt-int-MBP y de la MBP en columnas de DEAE- celulosa mediante SDS-PAGE.

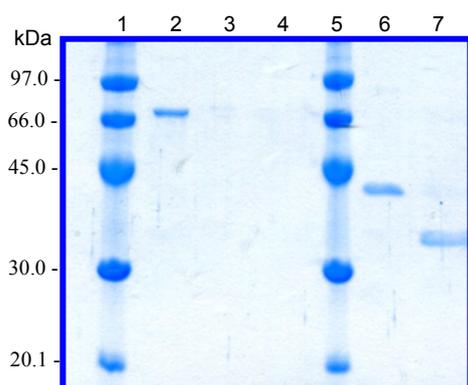
- 1, marcador de peso molecular
- 2, extracto soluble de partida (pET/BI-MBP)
- 3, fracción pura CLyt-int-MBP
- 4, ruptura y elución con tampón fosfato de sodio 20 mM pH 6,5, 30 °C, 24 h (MBP)
- 5, elución con colina 2 % (p/v) (CLyt-int)
- 6, marcador de peso molecular



**Figura 71.** Análisis por SDS-PAGE de la purificación de MBP utilizando nanopartículas magnéticas (fluidMAG-DEAE)

- 1, marcador de peso molecular
- 2, extracto soluble (pET/BI-MBP), CLyt-int-MBP
- 3, proteína MBP eluida con tampón fosfato de sodio 20 mM pH 6,5 (30 °C, 24 h)
- 4, partículas después de (3) (CLyt-int)

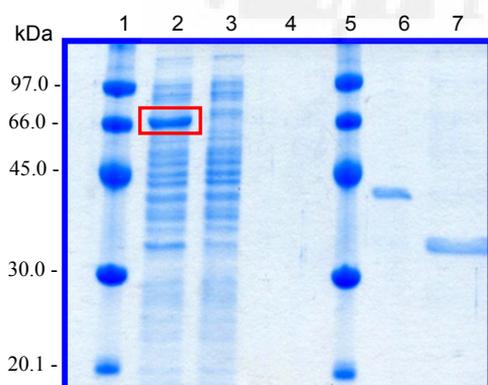
Con el fin de calcular el rendimiento teórico del sistema, en base a la cantidad de MBP recuperada, se aplicaron 250  $\mu\text{g}$  (3,37 nmoles) de CLyt-int-MBP pura a 5 mg de partículas magnéticas (Figura 72). La práctica totalidad de la proteína adicionada queda retenida tras el lavado en alta concentración de sal (carril 4), y la fracción proteica que se corresponde con la MBP se obtiene después de promover la ruptura a pH 6,5 con un rendimiento del  $90 \pm 6 \%$ .



**Figura 72.** Análisis por SDS-PAGE de la obtención de la proteína recombinante MBP, empleando CLyt-int-MBP y nanopartículas magnéticas.

- 1, marcador de peso molecular
- 2, fracción pura de CLyt-int-MBP
- 3, fracción no retenida en las nanopartículas
- 4, lavado 1,5 M NaCl
- 5, marcador de peso molecular
- 6, ruptura y elución con tampón fosfato 20 mM pH 6,5 (MBP)
- 7, elución con colina 2 % (p/v) (CLyt-int)

A continuación, se deseaba analizar el rendimiento y el grado de pureza de la MBP utilizando un extracto proteico que contenía CLyt-int-MBP a una concentración conocida. Para esto se utilizó como muestra de partida una matriz proteica que contenía 100  $\mu\text{g}$  (1,35 nmoles) de CLyt-int-MBP y 500  $\mu\text{g}$  de proteínas celulares de *E. coli* (BL21) no relacionadas con la proteína híbrida y se emplearon 10 mg de nanopartículas magnéticas. El extracto proteico se incubó con las nanopartículas magnéticas, quedándose retenida la mayoría de la proteína híbrida (Figura 73, carril 2 y 3). La Figura 73 muestra la fracción de proteína MBP obtenida (carril 6), con un alto grado de pureza, y un rendimiento del  $73 \pm 4 \%$ .



**Figura 73.** Análisis por SDS-PAGE de la obtención de proteína recombinante empleando nanopartículas magnéticas.

- 1, marcador de peso molecular
- 2, fracción proteica de partida (100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de CLyt-int-MBP y 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de proteínas celulares de *E. coli* (BL21).
- 3, fracción no retenida en las nanopartículas
- 4, lavado 1,5 M NaCl
- 5, marcador de peso molecular
- 6, ruptura y elución con tampón fosfato 20 mM pH 6,5 (MBP).
- 7, elución con colina 2 % (p/v) (CLyt-int).

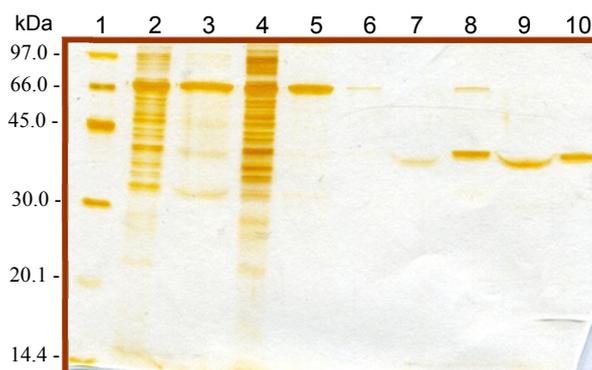
#### 2.4.2 Mejora biotecnológica del procedimiento de purificación de proteínas mediante C-LytA en sistemas acuosos de dos fases (ATPS)

La mayoría de las aplicaciones relacionadas con la utilización de las inteínas son en sistemas sólidos. En nuestra intención de buscar novedades de aplicación con C-LytA queremos combinar las inteínas con los ATPS teniendo en cuenta los buenos resultados que previamente ha obtenido

nuestro grupo en esta temática (ver Introducción). El objeto de este estudio es, utilizando la proteína modelo CLyt-int-MBP, lograr separar en una fase el segmento correspondiente a CLyt-int y en la otra a la proteína de interés. Para esto se ensayaron los sistemas acuosos de dos fases compuestos por: 1) polietilenglicol (PEG)/fosfato y 2) PEG/dextrano, desarrollados por Maestro y cols. (2008) para la purificación de proteínas recombinantes que contienen la etiqueta de afinidad C-LytA (ver Materiales y Métodos). Durante esta parte del trabajo y para evitar la distorsión en los geles de poliacrilamida causada por el PEG y el dextrano, las muestras analizadas se diluyeron (100 veces) y las bandas de proteínas se visualizaron mediante tinción con plata (Silver Stain Kit, Pierce®).

En primer lugar se empleó el sistema de dos fases compuesto por PEG/Fosfato pero el mismo generó mucha precipitación de las proteínas y casi toda la proteína de fusión se perdió en el primer paso de equilibrado (resultados no mostrados).

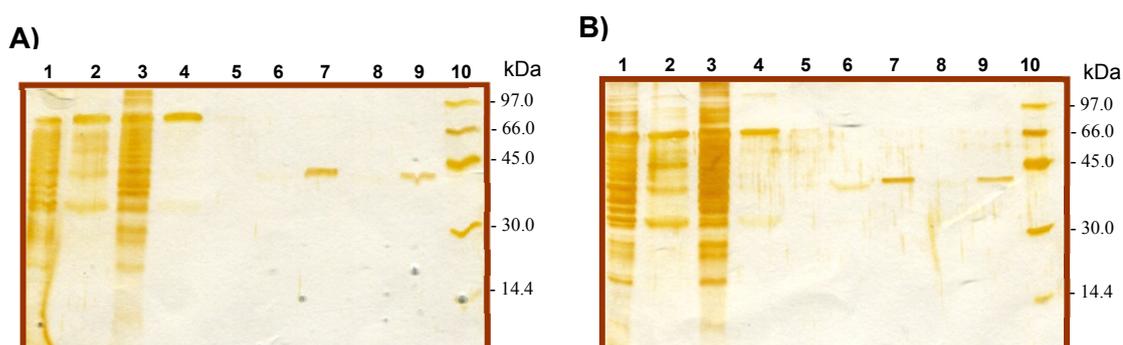
En una segunda aproximación se empleó el sistema compuesto por PEG/dextrano y un extracto proteico compuesto por 0,5 mg mL<sup>-1</sup> de CLyt-int-MBP y 1 mg mL<sup>-1</sup> de proteínas solubles de *E. coli* no relacionadas, en tampón-Tris 20 mM, pH 8,0 (Figura 74), emulando la purificación a partir de un extracto bacteriano. Tras mezclar y homogeneizar el extracto proteico con PEG-8000 6 % (p/v) más dextrano 6 % (p/v), las dos fases se generaron por centrifugación. La fase superior, rica en PEG, contenía mayoritariamente CLyt-int-MBP (carril 3), mientras que la fase inferior, rica en dextrano, contenía la mayoría de las proteínas contaminantes (carril 4). Este es un resultado esperable ya que se ha demostrado previamente que C-LytA posee gran afinidad por PEG en ausencia de colina (Maestro y cols., 2008). La fase superior se pasó a un tubo limpio y se lavó por dos ocasiones con igual volumen de una solución compuesta por 0,5 % PEG/ 16 % dextrano en tampón-Tris 20 mM, pH 8,0. Como resultado después de la centrifugación se obtuvo una fase superior (rica en PEG) que contenía CLyt-int-MBP de elevada pureza (Figura 74, carril 5). Tras la adición de una disolución correspondiente a la fase inferior - 0,5 % PEG/ 16 % dextrano (p/v) en tampón fosfato 20 mM, pH 6,5- se indujo la ruptura de la CLyt-int-MBP mediante tratamiento durante 24 horas a 30 °C, observándose la aparición de proteína pura tanto en la fase rica en dextrano como en la fase del PEG, y presentando una masa molecular compatible con la MBP (carriles 9 y 10). Es de resaltar que no se observó la existencia de C-LytA-int ni de CLyt-int-MBP sin digerir, aunque se detectó proteína precipitada en la interfaz que podría corresponder a estas dos especies. En una segunda variante, la colina (300 mM) promovió el paso de la MBP a la fase inferior, donde se observa también una banda que podría corresponder a CLyt-int-MBP sin digerir que puede haberse solubilizado parcialmente en presencia de colina (Figura 74, carril 8).



**Figura 74.** Análisis por SDS-PAGE de la separación y obtención de MBP en el sistema acuoso de dos fases PEG/dextrano.

- 1, marcador de peso molecular
- 2, fracción proteica de partida ( $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$  CLyt-int-MBP y  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  de proteínas celulares de *E. coli* (BL21))
- 3, equilibrado, fase superior (rica en PEG)
- 4, equilibrado, fase inferior (rica en dextrano)
- 5, lavado, fase superior (rica en PEG)
- 6, lavado, fase inferior (rica en dextrano)
- 7, elución/ruptura, fase superior (300 mM colina)
- 8, elución/ruptura, fase inferior (300 mM colina)
- 9, elución/ruptura, fase superior (pH 6,5)
- 10, elución/ruptura, fase inferior (pH 6,5)

Para comprobar si el efecto de la colina en la acumulación de MBP en la fase rica en dextrano era producto simplemente de un incremento en la fuerza iónica, se repitió el procedimiento anterior añadiendo en este caso KCl (300 y 1000 mM) en lugar de colina, y manteniendo el pH en 6,5. Adicionalmente, estos estudios se realizaron a 30 y 37 °C para analizar el efecto de la temperatura en el proceso de ruptura (Figura 75).



**Figura 75.** Análisis por SDS-PAGE de la separación y obtención de MBP en el sistema acuoso de dos fases PEG/dextrano. El tampón de elución/ruptura contiene: 0,5 % PEG/ 16 % dextrano (p/v) en tampón fosfato sódico 20 mM, pH 6,5 más 300 mM KCl (A) o 1000 mM KCl (B).

- |   |  |
|---|--|
| <ol style="list-style-type: none"> <li>1, fracción proteica de partida</li> <li>2, equilibrado, fase superior (rica en PEG)</li> <li>3, equilibrado, fase inferior (rica en dextrano)</li> <li>4, lavado, fase superior (rica en PEG)</li> <li>5, lavado, fase inferior (rica en dextrano)</li> </ol> | <ol style="list-style-type: none"> <li>6, elución/ruptura, fase superior (30 °C)</li> <li>7, elución/ruptura, fase inferior (30 °C)</li> <li>8, elución/ruptura, fase superior (37 °C)</li> <li>9, elución/ruptura, fase inferior (37 °C)</li> <li>10, marcador de peso molecular</li> </ol> |
|---|--|

Bajo las condiciones estudiadas de elución/ruptura se logró la hidrólisis de la proteína de fusión y el paso de la fase rica en PEG a la fase inferior rica en dextrano (Figura 75, carriles 6-9). Los mejores resultados se obtuvieron cuando el tampón de ruptura contenía 300 mM de KCl y cuando la incubación se realizó a 30 °C (carril 7, A). De esta manera, nos evitamos el uso de colina que nos puede solubilizar proteínas indeseadas como el fragmento de CLyt-int y la CLyt-int-MBP sin digerir. El sistema propuesto demostró ser muy efectivo para separar y obtener fracciones de proteína recombinante, en este caso MBP, de una elevada pureza. El rendimiento global de este sistema, en porcentaje de MBP recuperada, fue de  $31 \pm 1$  %.



*Capítulo V*

**DISCUSIÓN**

UNIVERSITAS

Miguel

Hernández



El reto principal relacionado con los sistemas de inmovilización de proteínas para aplicaciones biotecnológicas, como por ejemplo el desarrollo de biorreactores y biosensores, continúa siendo el lograr que la proteína se una de manera estable a la superficie o soporte de inmovilización reteniendo la mayor parte de su actividad biológica.

Dentro de las estrategias de inmovilización, los métodos no covalentes tienen importantes ventajas: son procedimientos suaves, no requieren la modificación química de la proteína, disminuyendo así el riesgo de pérdida de actividad y/o desnaturalización, y son métodos en la mayoría de los casos reversibles, lo que permite la reutilización de las superficies y soportes de inmovilización. Adicionalmente, la utilización de polipéptidos de afinidad suplementa el grado de especificidad necesario del que carecen muchos métodos de adsorción puramente físicos, al dirigir u orientar la inmovilización de la proteína a través de interacciones de afinidad entre la etiqueta y el soporte de inmovilización.

En el presente trabajo se evalúa el papel de dos etiquetas de afinidad, BioF y C-LytA, en diferentes aplicaciones biotecnológicas como son la construcción de plásticos bioactivos, electrodos enzimáticos, el desarrollo de biorreactores enzimáticos y el desarrollo de métodos eficientes para la purificación de proteína recombinante. El objetivo último es el de conferir a estas etiquetas nuevas propiedades que incrementen su valor añadido y amplíen su competitividad frente a otras sistemas comerciales similares.

## 1. DOMINIO DE UNIÓN A BIOPLÁSTICOS

### 1.1 Caracterización de la interacción BioF-polihidroxicanoatos comerciales (PHB)

La capacidad de la fase PhaF de *Pseudomonas putida* y de varias proteínas recombinantes fusionadas a la etiqueta de afinidad BioF para unirse *in vivo* a gránulos nativos de polihidroxiocanoato (PHO), un polihidroxicanoato de cadena media es un hecho bien descrito (Prieto y cols., 1999; Moldes y cols., 2004, 2006). Los gránulos nativos de PHO que contenían las proteínas recombinantes adsorbidas eran recuperados tras la ruptura celular por simple centrifugación (Moldes y cols., 2004, 2006). De esta forma, por ejemplo, en lo que constituye la primera aportación biotecnológica descrita de esta etiqueta, se produjeron gránulos nativos de PHO que contenían inmovilizada a través del BioF una variante de la toxina Cry1Ab para el control de *Sesamia nonagrioides*. Esto demostró la posibilidad de utilizar este procedimiento como

herramienta para la inmovilización de proteínas activas en soportes sostenibles y biodegradables (Moldes y cols., 2006).

A pesar de estas indudables ventajas y del gran potencial biotecnológico de esta etiqueta, la misma se encuentra aún lejos de ser utilizada con frecuencia en procesos de inmovilización de proteínas. En primer lugar se encuentra la dificultad para conocer y poder controlar la cantidad de proteína inmovilizada en los gránulos nativos de PHO. Adicionalmente, el entorno *in vivo* puede propiciar el desarrollo de procesos de inactivación y degradación proteolítica de las proteínas inmovilizadas. Por otro lado, la adsorción a gránulos de PHO *in vitro* choca con la desventaja de la inaccesibilidad comercial de este polímero en la actualidad. Por este motivo, decidimos comprobar la bondad del sistema frente a otro polihidroxicanoato relacionado, el poli-3-hidroxi-butarato (PHB), un bioplástico comercial de cadena corta que representa en la actualidad el bioplástico del tipo de los PHAs más producido y de mayor disponibilidad comercial (Somleva y cols., 2013). Para ello nos propusimos estudiar la estabilidad de la unión *in vitro* de la fasina PhaF y de una proteína recombinante con la etiqueta BioF (proteína FLYt) a este polímero, así como comprobar la capacidad del mismo para la construcción de soportes bioactivos con dos enzimas ( $\beta$ -galactosidasa y la lacasa bacteriana CueO).

Todas las proteínas estudiadas fueron capaces de unirse a diferentes preparaciones de PHB comercial, en lo que constituye un resultado doblemente novedoso. En primer lugar, este resultado demuestra que la unión de este dominio no estaba restringida sólo a PHAs de cadena media (octanoato, undecanoato, etc), sustratos naturales de las fasinas PhaF y PhaI (Prieto y cols., 1999), sino también a variantes comerciales de PHAs de cadena corta. Además, también se comprobó que la etiqueta BioF era capaz de unirse *in vitro* a gránulos de PHB sin su cubierta proteolipídica natural (Figuras 14, 15, 19, 24 y 30), resultando además que la unión es más resistente a detergentes que en el caso del gránulo recubierto con agentes hidrofóbicos emuladores de su composición natural (ácido oleico o fosfolípidos) (Figura 14). Estos dos hallazgos posibilitan la ampliación del uso del BioF como etiqueta de afinidad para la inmovilización de proteínas tanto en formulaciones muy diversas de PHAs naturales como en formas químicamente modificadas de los PHAs, sin la capa proteolipídica, con una amplia posibilidad de diferentes propiedades físico-químicas.

Recientemente ha sido publicado un modelo tridimensional de la fasina PhaF y su interacción con polihidroxicanoatos, según la cual la interacción de su región amino-terminal (equivalente al BioF en nuestro caso) con el polímero tendría lugar gracias a la conformación de esta zona en forma de una larga hélice alfa anfipática, que mostraría su cara polar hacia el disolvente y la cara apolar

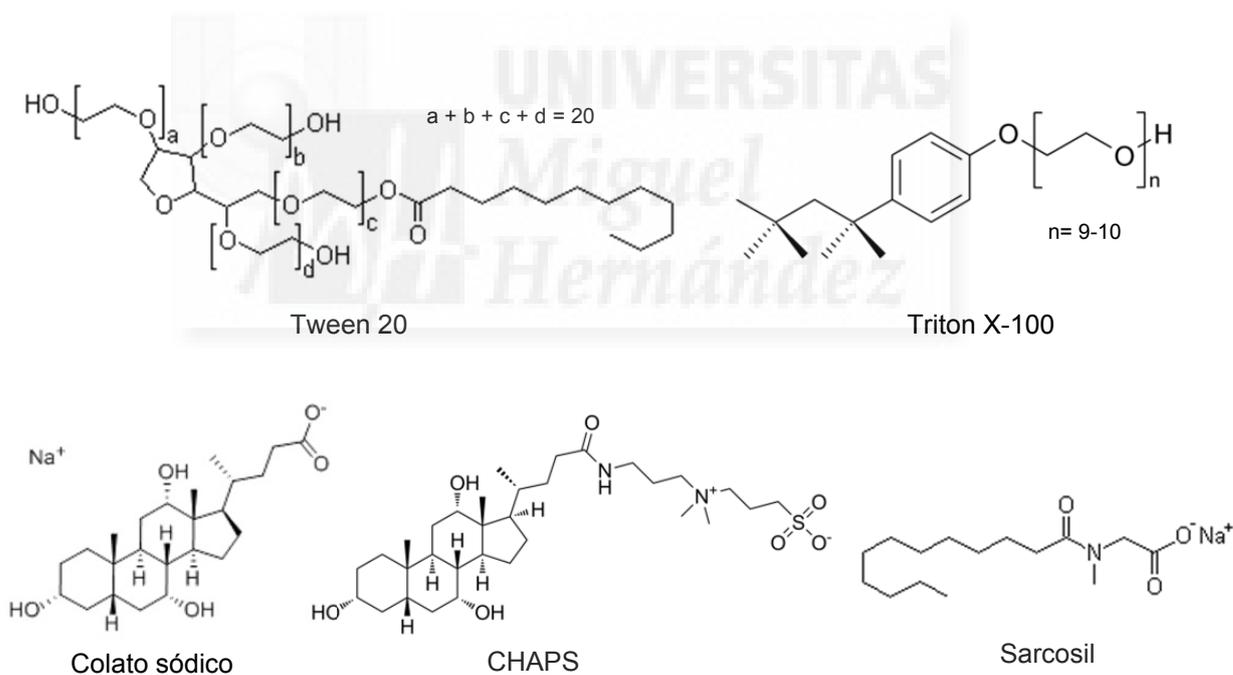
hacia el gránulo (Maestro y cols., 2013, Figura 7). Debido a la naturaleza anfipática de la hélice, el modelo prevé que la misma se situaría de manera paralela a la superficie del gránulo, ya que una entrada más profunda estaría penalizada por la necesidad de enterrar cadenas laterales polares, muchas de ellas cargadas, en el interior hidrofóbico del gránulo. Parece razonable entonces pensar que las moléculas hidrofóbicas lipídicas utilizadas para recubrir el PHB formen una fina capa alrededor del polímero, estableciendo interacciones débiles superficiales con BioF y dificultando (ácido oleico, Figura 14B) o prácticamente impidiendo (Figura 14C) que la etiqueta entre en contacto con el núcleo polimérico, donde podría establecer interacciones más fuertes con las unidades monoméricas del mismo, resultando por lo tanto en estos casos ser más susceptible a la elución por detergentes.

Una posible aplicación biotecnológica de este resultado es el de poder modular racionalmente la fortaleza de la adsorción de proteínas fusionadas a BioF eligiendo un determinado recubrimiento hidrofóbico del plástico, dependiendo de si se busca una adsorción más o menos estable. En este mismo sentido, también podría aprovecharse para este fin la circunstancia de que la unión al látex de PHO es menos fuerte que a los gránulos de PHB (Figuras 17 y 22), por lo que los plásticos de cadena medio-larga también podrían emplearse en procesos de liberación controlada de proteínas recombinantes al medio.

En lo que respecta al efecto de los detergentes se encontró que el Sarcosil 3 % (p/v) es el único realmente efectivo para eluir PhaF del PHB deslipidizado (Figura 14A). Además del Sarcosil tan sólo Tween-20 al 1 % (p/v) es capaz de eluir la proteína en estas condiciones, si bien con mucho menor rendimiento (Figura 14A). La adición de ácido oleico al gránulo de PHB permite un mayor efecto eluyente del Tween-20 y un cierto efecto positivo del Triton X-100 (1 %, v/v) (Figura 14B), mientras que el recubrimiento con fosfolípidos facilita que prácticamente todos los detergentes, con la excepción del CHAPS al 3 % (p/v), eluyan la proteína en mayor o menor grado (Figura 14C). En cualquier caso, no hay que descartar una influencia adicional producida por la secuencia polipeptídica unida a BioF. Así, mientras que con PhaF el CHAPS es ineficiente, la proteína FLyt se eluye del plástico con bastante eficiencia en presencia de CHAPS incluso desde el gránulo deslipidizado (Figura 20). Con relación a este resultado, Moldes y colaboradores (2004) estudiaron la liberación de FLyt y BioF-βgal de gránulos nativos de PHO por tratamiento con diferentes detergentes. Como resultado principal y en concordancia con los resultados obtenidos en el presente estudio, el Sarcosil fue de nuevo el más efectivo liberando el 98 % de las proteínas FLyt y BioF-

βgal inmovilizadas en los gránulos nativos de PHO mientras que el CHAPS logró eluir un 71% de la FLyt inmovilizada (Moldes y cols. 2004).

Aunque, como se ha dicho, existen diferencias mostradas por los diferentes detergentes a la hora de debilitar las interacciones de afinidad entre el BioF y el bioplástico, el Sarcosil parece comportarse como el "eluyente universal" de estos sistemas independientemente del polipéptido unido a la secuencia BioF. Comparado con el resto de los detergentes utilizados (Figura 76), el Sarcosil es la molécula más pequeña y lineal de todas, con una cadena hidrocarbonada apolar que tal vez tenga la geometría más adecuada para interponerse mejor entre la hélice anfipática predicha para el péptido BioF y la superficie del gránulo, debilitando la interacción proteína-bioplástico y provocando la elución de la primera. En este sentido, Maestro y cols. (2013) han comprobado y analizado recientemente mediante técnicas de dicroísmo circular la interacción entre otra molécula lineal y apolar como es el ácido oleico y la fasina PhaF, observándose que el primero se une efectivamente a la segunda induciendo un incremento en su contenido α-helicoidal.



**Figura 76.** Estructura de los detergentes empleados para eluir la fasina PhaF del bioplástico PHB.

Las proteínas PhaF y FLyt mostraron, en experimentos realizados a temperaturas moderadamente altas (37 °C) y tiempos largos de incubación (48 h), ciertos signos de degradación. La falta de estructura terciaria predicha para la secuencia BioF (Figura 7; Maestro y cols., 2013) hace que la conexión entre BioF y el polipéptido fusionado pueda ser en principio especialmente accesible a proteasas. No obstante, tales degradaciones se reducen al mínimo o incluso desaparecen

cuando las proteínas se inmovilizan en el plástico (Figuras 15 y 19) demostrándose un efecto estabilizador de éste que posibilita el empleo de complejos proteína-PHA en tiempos largos (ver más abajo). Este efecto de estabilización también se observó cuando PhaF y FLyt se encontraban unidas a PHO preparado en forma de látex (Figuras 17 y 22) y tal vez podría extrapolarse a todo tipo de PHAs. Por otro lado, también se estudió la influencia del pH y la temperatura de incubación en la estabilidad de la unión. PhaF y FLyt se unen al PHB de manera estable a 37 °C durante, al menos, 24 h de incubación a los distintos valores de pH ensayados (entre 2 y 9) (Figuras 16 y 21).

En resumen, la inmovilización de proteínas en bioplásticos del tipo de los PHAs a través del BioF, aumentó el tiempo de vida media de las proteínas ensayadas, permitiendo que las mismas ganen en estabilidad en una amplia cantidad de condiciones.

## **1.2 Polihidroxicanoatos bioactivos como biorreactores enzimáticos: ensayo y aplicación sobre biodegradación de colorantes de la industria textil**

Hasta la fecha, las mayores aplicaciones de los PHAs han consistido en su empleo industrial como meros materiales contenedores, o bien, a nivel más experimental y en determinadas ocasiones, han podido ser funcionalizados con ligandos peptídicos capaces de dirigir nanopartículas de PHAs a determinadas células que expresaran un receptor de tales ligandos en procedimientos de distribución de fármacos ("*drug delivery*") (Lu y cols., 2011). La construcción de polihidroxicanoatos bioactivos mediante inmovilización de enzimas que aproveche las características de sostenibilidad, biodegradabilidad y regenerabilidad que pueden aportar estos polímeros, a pesar de su elevado potencial biotecnológico, no constituye todavía una tecnología suficientemente extendida a nivel de laboratorio ni mucho menos a nivel industrial (Ihssen y cols., 2009). Mientras que el relativamente elevado precio de estos bioplásticos comparado con otro tipo de materiales puede ser una razón, también es cierto que muy pocos estudios se han publicado que incidan en la caracterización de la actividad enzimática inmovilizada en estos soportes (Deepak y cols., 2009; Rasiah y Rehm, 2009). Así pues, nos propusimos demostrar la aplicabilidad de los PHAs en cuanto a la construcción de biorreactores enzimáticos competentes, de manera que se le pudiera conferir un nuevo valor añadido a estos biopolímeros y a la etiqueta de afinidad BioF, y a tal fin elegimos en primer lugar la inmovilización en PHB de una fusión de BioF con la  $\beta$ -galactosidasa como prueba de concepto, para posteriormente realizar un estudio sobre biodegradación de contaminantes en aguas residuales mediante la inmovilización de la lacasa CueO.

Los ensayos con la enzima BioF- $\beta$ gal unida PHB resultaron plenamente satisfactorios. Gránulos de PHB con BioF- $\beta$ gal inmovilizada mostraron una actividad galactosidasa estable sobre el sustrato sintético ONPG durante 16 ciclos continuos de reacción y lavado, realizados a 25 °C, permitiendo la reutilización de la enzima y el soporte (Figura 24). Estos resultados apoyan la potencialidad del BioF para la inmovilización de enzimas de interés biotecnológico en bioplásticos comerciales sin menoscabo de sus propiedades cinéticas.

A continuación, como aplicación más directa de nuestros resultados elegimos afrontar un problema medioambiental de interés. En la actualidad, el uso industrial generalizado de colorantes sintéticos genera una importante fuente de contaminación medioambiental a nivel mundial. Una de las industrias que más contribuye a esto por las grandes cantidades de colorantes y los grandes volúmenes de agua que utiliza es la industria textil (Verna y cols., 2012; Zaharia y Suteu, 2012). Las aguas residuales de esta actividad van cargadas de remanentes de colorantes sintéticos de estructura compleja, de difícil degradación y que aportan colores intensos a los cursos de agua donde son vertidos, afectando de manera significativa a la flora y la fauna acuáticas. Además, estas estructuras recalcitrantes tienen probados efectos tóxicos, mutagénicos y teratogénicos, que afectan a una gran variedad de peces y puede crear serios problemas de salud en poblaciones cercanas a este tipo de industria (Verna y cols., 2012; Zaharia y Suteu, 2012).

Para abordar esta problemática y en especial la relacionada con el intenso color de las aguas residuales provenientes de esta industria en el presente trabajo se estudia la degradación de varios colorantes sintéticos haciendo uso de la lacasa bacteriana CueO (Grass y Rensing, 2001), inmovilizada en PHB a través de la etiqueta BioF. La amplia especificidad de sustrato de las lacasas permite que sean utilizadas para oxidar/degradar una gran variedad de estructuras recalcitrantes complejas, incluyendo: poli-fenoles, poli-aminas, amino-fenoles, hidrocarburos aromáticos policíclicos, colorantes sintéticos, pesticidas (Majeau y cols., 2010). La utilización de lacasas para la oxidación de colorantes sintéticos ha sido extensamente revisada en varios trabajos (Wesenberg y cols., 2003; Majeau y cols., 2010) y en concreto se han descrito como sustratos de estas enzimas varios de los colorantes que forman parte de nuestro trabajo (Tabla 6). Así, se han descrito procedimientos de degradación del compuesto RB19, por acción de lacasas fúngicas (Claus y cols., 2002; Camarero y cols., 2005; Champagne y Ramsay, 2007) y de origen procariótico (Dubé y cols., 2008; Lu y cols., 2012); RB5, en presencia de lacasas fúngicas (Roriz y cols., 2009; Zeng y cols., 2011b) y bacterianas (Dubé y cols., 2008; Lu y cols., 2012); NC, mediante la utilización también de lacasas fúngicas y bacterianas (Murugesan y cols., 2006; Moya y cols., 2010; Wang y cols., 2012b)

y por último el IC, que ha sido uno de los colorantes azo-derivados más utilizados para estudiar la capacidad de decoloración *in vivo* o *in vitro* de las lacasas (Campos y cols., 2001; Dubé y cols., 2008; Cho y cols., 2011).

Una parte de estos estudios se han realizado con enzimas libres (Molina-Guijarro y cols., 2009; Pereira y cols., 2009; Fang y cols., 2011), pero la parte mayoritaria de los mismos se han realizado *in vivo*, con microorganismos completos (Cho y cols., 2011; Lu y cols., 2012; Wang y cols., 2012b) e incluso en esporas (Majeau y cols., 2010), si bien se han descrito limitaciones relacionadas con la transferencia de masa, lo que limita su aplicación práctica (Wang y cols., 2012b). Nuestra aproximación pretende aumentar las posibilidades de esta conocida capacidad degradativa de colorantes por parte de las lacasas mediante su inmovilización en un soporte sostenible y respetuoso con el medio ambiente como son los polihidroxicanoatos, con vistas a la construcción en un futuro de biorreactores enzimáticos que resuelvan las limitaciones de transferencia de masa inherentes al empleo de organismos vivos, a la par que se incrementa el valor añadido de los PHAs gracias a este tipo de aplicaciones.

En el caso concreto de la lacasa bacteriana CueO se ha descrito que esta enzima puede oxidar *in vitro* hidrocarburos policíclicos aromáticos. CueO puede catalizar la oxidación, por ejemplo del antraceno y benzo[*a*]pireno en el mismo grado que la lacasa fúngica de *Trametes versicolor* (Zeng y cols., 2011a). Sin embargo, hasta el momento no se ha descrito su utilización (libre o inmovilizada) para degradar colorantes sintéticos de estructura compleja, lo cual es un resultado novedoso del presente trabajo.

Como primer resultado encontramos que el colorante *Azure B* se adsorbió casi totalmente al PHB en ausencia de enzima inmovilizada, produciéndose de esta forma disminuciones de color que superaron el 90 % durante 24 h de incubación (Figura 32). En este sentido se ha descrito que la naturaleza hidrofóbica de los PHAs puede ser utilizada como estrategia para adsorber algunos colorantes sintéticos empleados en la industria textil en estos bioplásticos (Sudesh y cols., 2007, 2011), como el verde malaquita (Sridewi y cols., 2011).

El resto de los colorantes no se adsorbieron en el PHB o lo hicieron de manera parcial, constituyendo los sustratos ideales para comprobar el alcance de nuestra aproximación. Con relación a esto se sobreexpresó y purificó la proteína de fusión recombinante BioF-CueO, la cual fue capaz de degradar la estructura de varios colorantes produciendo importantes disminuciones de color (Tabla 6). En general, CueO fue capaz de degradar tanto colorantes con antraquinonas en su estructura (CB, RB19) (Figura 33) como estructuras de colorantes sintéticos azo-derivados (IC, NC,

RB5) (Figura 34), obteniéndose los mayores porcentajes y eficiencias de decoloración para éstos últimos. En concordancia con lo revisado por Majeau y colaboradores (2010), donde se describen lacasas (fúngicas y bacterianas) capaces de degradar preferentemente las estructuras de los colorantes sintéticos azo-derivados, la propia enzima BioF-CueO libre actúa con mucho mayor rendimiento sobre éste último tipo de compuestos (Figuras 34 y 35). No obstante, la decoloración de los derivados de antraquinonas se vio adicionalmente favorecida por la capacidad del PHB de adsorber por sí mismo estos compuestos parcialmente.

Un hecho llamativo se da en el caso de los colorantes azo-derivados. Mientras que a tiempos más cortos la actividad de la enzima libre es superior a la de la enzima inmovilizada, a largo plazo la actividad de ésta última le supera con creces (Figura 34). Una posible explicación a este fenómeno es que la accesibilidad del sustrato es naturalmente mayor a la enzima soluble que a la inmovilizada, donde pueden existir impedimentos de transferencia de masa, por lo que inicialmente la enzima soluble es más activa. Sin embargo, a largo plazo la enzima soluble puede plantear problemas de desactivación y degradación que se reducen sustancialmente tras la unión al bioplástico (Figura 34), de manera que la enzima inmovilizada termina siendo más efectiva tras tiempos largos de incubación.

Resulta importante destacar que en el caso del colorante RB5 la degradación enzimática del colorante produjo un cambio en el espectro de absorción UV-visible de la solución que lo contenía (Figura 35). Esto puede deberse a la degradación parcial en el tiempo de la estructura del colorante. Un resultado similar fue descrito por Mohorčič y cols. (2004) utilizando el hongo *Bjerkandera adusta*.

En el caso específico de colorantes derivados de la antraquinona como el CB, en general hay poca información sobre la degradación de este compuesto por enzimas con actividad lacasa. Se ha descrito que el hongo de podredumbre blanca *Coprinus cinereus* (Moutaouakkil y Blaghen, 2011) y un extracto crudo de la lacasa de *Trametes sp.* AH28-2 (Sun y cols., 2009) son capaces de degradar la estructura del cibacron azul, pero no hay descritos estudios de degradación de este colorante por lacasas purificadas como la CueO.

Por último, evaluamos la capacidad de nuestros biorreactores enzimáticos para ser reutilizados después de cada lote de colorante degradado, eligiendo el Índigo carmín (IC) como prueba de concepto. Con este compuesto se consiguió una eliminación casi total del color tras 20 horas de incubación con la enzima a 25 °C (Figuras 34 y 35). Después de la separación de los productos y el lavado de los gránulos de PHB funcionalizados, la enzima inmovilizada fue reutilizada durante

otros tres ciclos continuos de decoloración (Figura 36). Durante los tres primeros ciclos la enzima mantuvo intacta su actividad, obteniéndose porcentajes de disminución de color muy similares en cada ciclo. Esta posibilidad de poder reutilizar la enzima inmovilizada constituye un importante resultado en favor del uso de este tipo de biorreactores reutilizables para la decoloración de estos compuestos.

En resumen, el sistema propuesto de inmovilización de la lacasa bacteriana CueO en bioplásticos sostenibles a través de interacciones de afinidad con el BioF es novedoso y ha permitido obtener porcentajes y velocidades de decoloración superiores a las que se obtuvieron para la enzima libre. Se demostró que el procedimiento de inmovilización beneficia la estabilidad de la enzima, permitiendo así su reutilización continua. Esto abre el camino para el desarrollo de biorreactores enzimáticos sostenibles para la decoloración de colorantes sintéticos de todo tipo, particularmente azo-derivados.

## 2. DOMINIO DE UNIÓN A COLINA

La afinidad del dominio de unión a colina de la autolisina LytA (C-LytA) de *S. pneumoniae* por colina y análogos estructurales de la misma (aminas terciarias y cuaternarias) (Sanz y cols., 1988), ha permitido poner a punto un sistema eficaz de purificación de proteínas recombinantes fusionadas a C-LytA (Sánchez-Puelles y cols., 1992). Desde entonces, el sistema ha sido ampliamente desarrollado en el laboratorio y se encuentra comercializado (Biomedal S.L., Sevilla; <http://www.biomedal.com>). Con el objetivo de ampliar sus aplicaciones biotecnológicas, en el presente trabajo se estudia la inmovilización de enzimas fusionadas a C-LytA sobre diferentes soportes y superficies funcionalizadas.

### 2.1 Desarrollo de electrodos enzimáticos

Las demandas actuales de sensibilidad, especificidad, velocidad y precisión en los métodos analíticos han estimulado considerablemente el desarrollo de los sensores bioquímicos. En el diseño de electrodos y biosensores enzimáticos, y con el propósito de mejorar su desempeño y vida media, la tecnología de inmovilización de las enzimas es en la actualidad un campo en continua investigación. La integración exitosa de enzimas y electrodos debe asegurar una eficiente y estable inmovilización de la enzima y además una comunicación directa entre el centro activo de la enzima y la superficie del electrodo. En este sentido, las interacciones bioquímicas por afinidad ofrecen un tipo de inmovilización suave, orientada y reversible de enzimas, lo cual dota a esta estrategia de

ventajas importantes sobre otros métodos de inmovilización para el desarrollo de electrodos enzimáticos regenerables y reutilizables.

Hasta el momento, la etiqueta de seis histidinas (*His-tag*), ha sido el polipéptido de afinidad más comúnmente utilizado para la inmovilización de proteínas a electrodos (Ley y cols., 2011; Schröper y cols., 2012). Sin embargo, este sistema no es tan específico como otros sistemas de afinidad (Waugh, 2005), y la utilización de agentes quelantes y agentes reductores son incompatibles con esta metodología. Adicionalmente, las aminas y los detergentes aniónicos han sido descritas como interferencias comunes cuando se utiliza este sistema para la inmovilización de proteínas. La utilización de otros sistemas basados en interacciones de afinidad ha sido descrita recientemente por el grupo del Prof. Pingarrón y sus colaboradores, para el desarrollo de inmunosensores electroquímicos de alta sensibilidad para la detección de prolactina (Moreno-Guzmán y cols., 2011), adenocorticotrofina (Moreno-Guzmán y cols., 2012) y el factor de crecimiento humano (Serafín y cols., 2012).

Por su parte, para la funcionalización de superficies de carbono útiles como electrodos, el método de modificación química por reducción electroquímica de sales de diazonio ha sido ampliamente estudiado (Allongue y cols., 1997; Delamar y cols., 1997; Moreno-Guzmán y cols., 2012). Este tipo de modificación logra la formación de un enlace estable (covalente) entre la estructura carbonada y la sal de diazonio. De esta forma se pueden introducir grupos funcionales, que quedarán expuestos en la superficie de la estructura carbonada y que pueden ser aprovechados para la inmovilización de proteínas (Moreno-Guzmán y cols., 2012).

Con ésto en mente, junto con la versatilidad ya demostrada por la etiqueta de afinidad C-LytA, se ha desarrollado un sistema que combina la modificación (vía sal de diazonio) y funcionalización de electrodos de grafito con análogos de colina (Figura 38) y la inmovilización específica y reversible de enzimas a estos electrodos modificados a través de C-LytA (Figura 39).

El sistema propuesto para el desarrollo de electrodos enzimáticos fue inicialmente ensayado utilizando la enzima de *E. coli*  $\beta$ -galactosidasa. Previamente se ha descrito la utilización del dominio de unión a colina C-LytA para la inmovilización de la enzima  $\beta$ -galactosidasa a electrodos de oro modificados con mococapas autoensambladas (SAM) de ácido tio-carboxílico y funcionalizados con colina (Madoz y cols., 1997). En el presente estudio se emplearon electrodos de grafito que previamente fueron modificados covalentemente por reducción electroquímica de la sal de diazonio del ácido 4-aminofenil acético (APA) y funcionalizados con el análogo de la colina di-etil-etilendiamina (DEAEA) (Figura 38). La utilización del grafito resulta particularmente

ventajosa con respecto al oro, ya que presenta unas buenas propiedades electroquímicas, y se encuentra en elevada disponibilidad y bajo coste, por lo que es considerado como un material muy atractivo para el desarrollo de electrodos enzimáticos y biosensores. Además, la mayor área de intercambio del electrodo de grafito en comparación con el electrodo de oro, determina una mayor respuesta amperométrica. Por otro lado, en el caso del trabajo desarrollado por Madoz y cols. (1997) la modificación del electrodo se hizo por adsorción del ácido tiocarboxílico, un método físico que pudiera comprometer la estabilidad de la SAM adsorbida sobre la superficie del electrodo en el tiempo, ya que otros grupos tiólicos o, en general, donadores de pares de electrones solitarios, pueden desplazar al análogo tiólico de la superficie áurea. Además, los tioles son susceptibles a la oxidación por oxígeno, ya sea expuestos al aire o en disolución acuosa (Hermanson, 2008). Contrariamente, en la estrategia utilizada en el presente estudio los grupos funcionales expuestos en el electrodo de grafito están unidos a la superficie por interacciones de tipo covalente, lo que pudiera garantizar una mayor estabilidad de estos electrodos con respecto a los de oro.

El sistema de afinidad propuesto para lograr la inmovilización orientada de enzimas en electrodos de grafito funcionalizados con análogos de colina (DEAEA) es específico (Figuras 40 y 41). Por una parte, el control de unión no específica con la proteína  $\beta$ -galactosidasa produjo una señal de interacción con el electrodo casi despreciable en comparación con la señal obtenida para la proteína híbrida (Figura 40), mientras que por el otro lado la unión de la CLyt- $\beta$ gal al electrodo funcionalizado de grafito se logró inhibir por incubación del electrodo con colina (Figura 41A), la cual compite por los sitios de unión a colina presentes en el módulo C-LytA, mientras que la proteína híbrida se mantenía inmovilizada establemente en el electrodo en presencia de 1 M NaCl (Figura 41B). Estos datos demuestran claramente que la etiqueta de afinidad C-LytA dirige de manera específica la interacción entre la proteína de fusión y la superficie funcionalizada del electrodo.

El sistema de inmovilización es reversible, ya que la enzima inmovilizada puede eluirse del electrodo por competencia con colina (Figura 41C), pudiendo volverse a inmovilizar proteína de fusión, aunque sin alcanzar el 100 % de la actividad inicial (Figura 41D). Una pequeña porción de la proteína queda retenida en el electrodo de grafito tras la elución con colina, lo cual es consistente con el resultado previo donde se encontró que una pequeña cantidad de la  $\beta$ -galactosidasa libre se retiene en la superficie del electrodo por interacciones no específicas (Figura 40). Estos resultados demuestran que los electrodos de grafito desarrollados en este estudio pueden ser reutilizados después de ser lavados con colina y recargados con una solución fresca de la proteína, y están en

concordancia con los obtenidos por Madoz y cols. (1997) utilizando electrodos de oro, aunque en ese estudio se logró obtener una completa reversibilidad del proceso. Como objetivo de próximas investigaciones se tratará de minimizar la unión inespecífica de proteína al electrodo para de esta forma lograr regenerar el 100 % de la actividad de los mismos.

La respuesta amperométrica de CLyt- $\beta$ gal inmovilizada en el electrodo de grafito sigue una cinética típica de Michaelis-Menten a concentraciones crecientes del sustrato PAPG (Figura 42), con una  $K_m$  aparente de  $1,0 \pm 0,3$  mM. Este dato es casi cinco veces superior al reportado para la enzima libre (Mássen y cols., 1995) y casi el doble del valor obtenido para la  $\beta$ -galactosidasa inmovilizada en electrodos de oro (Madoz y cols., 1997), lo cual puede ser debido a que la enzima haya sufrido algún cambio estructural o, más probablemente, a problemas de difusión del sustrato (transferencia de masa).

Uno de los estudios más importantes a realizar durante el desarrollo de un electrodo enzimático y de un biosensor, tiene que ver con la evaluación de la estabilidad del sistema y su posibilidad de reutilización. Es fundamental conocer cuánto tiempo el sistema puede operar rindiendo una respuesta reproducible. En primer lugar, el sistema propuesto en este trabajo comprende la modificación de la superficie del electrodo por reducción (vía VC) de la sal de diazonio del APA, generando de esta forma enlaces covalentes (C-C) en la superficie del electrodo de grafito que aportan una estabilidad intrínseca al sistema. De hecho, no se observa desorción de la monocapa auto-ensamblada sobre la superficie de grafito, al menos, después de siete días de almacenamiento de los electrodos funcionalizados a 4 °C (Figura 43). En relación con esto, Madoz y cols. (1997), también encontraron que las monocapas auto-ensambladas sobre los electrodos de oro eran estables en circunstancias similares.

Una vez que se comprobó, haciendo uso de la  $\beta$ -galactosidasa, que era posible el desarrollo de electrodos enzimáticos específicos, estables y reversibles empleando la etiqueta de afinidad C-LytA, se deseaba confirmar el resultado haciendo uso de una enzima con aplicación práctica en el desarrollo de biosensores enzimáticos, y que además permitiera determinar si es posible en este sistema la comunicación directa entre la enzima redox y el electrodo. Tradicionalmente, en el desarrollo de electrodos y biosensores enzimáticos se han utilizado mediadores solubles pequeños para facilitar dicha comunicación. Sin embargo, con mucha frecuencia estos mediadores participan en reacciones colaterales que pueden causar resultados erróneos en la detección y cuantificación de determinados analitos, lo que intenta evitarse mediante el desarrollo de métodos que permitan la transferencia directa de electrones del centro redox de la enzima al electrodo (Wollenberger y cols.,

2008). Una manera de conseguirlo es modulando la orientación del centro activo de la enzima y la distancia del mismo a la superficie del electrodo. En este sentido la estructura alargada, tipo solenoide del módulo C-LytA (Fernández-Tornero y cols., 2001) resulta, en teoría, apropiada para unir las moléculas de DEAEA en el electrodo de modo tal que la proteína quede situada en paralelo y muy cerca de la superficie del electrodo.

En este caso se eligió la D-aminoácido oxidasa (DAO) de *Rhodotorula gracilis* como enzima inmovilizable de interés biotecnológico puesto que cataliza una reacción estereoespecífica selectiva que permite la detección de D-aminoácidos (Pollegioni y cols., 1992; Li y Zhang, 2000). La presencia de D-aminoácidos en muestras biológicas se relaciona con contaminaciones microbianas (Gandolfi y cols., 1992, 1994), al ser componentes principales de la pared celular de las bacterias (Rosini y cols., 2008). Este hecho, junto con la posibilidad de rendir una respuesta cuantificable a la concentración de D-aminoácidos, ha sido aprovechada para su utilización como biosensor en muestras biológicas (Sacchi y cols., 1998; Li y Zhang, 2000). Además, la medición de las concentraciones de D-aminoácidos es útil en el seguimiento de procesos fermentativos (Inaba y cols., 2003).

En nuestro caso la proteína DAO fusionada a C-LytA (CLyt-DAO) fue inmovilizada sobre barras de grafito (Figura 46) y sobre andamios de nanotubos de carbono (Figura 49) funcionalizados con aminas terciarias. En ambos casos es posible detectar un par redox compatible con la señal del cofactor FAD (Figuras 46 y 49), lo que indica que el módulo de afinidad C-LytA brinda a la enzima redox un entorno cercano y favorable para comunicarse con el electrodo directamente, sin mediadores solubles (Figura 46). Es decir, nos permite detectar directamente en el voltograma la corriente de oxidación y reducción debida a la transferencia directa de los electrones generados por el proceso redox entre el cofactor de la enzima y la superficie del electrodo.

Se han descrito varios sistemas dónde se ha podido comprobar la comunicación directa del centro activo de la enzima con el electrodo (extensamente revisado por Wollenberger y cols., 2008). En varios de esos estudios se describe la transferencia directa del centro activo de flavoenzimas a diferentes tipos de electrodos, como en el caso de la glucosa oxidasa (Wang y cols., 2011b; Li y cols., 2013). Sin embargo, en el caso específico de la DAO no hay información relacionada con el desarrollo de un método directo de transferencia, de ahí que el resultado obtenido en este trabajo sea novedoso.

Por su parte, el hecho de presentar una actividad muy reducida frente a D-fenilglicina cuando la proteína inmovilizada se analiza fuera de la celda electroquímica, y de que la intensidad de la señal

de oxidación-reducción no aumente cuando a la célula electroquímica se le adicionan sustratos de la DAO como D-alanina o D-fenilglicina (Figuras 47 y 49) sugiere una sustancial pérdida de la actividad enzimática de la proteína inmovilizada. Esto podría ser debido a la disociación de sus subunidades (Horiike y cols., 1977; Betancor y cols., 2003; Arroyo y cols., 2007), o la oxidación de residuos claves en la actividad de la enzima por productos de su reacción, como el peróxido de hidrógeno (De la Mata y cols., 2000). Por otro lado, es probable que la proteína CLyt-DAO haya quedado inmovilizada en una posición favorable para el contacto directo FAD-electrodo pero inaccesible a la captación del sustrato del disolvente. Esto implicaría que en subsiguientes desarrollos sería necesario incorporar modificaciones en la proteína de fusión para aumentar la accesibilidad del centro activo como por ejemplo variando los conectores peptídicos entre C-LytA y la DAO.

En resumen, estos resultados representan en conjunto una prueba de concepto de la idoneidad del sistema C-LytA para la inmovilización de enzimas sobre superficies de grafito funcionalizadas, con aplicaciones factibles en el desarrollo de electrodos y biosensores enzimáticos reutilizables y de fácil regeneración.

## 2.2 Desarrollo de nanobiorreactores

Los materiales y soportes sólidos que se pretenden utilizar para la inmovilización de proteínas deben cumplir una serie de características para lograr que el sistema de inmovilización propuesto sea exitoso. La mayoría de los soportes sólidos que se utilizan para la inmovilización de proteínas tienen importantes limitaciones relacionadas con la aparición de fenómenos no deseados de partición y de transferencia de masa, lo que modifica en muchos casos los parámetros cinéticos aparentes de una enzima, el pH óptimo de trabajo y la velocidad de la reacción. La inmovilización de proteínas en nanoestructuras contrarresta parte de las limitaciones antes mencionadas, además de ofrecer una mayor área superficial activa para la inmovilización de proteínas. Todo esto puede determinar en muchos casos un importante aumento de las eficiencias catalíticas. Entre los nanomateriales más atractivos para la inmovilización de proteínas se encuentran las nanopartículas magnéticas. Además de las propiedades físicas propias de un nanomaterial, sus características magnéticas facilitan su manejo y separación, lo que ha impulsado y diversificado enormemente la utilización de estos nanomateriales en diversas investigaciones y aplicaciones biomédicas y biotecnológicas (Akbarzadeh y cols., 2012).

En este sentido, en nuestro laboratorio se ha puesto a punto un sistema de purificación de proteínas en nanopartículas magnéticas comerciales funcionalizadas con DEAE a través de la etiqueta de afinidad C-LytA (Retamosa y cols., manuscrito en preparación), por lo que resultaba de interés estudiar las propiedades y el comportamiento de enzimas inmovilizadas de interés biotecnológico en dichas partículas. Para esto elegimos de nuevo la enzima DAO de *Rhodotorula gracilis* (EC 1.4.3.3) como modelo de estudio, ya que posee importantes aplicaciones biotecnológicas con aplicación en biorreactores, como en la síntesis de cefalosporinas semisintéticas o de  $\alpha$ -cetoácidos (Tishkov y Khoronenkova, 2005), así como biomédicas, ya que se ha demostrado que su actividad catalítica tiene un probado efecto citotóxico *in vitro* en varias líneas de células tumorales de mamíferos (Rosini y cols., 2009; Bava y cols., 2013).

A pesar de sus múltiples aplicaciones, la enzima libre es inestable, por lo que su inmovilización se ha llevado a cabo en diferentes soportes y mediante varias estrategias, con el objetivo de aumentar su estabilidad frente a factores como el pH, el peróxido de hidrógeno o la temperatura (Golini y cols., 1995; Fernández-Lafuente y cols., 1999; Mateo y cols., 2000; López-Gallego y cols., 2005; Zheng y cols., 2006; Kuan y cols., 2008). Entre ellos se ha logrado la inmovilización de la DAO en nanopartículas magnéticas tanto por métodos covalentes (Hsieh y cols., 2009; Bava y cols., 2013), así como haciendo uso de interacciones de afinidad mediante cola de histinas (Kuan y cols., 2008; Chien y Lee, 2008) o el sistema avidina/estreptavidina (Wang y cols., 2008a).

En nuestro trabajo, mostramos que la proteína CLyt-DAO se inmoviliza de manera rápida, específica y reversible en las nanopartículas magnéticas funcionalizadas con DEAE a través de la etiqueta C-LytA (Figura 58), con una capacidad máxima de alrededor de 70  $\mu$ g de enzima por miligramo de partículas (Figura 51). La inmovilización no afecta significativamente a la actividad específica de la enzima (Figura 52, Tabla 7). Adicionalmente, la enzima eluída tras el proceso de inmovilización (por competencia con colina), muestra una actividad específica similar a la obtenida para la fracción inicial de la proteína. Estos resultados corroboran, en un soporte funcionalizado diferente, que la estrategia de inmovilización basada en interacciones de afinidad entre la etiqueta C-LytA y derivados de la colina es un método suave, que no afecta de manera significativa a la actividad de la enzima inmovilizada, y que dirige específicamente el proceso de inmovilización, minimizando las uniones improductivas de la proteína con el soporte.

En la literatura se puede observar que la actividad de la enzima inmovilizada depende de la variante D-aminoácido oxidasa empleada y del sistema de inmovilización. Mateo y cols. (2000) muestran la unión reversible de la DAO de *R. gracilis* a una resina de intercambio aniónica,

preservando el 100 % de la actividad. En otro estudio, Betancor y cols. (2003) inmovilizan la misma variante de enzima en glioxil-agarosa y glutaraldehído-agarosa con elevado rendimiento de inmovilización y un porcentaje de recuperación de la actividad de la enzima, en todos los casos, superior al 80 %. Por su parte, Golini y cols. (1995) empleando D-aminoácido oxidasas de *Trigonopsis variabilis* y *Rhodotorula glutinis* covalentemente inmovilizadas a una resina de poliestireno (Duolita A365) retienen entre 37-95 % de la actividad nativa. En otro estudio los rendimientos máximos alcanzados fueron de un 75 %, empleando partículas magnéticas de agarosa (Ni-NTA) (Kuan y cols., 2008). Por último, Hsieh y cols. (2009) describen una importante disminución de la actividad enzimática específica de la DAO de *R. gracilis* inmovilizada en nanopartículas magnéticas ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) activadas con glutaraldehído.

Con relación a los parámetros cinéticos, la enzima libre e inmovilizada muestran valores de  $K_m$  y  $k_{cat}$  muy cercanos, con diferencias poco significativas (Figura 52). En contraste con estos resultados, se ha descrito que durante el proceso de inmovilización la D-aminoácido oxidasa sufre cambios en sus parámetros cinéticos (Wang y cols., 2008a; Hsieh y cols., 2009). Adicionalmente, para la variante libre e inmovilizada de la proteína híbrida (CLyt-DAO), se obtuvieron valores de  $K_m$  similares a los descritos para la DAO nativa (Caligiuri y cols, 2008) (Tabla 7). Sin embargo, la  $k_{cat}$  descrita para la variante nativa de la enzima es el doble de la obtenida en el presente trabajo. Es probable que estas diferencias se deban a que las mediciones de actividad para la DAO nativa se realizaron, a diferencia de nuestro estudio, a pH 8,5 y en atmósfera de saturación de oxígeno (Caligiuri y cols, 2008).

Por su parte, la inmovilización de la DAO en la nanopartículas magnéticas a través de la etiqueta C-LytA estabiliza la enzima frente a factores de pH, temperatura y fuerza iónica, haciéndola más activa que la enzima libre en una variedad de condiciones ensayadas (Figuras 53-55). En este sentido, por ejemplo, a medida que la temperatura de incubación aumenta se observa una menor actividad residual relativa para la enzima libre en comparación con la inmovilizada, demostrándose que la unión de la enzima a las nanopartículas se traduce en un aumento de la estabilidad térmica de la D-aminoácido oxidasa. Esta diferencia se observa claramente tras 1 h de incubación a 30 °C, ya que la enzima inmovilizada retiene alrededor de un 90 % de la actividad inicial y la enzima libre sólo retiene alrededor de un 20 % de la actividad inicial (Figura 53). Varios trabajos describen la estabilización térmica de la DAO por inmovilización en diferentes soportes (Betancor y cols., 2003; Kuan y cols., 2008; Wang y cols., 2008a; Hsieh y cols., 2009). De manera particular, y en concordancia con nuestros resultados, Betancor y cols. (2003) muestran que la D-

aminoácido oxidasa de *R. gracilis* libre se inactiva después de una incubación de 2 h a 40 °C, y describen un efecto estabilizador importante por inmovilización de la proteína en glioxil-agarosa y glutaraldehído-agarosa. Los autores demuestran que la inactivación térmica de la proteína es un fenómeno dependiente de la concentración, y que el efecto estabilizador viene determinado por la inmovilización de la enzima al soporte por uniones múltiples, lo que determina una menor disociación de las subunidades de la enzima (Betancor y cols., 2003). Las diferencias detectadas en la actividad residual con el tiempo para la enzima libre entre nuestro trabajo y el estudio antes mencionado, podrían deberse precisamente a las distintas concentraciones empleadas en ambos estudios: 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  en esta Tesis, y 150 y 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  en el estudio realizado por Betancor y cols. (2003).

Adicionalmente, cuando los estudios de estabilidad térmica se realizaron en presencia de glicerol 10 % (p/v), las enzimas libre e inmovilizada mostraron una actividad residual muy similar (Figura 53). En este sentido, se ha descrito con anterioridad que la utilización del glicerol produce una estabilización de la D-aminoácido oxidasa (Casalin y cols., 1991; Pollegioni y cols., 1992; Raibekas y Massey, 1997). El glicerol es un aditivo muy común que se le añade a preparaciones de proteínas porque estabiliza la estructura de las mismas, evitando su desplegamiento y agregación (Timasheff, 1998; Scharnagl y cols., 2005). Esta molécula parece modular la hidratación preferencial de proteínas a través de un efecto osmofóbico (Timasheff, 1998; Meng y cols., 2004).

Con relación al estudio de determinación de actividad residual en función del pH, la inmovilización también induce una estabilización de la DAO en nuestro trabajo (Figura 54). Este efecto es más evidente a pH ácido, ya que, como se muestra en la Figura 54, la enzima inmovilizada retiene un 50 % de la actividad inicial a pH 3,0, frente al 10 % de la enzima libre. Esta mayor actividad a pH ácido de la enzima inmovilizada podría deberse a la carga positiva que presentan las nanopartículas magnéticas empleadas en este estudio. Estas cargas actuarían repeliendo los protones de la disolución, lo que determinaría que el pH en el microentorno de la enzima inmovilizada sea ligeramente superior al de la solución (Bailey y Ollis, 1986). De hecho, se ha descrito este efecto de estabilización de la DAO a pH ácido por inmovilización en soportes cargados positivamente (Hsieh y cols., 2009), y una menor estabilidad de la enzima inmovilizada a pH ácido debido a su inmovilización en un soporte cargado negativamente (Kuan y cols., 2008).

En el caso de la estabilidad frente a la fuerza iónica, se observa que la actividad de la proteína CLyt-DAO disminuye considerablemente a concentraciones crecientes de sal (Figura 55), en consonancia con lo descrito para la proteína de *Trigonopsis variabilis* (Kopf y cols., 2011). Este

efecto se ha descrito que pudiera ser debido a que los aniones haluro pueden provocar la disociación del cofactor FAD de la holoenzima (Nishina y cols., 1977), induciendo así su inactivación, si bien en nuestro caso no observamos pérdida de la coenzima en presencia del NaCl 1,5 M durante los procedimientos de purificación de la DAO, la cual conserva su espectro de absorción en la región del visible correspondiente al cofactor. Una diferencia significativa entre nuestros datos y los encontrados para la DAO de *Trigonopsis variabilis* (Kopf y cols., 2011) es el tipo de inhibición por sal, ya que para la proteína de *R. gracilis* empleada en este trabajo se encuentra que es no competitiva (Figura 56), mientras que Kopf y cols. describen una inhibición competitiva para el caso de *T. variabilis*. Por su parte, la inmovilización de la proteína de fusión CLyt-DAO sobre las nanopartículas magnéticas funcionalizadas induce una ligera disminución del efecto inhibitorio salino (Figura 55).

Uno de los objetivos fundamentales que se persigue cuando se inmoviliza una determinada enzima, además de su estabilización, es el lograr poder reutilizarla. Con relación a esto en el presente trabajo después de 10 ciclos continuos de actividad la DAO inmovilizada conserva un 40 % de la actividad inicial (Figura 57). Este es un resultado muy estimable puesto que, mientras que Dib y Nidesky (2008) describen la reutilización de la D-aminoácido oxidasa de *T. variabilis* inmovilizada en *Sephabeads* EC-EP durante 10 ciclos con una retención de la actividad inicial similar (50 %), Hsieh y cols. (2009), inmovilizaron la DAO de *R. turuloides* sobre nanopartículas magnéticas ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), manteniendo menos del 20 % de la actividad inicial después de 10 ciclos, y por su parte Kuan y cols. (2008), mostraron la inmovilización de la DAO de *T. variabilis* en partículas magnéticas de agarosa (Ni-NTA) mediante la cola de histidinas, con una retención del 37 % de la actividad inicial tras 20 ciclos consecutivos de reacción. La pérdida de actividad con el ciclado puede deberse a una inactivación gradual de residuos claves en la catálisis por el producto de la reacción peróxido de hidrógeno (De la Mata y cols., 2000; Hsieh y cols., 2009). Adicionalmente, esta disminución en la actividad puede también estar relacionada con la pérdida de nanopartículas magnéticas y/o desorción de pequeñas cantidades de enzima en los pasos sucesivos de lavado durante los diez ciclos de reacción.

Un punto adicional a favor de la utilización del sistema de inmovilización de enzimas mediante la etiqueta de afinidad C-LytA para el desarrollo de nanobiorreactores enzimáticos es el hallazgo de que no requiere la utilización de proteína pura, sino que se puede utilizar directamente un extracto proteico crudo que contenga la enzima de interés (Figuras 58, 60 y 61). Esto hace que la metodología propuesta sea simple, rápida y económica, al no tener que implementar pasos previos

relacionados con su purificación. Adicionalmente, se demostró que las nanopartículas magnéticas empleadas en este estudio pueden ser recicladas con facilidad después de su utilización sin pérdida apreciable de la capacidad de carga (Figura 62), lo cual brinda una ventaja importante a este sistema de purificación de proteínas a través de la etiqueta de afinidad C-LytA.

### 2.3 Terapia enzimática contra células tumorales

El cáncer es una enfermedad muy heterogénea que representa la primera causa de muerte a nivel mundial, con una previsión de incremento en la incidencia de todos los tipos de cáncer de 12,7 millones de nuevos casos diagnosticados en el año 2008 a 22,2 millones en el 2030 (revisado por Bray y cols., 2012). Teniendo en cuenta lo anterior continúa siendo urgente el abordaje de nuevas estrategias para combatir este grave problema social y sanitario. Una de las estrategias que desde hace algunos años probó su eficacia relativa fue la relacionada con la generación de estrés oxidativo en células tumorales por especies reactivas del oxígeno generadas enzimáticamente (Ben-Yoseph y Ross, 1994; Connors, 1995; Stegman y cols., 1998). Sin embargo, esta estrategia no ha podido hacerse efectiva *in vivo* por varias razones: las primeras oxidasas utilizadas en estos estudios tenían metabolitos endógenos como sustratos por lo que era muy difícil controlar su concentración y, por otra parte, otras enzimas como la D-aminoácido oxidasa eran inestables por lo que su utilización era limitada.

En el presente trabajo se aborda la terapia enzimática del cáncer haciendo uso de la D-aminoácido oxidasa de *R. gracilis* estabilizada por inmovilización, a través del módulo C-LytA, en nanopartículas magnéticas funcionalizadas con DEAE. La utilización de nanopartículas magnéticas, además de estabilizar a la enzima, podría incrementar significativamente la eficacia en la terapia contra las células cancerosas *in vivo*. En primer lugar el tamaño de las partículas magnéticas es controlable, muy bien definido y se encuentra en el rango de tamaño de entidades virales lo que puede facilitar su distribución y penetración por el organismo. De hecho, se ha descrito que las nanopartículas pueden atravesar barreras biológicas como la hematoencefálica (De Jong y Borm, 2008; Lankveld y cols., 2010), lo que pudiera facilitar el acceso de fármacos a tumores cerebrales. En segundo lugar, estas nanopartículas pueden ser manipuladas con facilidad por campos magnéticos, lo que combinado con la penetrabilidad de los campos magnéticos en tejidos humanos, pudiera facilitar su localización específica en partes determinadas del cuerpo. En tercer lugar las partículas magnéticas pueden calentarse por un campo magnético para activar la liberación del fármaco o la enzima en cuestión y también pueden producir hipertermia y la ablación del tejido

(Dobson, 2006; Arruebo y cols., 2007). Por último estos nanomateriales pueden ser visualizados de manera eficiente por resonancia magnética de imagen empleando las mismas facilidades dispuestas en la actualidad para diagnóstico y terapia (Yoo y cols., 2012).

Los ensayos realizados con CLyt-DAO inmovilizada sobre las nanopartículas magnéticas inducen importantes efectos citotóxicos en las líneas celulares de carcinoma de colon: SW620, SW480, HGUE-C-1 y HCT-15 (Figuras 64 y 66), producidos por la catálisis enzimática del sustrato D-alanina con la correspondiente producción de radicales libres. Estos resultados concuerdan con lo que recientemente ha descrito Bava y cols. (2013), empleando DAO inmovilizada covalentemente en nanopartículas magnéticas ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), para la línea celular de carcinoma de colon HTC116. Creemos que el método que hemos analizado presenta algunas ventajas, con respecto al de Bava y cols. En primer lugar, el sistema con C-LytA es más sencillo desde un punto de vista puramente metodológico, pues sólo implica la simple incubación con las nanopartículas. No obstante, más importante es destacar que las partículas de Bava y cols. manifestaron un cierto grado de citotoxicidad ya en ausencia del sustrato, lo que no ocurre en nuestro caso (Figuras 64 y 67), y lo que abre la posibilidad de localización masiva de las partículas sobre el tumor sin temor a efectos secundarios, para a continuación inducir puntualmente la actividad antitumoral mediante la adición localizada de un sustrato adecuado como la D-alanina. Por otro lado, nuestro sistema parte de la ventaja de que, al no ser covalente, puede contemplarse la eventualidad de la liberación controlada de la enzima desde las nanopartículas una vez localizadas sobre el tumor, bien por la adición externa de colina o un análogo estructural de la misma, o por el empleo de algún procedimiento autoescindible como el sistema de inteínas, aprovechando el pH fisiológico moderadamente ácido que dispara la autohidrólisis de estas etiquetas (apartado 2.4, Resultados). Estas posibilidades merecen ser evaluadas en el futuro.

La terapia enzimática propuesta en el presente trabajo también indujo importantes efectos citotóxicos en líneas celulares de carcinoma de páncreas (IMIM-PC-2, RWP-1) y de glioblastoma multiforme (LN229) (Figura 67), lo que demuestra la potencialidad de esta terapia para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer. Sin embargo, las líneas celulares de carcinoma de páncreas HS766T y de glioblastoma U87 y T98 resultaron ser total o parcialmente resistentes a la terapia enzimática en presencia de D-alanina, resultado que concuerda con lo descrito previamente por Bava y cols. (2013) para la línea celular U87. La resistencia detectada en alguna de las líneas celulares empleadas en este estudio indica que los efectos citotóxicos inducidos por el tratamiento no son producidos por un único mecanismo general sino que pudiera haber cierta selectividad

dependiendo de la línea celular y el tipo de carcinoma. Los mecanismos moleculares específicos de muerte celular y resistencia que se inducen selectivamente en las líneas celulares empleadas en este trabajo serán objeto de futuros estudios en nuestro grupo de investigación.

Por otra parte es deseable que este tipo de terapia sea lo más específica posible, y que produzca el menor daño posible a células sanas de los tejidos circundantes a la masa tumoral. En este sentido, hay que recordar que no se encontraron efectos citotóxicos apreciables por la utilización de las nanopartículas magnéticas o del sustrato D-alanina en ausencia de enzima (Figura 64). Tampoco la enzima inmovilizada en ausencia del sustrato produjo apreciables efectos citotóxicos sobre las líneas celulares utilizadas en este estudio (Figuras 64, 66 y 67), lo que añade valor a la especificidad de nuestra aproximación. Por último, el tratamiento propuesto no produce efectos citotóxicos apreciables sobre cultivos de linfocitos control de pacientes sanos (Figura 68), lo que resulta importante en vistas de la utilización de esta terapia *in vivo*.

La potencialidad de este sistema debe ser verificada con estudios más amplios de distribución en tejidos, citotoxicidad, etc. Este estudio debe ampliarse también a un mayor número de líneas celulares y a otros tipos de cáncer, con el objetivo final de darle validez al sistema propuesto en este trabajo y su posible utilización como terapia enzimática contra el cáncer.

#### **2.4 Nuevo sistema de purificación de proteínas recombinantes a partir de la proteína de fusión con C-LytA mediante el empleo de inteínas**

En la actualidad, la mayoría de las investigaciones biomédicas y de los procesos biotecnológicos utilizan en alguna de sus etapas la tecnología de producción de proteínas recombinantes. Esta fase sigue siendo en muchos casos un problema clave a resolver que condiciona el tiempo de la investigación, o determina los costes de producción para un determinado producto biotecnológico. Este hecho sigue impulsando el desarrollo de nuevos métodos que permitan la obtención y purificación de la proteína recombinante deseada con alto rendimiento y pureza manteniendo la actividad biológica (Koehn y Hunt, 2009; Young y cols., 2012).

Las etiquetas de afinidad se han mostrado como una herramienta altamente eficaz para la purificación de proteínas recombinantes (Waugh, 2005; Young y cols., 2012). Sin embargo, uno de los puntos que más reticencia produce en este tipo de sistemas es la imposibilidad en muchas ocasiones de recuperar la proteína de interés libre. En este sentido, el sistema de inteínas desarrollado en el laboratorio del Prof. Wood ha demostrado una muy alta eficiencia para conseguir separar la proteína deseada, tan sólo por un cambio de pH a 6,5 (Wood y cols., 1999; Wu y cols.,

2011). Teniendo en cuenta esto, y en colaboración con el Prof. Wood, en este trabajo nos propusimos mejorar el sistema de purificación de proteínas mediante la etiqueta C-LytA, previamente patentado por nuestro laboratorio, separando el dominio C-LytA de la proteína de interés por este tipo de secuencia.

Los estudios realizados con la proteína de fusión CLyt-int-MBP muestran que tras su inmovilización específica, en columna de DEAE-celulosa o en nanopartículas funcionalizadas con DEAE, es posible separar la MBP del resto de la proteína por un simple cambio a pH 6,5 en el tampón, ya que se induce la ruptura específica de la proteína de fusión en el extremo C-terminal del segmento de inteína. La MBP libre se obtiene en solución con un elevado grado de pureza (Figuras 70-73) y un rendimiento global para el caso de las nanopartículas magnéticas del 90 %, partiendo de fracciones puras de la proteína de fusión y de un 73 % partiendo de extractos proteicos.

Con objeto de ampliar la versatilidad del nuevo sistema desarrollado, evaluamos la obtención de proteína pura MBP, a partir de la misma construcción CLytA-int-MBP, utilizando un soporte líquido como es el sistema acuoso de dos fases. Los sistemas acuosos de dos fases tienen una gran utilidad en la separación de material biológico (Maestro y cols., 2008; Asenjo y Andrews, 2012; Ruiz y cols., 2012) y presentan varias ventajas, tales como su alta biocompatibilidad, baja tensión superficial (lo que minimiza la degradación de las biomoléculas), su alta capacidad de carga y rendimiento, y que son sistemas económicos y fácilmente escalables (Albertsson, 1986; Walter y cols., 1991).

El sistema de PEG/fosfato probado inicialmente produjo la precipitación de la proteína de fusión, por lo que se obtuvieron muy bajos rendimientos en el proceso de purificación. Aunque el dominio C-LytA no induce tal fenómeno per sé (Maestro y cols., 2008), es probable que su fusión a la secuencia de inteína rinda un polipéptido más insoluble. Además, se ha descrito este hecho para otras proteínas de fusión con esta etiqueta (Maestro y cols., 2008). Es por esto que la elección del sistema de dos fases a utilizar depende de la proteína en concreto que estudiemos. Para el caso de CLytA-int-MBP la purificación mejoró sustancialmente empleando el sistema PEG/dextrano, concentrándose con un alto grado de pureza en la fase rica en PEG (Figuras 74 y 75). Este resultado ya había sido previamente descrito por Maestro y cols. (2008), dónde se muestra que las proteínas de fusión que contienen la etiqueta de afinidad C-LytA presentan gran afinidad por el PEG en ausencia de colina, por lo que se localizan de manera cuantitativa en esta fase. Adicionalmente, la ruptura de la proteína de fusión y el paso de la MBP libre de la fase rica en PEG al dextrano se logró tras un cambio a pH 6,5 y en presencia de 300 mM de KCl (Figura 75), con un rendimiento

global alrededor del 30 %. La razón fundamental del bajo rendimiento obtenido en este trabajo se debe a que durante el proceso de purificación, y de manera particular en la etapa de ruptura de la proteína y paso de la MBP a la fase rica en dextrano, se encontró una elevada precipitación de la proteína que la hace insensible al tratamiento por pH. Si bien este aspecto es claramente susceptible de mejora, no es menos cierto que la alta pureza de las fracciones de MBP obtenidas, la sencillez y el bajo coste del procedimiento, así como la posibilidad de escalado que ofrece este sistema a nivel industrial pueden compensar estos inconvenientes desde el punto de vista económico y operativo.

En resumen, estos resultados representan una prueba de concepto de que es posible combinar el sistema de purificación por afinidad de C-LytA con el sistema de autocorte por inteínas para la obtención de proteínas recombinantes puras. El sistema es rápido y sencillo, y se obtiene un alto rendimiento y grado de pureza de la proteína aislada. Además, puede usarse en un amplio rango de soportes, tanto sólidos como líquidos, lo que le aporta una gran versatilidad.





*Capítulo VI*

**CONCLUSIONES**

UNIVERSITAS

Miguel

Hernández



En el presente trabajo se desarrollan nuevos enfoques para la inmovilización estable, suave y reversible de proteínas recombinantes a varias superficies y soportes haciendo uso de las etiquetas de afinidad: BioF (módulo de unión a bioplásticos del tipo de los polihidroxicanoatos, de *Pseudomonas putida* KT2442) y C-LytA (módulo de unión a colina, de la amidasa LytA de *Streptococcus pneumoniae*).

**Con relación a la etiqueta de afinidad BioF se concluye:**

1. La unión estable del dominio de unión a polihidroxicanoatos (PHAs) no está restringida sólo a PHAs de cadena media (octanoato, undecanoato), sustratos naturales de las fasinas PhaF y PhaI, sino también a variantes comerciales de PHAs de cadena corta como es el caso del poli-3-hidroxi-butirato (PHB).
2. La etiqueta de afinidad BioF es capaz de unirse *in vitro* a gránulos de PHB sin su cubierta proteolípida natural, resultando además que la unión es más resistente a detergentes que en el caso del gránulo recubierto con agentes hidrofóbicos emuladores de su composición natural (ácido oleico o fosfolípidos). Estos dos hallazgos posibilitan la ampliación del uso del BioF como etiqueta de afinidad para la inmovilización de proteínas en formulaciones muy diversas de PHAs tanto naturales como químicamente funcionalizados.
3. El Sarcosil es el detergente que más debilita la interacción entre el BioF y los bioplásticos, por lo que parece comportarse como el "eluyente universal" de estos sistemas con independencia del polipéptido unido a la secuencia BioF.
4. La inmovilización de proteínas en PHAs a través del BioF aumentó su resistencia a la degradación, permitiendo que las mismas ganen en estabilidad en una amplia cantidad de condiciones.
5. Se construyó un biorreactor enzimático sobre PHB mediante la inmovilización de una fusión BioF- $\beta$ -galactosidasa, permitiéndose la reutilización del complejo enzima-soporte durante varios ciclos enzimáticos, y constituyendo una prueba de concepto para el diseño de bioplásticos activos basados en PHAs.

6. El sistema propuesto de inmovilización de la lacasa bacteriana CueO en PHB a través de interacciones de afinidad con el BioF es novedoso y ha permitido la construcción de soportes enzimáticos destinados a la degradación de compuestos coloreados iguales o similares a los habitualmente empleados por la industria textil, obteniéndose rendimientos y velocidades de decoloración superiores a las que se obtuvieron para la enzima libre, particularmente para colorantes azo-derivados. Se demostró que el procedimiento de inmovilización beneficia la estabilidad de la enzima, permitiendo así su reutilización continua. Esto abre el camino para el desarrollo de biorreactores enzimáticos sostenibles para la decoloración de colorantes sintéticos.

**Por su parte, de los estudios relacionados con la utilización de la etiqueta de afinidad C-LytA se concluye:**

7. Se desarrolló un sistema que combina la modificación y funcionalización de electrodos de grafito y nanotubos de carbono con análogos de colina, y la inmovilización específica y reversible de enzimas a estas estructuras a través del módulo C-LytA. Como prueba de concepto se desarrolló un electrodo enzimático basado en la proteína de fusión C-LytA- $\beta$ -galactosidasa y se estudió su capacidad de reutilización y regeneración.
8. Se logró la inmovilización estable, a través de C-LytA, de la D-aminoácido oxidasa (DAO) de *Rhodotorula gracilis* tanto en electrodos de grafito funcionalizados con análogos de colina como en andamios de nanotubos de carbono multi-pared. En ambos casos se puede detectar una transferencia directa de electrones de la enzima al electrodo, lo que constituye la base para la construcción de un nuevo tipo de biosensores enzimáticos de tercera generación.
9. La fusión C-LytA-DAO, arriba descrita, pudo asimismo inmovilizarse de manera específica en nanopartículas magnéticas funcionalizadas con DEAE. La inmovilización no afectó a los parámetros cinéticos de la enzima y logró la estabilización de la misma en un mayor rango de pH y temperatura que la proteína soluble.

10. El sistema de inmovilización de la proteína C-LytA-DAO en nanopartículas magnéticas no requiere de la utilización de proteína pura, sino que se puede utilizar directamente un extracto bacteriano crudo que contenga la enzima sobreexpresada. Esto hace que la metodología propuesta sea simple, rápida y económica, al no tener que implementar pasos previos relacionados con su purificación.
11. Las nanopartículas magnéticas empleadas en este estudio pueden ser regeneradas con facilidad después de su utilización por tratamiento con detergentes sin pérdida apreciable de la capacidad de carga, permitiendo así el desarrollo de nanobioreactores enzimáticos reutilizables y de fácil regeneración.
12. La DAO inmovilizada en nanopartículas magnéticas mostró marcados efectos citotóxicos sobre líneas celulares de carcinoma de colon, páncreas y glioblastoma multiforme, inducidos específicamente por sustratos de la enzima como la D-alanina. Además el sistema propuesto no produce efectos citotóxicos apreciables sobre un cultivo control de linfocitos sanos, lo que lo convierte en un sistema con potencial aplicación para terapia enzimática contra diversos tumores *in vivo*.
13. Se logró desarrollar un sistema simple de alto rendimiento y pureza para la purificación en fase sólida (DEAE-celulosa y nanopartículas magnéticas) de proteína recombinante y su posterior separación de la etiqueta de afinidad haciendo uso de segmentos de inteínas con actividad autoproteolítica inducida por cambios de pH.
14. El procedimiento anterior basado en inteínas pudo asimismo adaptarse a sistemas acuosos de dos fases PEG/dextrano en lugar de la utilización de soportes sólidos, lo que permitió la purificación y posterior separación de proteína recombinante de elevada pureza. Su simplicidad y coste podrían potenciar su utilización a escala industrial.



*Capítulo VII*

**BIBLIOGRAFÍA**

UNIVERSITAS

Miguel

Hernández



- Akbarzadeh, A., Samiei, M., Davaran, S. (2012)** Magnetic nanoparticles: preparation, physical properties, and applications in biomedicine. *Nanoscale Res. Lett.* 7: 144.
- Albertsson, P.A. (1986)** Partition of cell particles and macromolecules, 3<sup>rd</sup> ed., Wiley, N.Y., EE.UU.
- Allongue, P.M., Desbat, B., Fagebaume, O., Hitmi, R., Pinson, J., Savéant, J.M. (1997)** Covalent modification of carbon surfaces by aryl radicals generated from the electrochemical reduction of diazonium salts. *J. Am. Chem. Soc.* 119, p. 201-207.
- Andrews, B.A., Schmidt, A.S., Asenjo, J.A. (2005)** Correlation for the partition behavior of proteins in aqueous two-phase systems: effect of surface hydrophobicity and charge. *Biotechnol. Bioeng.* 90, p. 380-390.
- Ansari, S.A., Husain, Q. (2012)** Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: a review. *Biotechnol Adv.* 30, p. 512-523.
- Arnau, J., Lauritzen, C., Petersen, G.E, Pedersen, J. (2006)** Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. *Protein Expr Purif* 48, p. 1-13.
- Arroyo, M., Menéndez, M., García, J.L., Campillo, N., Hormigo, D., de la Mata, I., Castellón, M.P., Acebal, C. (2007)** The role of cofactor binding in tryptophan accessibility and conformational stability of His-tagged D-amino acid oxidase from *Trigonopsis variabilis*. *Biochim Biophys Acta.* 1774, p. 556-565.
- Arruebo, M., Fernández-Pacheco, R., Ibarra, M.R., Santamaría, J. (2007)** Magnetic nanoparticles for drug delivery. *Nanotoday* 2, p. 22–32.
- Asenjo, J.A., Andrews, B.A. (2012)** Aqueous two-phase systems for protein separation: phase separation and applications. *J Chromatogr A.* 1238, p. 1-10.
- Atwood, J.A., Rehm, B.H. (2009)** Protein engineering towards biotechnological production of bifunctional polyester beads. *Biotechnol Lett.* 31, p. 131-137.
- Bailey, J.E., Ollis, D.F. (1986)** Biochemical engineering fundamentals (2<sup>nd</sup> ed.) McGraw-Hill, N.Y., EE.UU.
- Banki, M.R., Feng, L., Wood, D.W. (2005)** Simple bioseparations using self-cleaving elastin-like polypeptide tags. *Nat Methods.* 2, p. 659-661.
- Banki, M.R., Wood, D.W (2005)** Inteins and affinity resin substitutes for protein purification and scale up. *Microb Cell Fact.* 4:32.
- Batalla, P., Bolívar, J.M., Lopez-Gallego, F., Guisán, J.M. (2012)** Oriented covalent immobilization of antibodies onto heterofunctional agarose supports: a highly efficient immuno-affinity chromatography platform. *J Chromatogr A.* 1262, p. 56-63.

- Batalla, P., Fuentes, M., Grazu, V., Mateo, C., Fernandez-Lafuente, R., Guisán, J.M. (2008a)** Oriented covalent immobilization of antibodies on physically inert and hydrophilic support surfaces through their glycosidic chains. *Biomacromolecules* 9, p. 719-723.
- Batalla, P., Fuentes, M., Mateo, C., Grazu, V., Fernandez-Lafuente, R., Guisán, J.M. (2008b)** Covalent immobilization of antibodies on finally inert support surfaces through their surface regions having the highest densities in carboxyl groups. *Biomacromolecules* 9, p. 2230-2236.
- Bava, A., Gornati, R., Cappellini, F., Caldinelli, L., Pollegioni, L., Bernardini, G. (2013)** D-amino acid oxidase-nanoparticle system: a potential novel approach for cancer enzymatic therapy. *Nanomedicine* (Epub ahead of print): doi:10.2217/nmm.12.187.
- Ben-Yoseph, O., Ross, B.D. (1994)** Oxidation therapy: the use of a reactive oxygen species generating enzyme system for tumor treatment. *Br. J. Cancer* 70, p. 1131-1135.
- Bergmann, S., Hammerschmidt, S. (2006)** Versatility of pneumococcal surface proteins. *Microbiology* 152, p. 295-303.
- Berry, A.M., Paton, J.C. (2000)** Additive attenuation of virulence of *Streptococcus pneumoniae* by mutation of the genes encoding pneumolysin and other putative pneumococcal virulence proteins. *Infect Immun* 68, p. 133-140.
- Betancor, L., Hidalgo, A., Fernández-Lorente, G., Mateo, C., Rodríguez, V., Fuentes, M., López-Gallego, F., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J.M. (2003)** Use of physicochemical tools to determine the choice of optimal enzyme: stabilization of D-amino acid oxidase. *Biotechnol Prog.* 19, p. 784-788.
- Birkenmeier, G., Vijayalakshmi, M.A., Stigbrand, T., Kopperschläger, G. (1991)** Immobilized metal ion affinity partitioning, a method combining metal-protein interaction and partitioning of proteins in aqueous two-phase systems. *J Chromatogr.* 539, p. 267-277.
- Boon, N., Defoirdt, T., De Windt, W., Van De Wiele, T., Verstraete, W. (2010)** Hydroxybutyrate and poly-hydroxybutyrate as components of animal feed or feed additives. *US Patent Application* 2010/0093860.
- Bradford, M.M. (1976)** Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, p. 248-254.
- Brady, D., Jordaan, J. (2009)** Advances in enzyme immobilization. *Biotechnol Lett.* 31, p. 1639-1650.
- Bray, F., Jemal, A., Grey, N., Ferlay, J., Forman, D. (2012)** Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030): a population-based study. *Lancet Oncol.* 13, p. 790-801.
- Brena, B.M., Batista-Viera, F. (2006)** Immobilization of enzymes: A literature survey. In: *Methods in Biotechnology 22: Immobilization of Enzymes and Cells* (2<sup>nd</sup> Edition), ISBN:

- 978-1-58829-290-2, Edited by: J.M. Guisán, Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, p. 15-30.
- Brodelius, P., Mosbach, K. (1987)** Immobilization Techniques for Cells/Organelles. *In: Methods in Enzymology 135*, (Mosbach, K., ed.), Academic Press, London, p. 173–454.
- Brundish, D.E., Baddiley, J. (1968)** Pneumococcal C-substance, a ribitol teichoic acid containing choline phosphate. *Biochem J.* 110, p. 573–582.
- Caligiuri, A., D'Arrigo, P., Rosini, E., Pedrocchi-Fantoni, G., Tessaro, D., Molla, G., Servi, S., Pollegioni, L. (2008)** Activity of yeast D-amino acid oxidase on aromatic unnatural amino acids. *J Mol Cat B: Enzymatic* 50, p. 93–98.
- Camarero, S., Ibarra, D., Martínez, M.J., Martínez, A.T. (2005)** Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. *Appl Environ Microbiol.* 71, p. 1775-1784.
- Campàs, M., Marty, J.L. (2006)** Encapsulation of enzymes using polymers and sol-gel techniques. *In: Methods in Biotechnology 22: Immobilization of Enzymes and Cells (2<sup>nd</sup> Edition)*, ISBN: 978-1-58829-290-2, Edited by: J.M. Guisán, Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, p. 77-86.
- Campos, R., Kandelbauer, A., Robra, K.H., Cavaco-Paulo, A., Gübitz, G.M. (2001)** Indigo degradation with purified laccases from *Trametes hirsuta* and *Sclerotium rolfsii*. *J Biotechnol.* 89, p. 131-139.
- Casalin, P., Pollegioni, L., Curti, B., Pilone Simonetta, M. (1991)** A study on apoenzyme from *Rhodotorula gracilis* D-amino acid oxidase. *Eur J Biochem.* 197, p. 513-517.
- Caubín, J., Martín, H., Roa, A., Cosano, I., Pozuelo, M., de La Fuente, J.M., Sánchez-Puelles, J.M., Molina, M., Nombela, C. (2001)** Choline-binding domain as a novel affinity tag for purification of fusion proteins produced in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Bioeng.* 74, p. 164-171.
- Champagne, P.P., Ramsay, J.A. (2007)** Reactive blue 19 decolouration by laccase immobilized on silica beads. *Appl Microbiol Biotechnol.* 77, p. 819–823.
- Chanprateep, S. (2010)** Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. *J Biosci Bioeng.* 110, p. 621-632.
- Chen, F., Tao, N.J. (2009)** Electron transport in single molecules: from benzene to graphene. *Acc Chem Res.* 42, p. 429-438.
- Cheng, S., Chen, G.Q., Leski, M., Zou, B., Wang, Y., Wu, Q. (2006)** The effect of D,L-beta-hydroxybutyric acid on cell death and proliferation in L929 cells. *Biomaterials* 27, p. 3758-3765.
- Chibata, I. (1978)** *In Immobilized Enzymes*, Ed. I. Chibata, John Wiley, New York, p. 1-73.

- Chien, L.J., Lee, C.K. (2008)** Biosilicification of dual-fusion enzyme immobilized on magnetic nanoparticle. *Biotechnol Bioeng* 100, p. 223–230.
- Cho, E.A., Seo, J., Lee, D.W., Pan, J.G. (2011)** Decolorization of indigo carmine by laccase displayed on *Bacillus subtilis* spores. *Enzyme Microb Technol.* 49, p. 100-104.
- Chong, S., Mersha, F.B., Comb, D.G., Scott, M.E., Landry, D., Vence, L.M., Perler, F.B., Benner, J., Kucera, R.B., Hirvonen, C.A., Pelletier, J.J., Paulus, H., Xu, M.Q. (1997)** Single-column purification of free recombinant proteins using a self-cleavable affinity tag derived from a protein splicing element. *Gene* 192, p. 271–281.
- Claus, H., Faber, G., König, H. (2002)** Redox-mediated decolorization of synthetic dyes by fungal laccases. *Appl Microbiol Biotechnol* 59, p. 672–678.
- Connors, T.A. (1995)** The choice of prodrugs for gene directed enzyme prodrug therapy of cancer. *Gene Ther.* 2, p. 702–709.
- Cuatrecasas, P., Wilchek, M. (1968)** Single-step purification of avidine from egg white by affinity chromatography on biocytin-Sepharose columns. *Biochem Biophys Res Commun.* 33, p. 235-239.
- Deepak, V., Pandian, Sb., Kalishwaralal, K., Gurunathan, S. (2009)** Purification, immobilization, and characterization of nattokinase on PHB nanoparticles. *Bioresour Technol.* 100, p. 6644-6666.
- De Jong, W.H., Borm, P.J. (2008)** Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards. *Int. J. Nanomedicine* 3, p. 133–149.
- Delamar, M., Desarmot, G., Fagebaume, O., Hitmi, R., Pinson, J., Saveant, J.M (1997)** Modification of carbon fiber surfaces by electrochemical reduction of aryl diazonium salts: application to carbon epoxy composites. *Carbon* 35, p. 801-807.
- De la Mata, I., Ramón, F., Obregón, V., Castellón, M.P., Acebal, C. (2000)** Effect of hydrogen peroxide on D-amino acid oxidase from *Rhodotorula gracilis*. *Enzyme Microb Technol.* 27, p. 234-239.
- De la Rica, R., Aili, D., Stevens, M.M. (2012)** Enzyme-responsive nanoparticles for drug release and diagnostics. *Adv Drug Deliv Rev.* 64, p. 967-978.
- De Schryver, P., Sinha, A.K., Kunwar, P.S., Baruah, K., Verstraete, W., Boon, N., De Boeck, G., Bossier, P. (2010)** Poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) increases growth performance and intestinal bacterial range-weighted richness in juvenile European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86, p. 1535–1541.
- Dib, I., Nidetzky, B. (2008)** The stabilizing effects of immobilization in D-amino acid oxidase from *Trigonopsis variabilis*. *BMC Biotechnol.* 8:72, doi: 10.1186/1472-6750-8-72.

- Di Guan, C., Li, P., Riggs, P.D., Inouye, H. (1988)** Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in *Escherichia coli* by fusion to maltose-binding protein. *Gene* 67, p. 21-30.
- Dobson, J. (2006)** Magnetic nanoparticles for drug delivery. *Drug Dev. Res.* 67, p. 55–60.
- Dos Santos, L., Climent, V., Blanford, C.F., Armstrong, F.A. (2010)** Mechanistic studies of the 'blue' Cu enzyme, bilirubin oxidase, as a highly efficient electrocatalyst for the oxygen reduction reaction. *Phys Chem Chem Phys.* 12, p. 13962-13974.
- Dubé, E., Shareck, F., Hurtubise, Y., Beauregard, M., Daneault, C. (2008)** Decolourization of recalcitrant dyes with a laccase from *Streptomyces coelicolor* under alkaline conditions. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 35, p. 1123-1129.
- Duthy, T.G., Ormsby, R.J., Giannakis, E., Ogunniyi, A.D., Stroehrer, U.H., Paton, J.C., Gordon, D.L. (2002)** The human complement regulator factor H binds pneumococcal surface protein PspC via short consensus repeats 13 to 15. *Infect Immun* 70, p. 5604–5611.
- Fang, Z., Li, T., Wang, Q., Zhang, X., Peng, H., Fang, W., Hong, Y., Ge, H., Xiao, Y. (2011)** A bacterial laccase from marine microbial metagenome exhibiting chloride tolerance and dye decolorization ability. *Appl Microbiol Biotechnol.* 89, p. 1103-1110.
- Feng, W., Ji, P. (2011)** Enzymes immobilized on carbon nanotubes. *Biotechnol Adv.* 29, p. 889-895.
- Fernández-Lafuente, R., Rodríguez, V., Mateo, C., Fernández-Lorente, G., Arminsen, P., Sabuquillo, P., Guisán, J.M. (1999)** Stabilization of enzymes (D-amino acid oxidase) against hydrogen peroxide via immobilization and postimmobilization techniques. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 7, p. 173–179.
- Fernández-Lafuente, R., Rosell, C.M., Rodríguez, V., Santana, C., Soler, G., Bastida, A., Guisán, J.M. (1993)** Preparation of activated supports containing low pK amino groups. A new tool for protein immobilization via the carboxyl coupling method. *Enzyme Microb Technol.* 15, p. 546-550.
- Fernández-Tornero, C., López, R., García, E., Giménez-Gallego, G., Romero, A. (2001)** A novel solenoid fold in the cell wall anchoring domain of the pneumococcal virulence factor LytA. *Nat Struct Biol* 8, p.1020–1024.
- Fonda, M.L., Anderson, B.M. (1967)** D-amino acid oxidase. I. Spectrophotometric studies. *J. Biol. Chem.* 242, p. 3957-3962.
- Fong, B.A., Wu, W.Y., Wood, D.W. (2010)** The potential role of self-cleaving purification tags in commercial-scale processes. *Trends Biotechnol.* 28, p. 272-279.
- Forni, D., Wenk, C., Bee, G. (1999)** Digestive utilization of novel biodegradable plastic in growing pigs. *Ann. Zootech.* 48, p. 163–171.

- Galán, B., Dijanksi, N., Maestro, B., De Eugenio, L.I., Escapa, I.F., Sanz, J.M., García, J.L., Prieto, M.A. (2011)** Nucleoid-associated PhaF phasin drives intracellular location and segregation of polyhydroxyalkanoate granules in *Pseudomonas putida* KT2442. *Mol Microbiol* 79, p. 402-418.
- Gandolfi, I., Palla, G., Delprato, L., De Nisco, F., Marchelli, R., Salvadori, C. (1992)** D-Amino acids in milk as related to heat treatments and bacterial activity. *J Food Sci* 57, p. 377-379.
- Gandolfi, I., Palla, G., Marchelli, R., Dossena, A., Puelli, S. (1994)** D-Alanine in fruit juices: a molecular marker of bacterial activity, heat treatments and shelf-life. *J Food Sci* 59, p. 152-154.
- Gao, S., Wang, Y., Diao, X., Luo, G., Dai, Y. (2010)** Effect of pore diameter and cross-linking method on the immobilization efficiency of *Candida rugosa* lipase in SBA-15. *Bioresour Technol.* 101, p. 3830-3837.
- García, P., Moscoso, M., Rodríguez-Cerrato, V., Yuste, J., García, E. (2010)** *Streptococcus pneumoniae*: from molecular biology to host-pathogen interactions. *J Appl Biomed* 8, p.131-140.
- Giardina, P., Faraco, V., Pezzella, C., Piscitelli, A., Vanhulle, S., Sannia, G. (2010)** Laccases: a never-ending story. *Cell Mol Life Sci.* 67, p. 369-385.
- Gillies, A.R., Hsui, J.F., Oak, S., Wood, D.W. (2008)** Rapid cloning and purification of proteins: gateway vectors for protein purification by self-cleaving tags. *Biotechnol Bioeng.* 101, p. 229-40.
- Godoy, C.A., de las Rivas, B., Grazú, V., Montes, T., Guisán, J.M., López-Gallego, F. (2011)** Glyoxyl-disulfide agarose: a tailor-made support for site-directed rigidification of proteins. *Biomacromolecules* 12, p. 1800-1809.
- Golini, P., Bianchi, D., Battistel, E., Cesti, P., Tassinari, R. (1995)** Immobilization of D-amino acid oxidase from different yeasts: characterization and application in the deamination of cephalosporin C. *Enzyme Microb. Technol.* 17, p. 324-329.
- Gosink, K.K., Mann, E.R., Guglielmo, C., Tuomanen, E., Masure, H.R. (2000)** Role of novel choline binding proteins in virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 68, p. 5690-5695.
- Grass, G., Rensing, C. (2001)** CueO is a multi-copper oxidase that confers copper tolerance in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun.* 286, p. 902-908.
- Guan, Y., Lilley, T.H., Garcia-Lisbona, M.N., Treffry, T.E. (1995)** New approaches to aqueous polymer systems: Theory, thermodynamics and applications to biomolecular separations. *Pure & Appl. Chem.* 67, p. 955-962.

- Guisán, J.M., Bastida, A., Cuesta, C., Fernández-Lafuente, R., Rosell, C.M. (1991)** Immobilization-stabilization of alpha-chymotrypsin by covalent attachment to aldehyde-agarose gels. *Biotechnol Bioeng.* 38, p. 1144-1152.
- Guisán, J.M. (2006)** Immobilization of enzymes as the 21st century begins: An already solved problem or still an exciting challenge? *In: Methods in Biotechnology 22: Immobilization of Enzymes and Cells (2<sup>nd</sup> Edition)*, ISBN: 978-1-58829-290-2, Edited by: J.M. Guisán, Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, p. 1-15.
- Guss, B., Eliasson, M., Olsson, A., Uhlén, M., Frej, A.K., Jornvall, H., Flock, J.I., Lindberg, M. (1986)** Structure of the IgG-binding regions of streptococcal protein G. *EMBO J.* 5, p. 1567-1575.
- Gutiérrez, M.C., Hortigüela, M.J., Amarilla, M., Jiménez, R., Ferrer, M.L., Del Monte, F. (2007)** Macroporous 3D architectures of self-assembled MWCNT surface decorated with Pt nanoparticles as anodes for a direct methanol fuel cell. *J. Phys. Chem. C* 111, p. 5557–5560.
- Hakenbeck, R., Madhour, A., Denapaite, D., Brückner, R. (2009)** Versatility of choline metabolism and choline-binding proteins in *Streptococcus pneumoniae* and commensal streptococci. *FEMS Microbiol Rev.* 33, p. 572-586.
- Hammerschmidt, S. (2007)** Pneumococcal virulence factors and adhesion proteins targeting the host. *Molecular Biology of Streptococci* (Hakenbeck, R. y Chhatwal, G.S., eds), Horizon Press, Wymondham, Norfolk, UK, p.141–203.
- Hammerschmidt, S., Agarwal, V., Kunert, A., Haelbich, S., Skerka, C., Zipfel, P.F. (2007)** The host immune regulator factor H interacts via two contact sites with the PspC protein of *Streptococcus pneumoniae* and mediates adhesion to host epithelial cells. *J Immunol* 178, p. 5848–5858.
- Hanahan, D. (1983)** Studies on transformation of *E. coli* with plasmids. *J. Mol Biol* 166, p. 557-580.
- Hartmeier, W. (1988)** Immobilized Biocatalysts, Springer-Verlag, Berlín.
- Hench, L.L., West, J.K. (1990)** The sol-gel process. *Chem. Rev.* 90, p. 33–79.
- Hermanson, G.T. (2008)** Bioconjugate Techniques, Academic Press, Estados Unidos.
- Hernández-Rocamora, V.M (2009)** Estudio estructural y funcional de proteínas de interés biotecnológico. Aplicaciones y optimización. Tesis Doctoral, Universidad Miguel Hernández de Elche, España.
- Hernández-Rocamora, V.M., Reulen, S.W., de Waal, B., Meijer, E.W., Sanz, J.M., Merckx, M. (2011)** Choline dendrimers as generic scaffolds for the non-covalent synthesis of multivalent protein assemblies. *Chem Commun.* 47, p. 5997-5999.

- Hernández-Torres, F., Pedrajas, J.R., Aránega, A.E., Navarro, F. (2008)** Expression in bacteria of small and specific protein domains of two transcription factor isoforms, purification and monospecific polyclonal antibodies generation, by a two-step affinity chromatography procedure. *Protein Expr Purif.* 60, p. 151-156.
- Herrero, M., de Lorenzo, V., Timmis, K.N. (1990)** Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 172, p. 6557-6567.
- Hochuli, E., Bannwarth, W., Döbeli, H., Gentz, R., Stüber, D. (1988)** Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent. *Nature Biotechnol* 6, p. 1321-1325.
- Hochuli, E., Döbeli, H., Schacher, A. (1987)** New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *J Chromatogr* 411, p. 177-184.
- Horiike, K., Shiga, K., Nishina, Y., Isomoto, A., Yamano, T. (1977)** Association-dissociation of the flavoprotein hog kidney D-amino acid oxidase. Determination of the monomer-dimer equilibrium constant and the energetics of subunit association. *J Biochem.* 82, p. 1247-1255.
- Horowitz, D.M., Sanders, J.K.M. (1994)** Amorphous, biomimetic granules of polyhydroxybutyrate: preparation, characterization, and biological implications. *J. Am. Chem. Soc.* 116, p. 2695-2702.
- Hsieh, H.C., Kuan, I.C., Lee, S.L., Tien, G.Y., Wang, Y.J., Yu, C.Y. (2009)** Stabilization of D-amino acid oxidase from *Rhodospiridium toruloides* by immobilization onto magnetic nanoparticles. *Biotechnol Lett.* 31, p. 557-563.
- Ihsen, J., Magnani, D., Thöny-Meyer, L., Ren, Q. (2009)** Use of extracellular medium chain length polyhydroxyalkanoate depolymerase for targeted binding of proteins to artificial poly[(3-hydroxyoctanoate)-co-(3-hydroxyhexanoate)] granules. *Biomacromolecules* 10, p. 1854-1864.
- Illanes, A., Cauerhff, A., Wilson, L., Castro, G.R. (2012)** Recent trends in biocatalysis engineering. *Bioresour Technol* 115, p. 48-57.
- Inaba, Y., Mizukami, K., Hamada-Sato, N., Kobayashi, T., Imada, C., Watanabe, E. (2003)** Development of a D-alanine sensor for the monitoring of a fermentation using the improved selectivity by the combination of D-amino acid oxidase and pyruvate oxidase. *Biosens Bioelectron.* 19, p. 423-431.
- Jendrossek, D. (2009)** Polyhydroxyalkanoate granules are complex subcellular organelles (carbonosomes). *J Bacteriol.* 191, p. 3195-3202.
- Keshavarz, T., Roy, I. (2010)** Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. *Curr Opin Microbiol.* 13, p. 321-326.

- Khan, A.A., Alzohairy, M.A. (2010)** Recent advances and applications of immobilized enzyme technologies: a review. *Res J Biol Sci* 5, p. 565-575.
- Kim, J.E., Shin, J.Y., Cho, M.H. (2012)** Magnetic nanoparticles: an update of application for drug delivery and possible toxic effects. *Arch Toxicol* 86, p. 685–700.
- Kim, S.U., Lee, J.H., Lee, T., Min, J., Choi, J.W. (2010)** Nanoscale film formation of recombinant azurin variants with various cysteine residues on gold substrate for bioelectronic device. *J Nanosci Nanotechnol.* 10, p. 3241-3245.
- Koehn, J., Hunt, I. (2009)** High-Throughput Protein Production (HTPP): a review of enabling technologies to expedite protein production. *Methods Mol Biol.* 498, p. 1-18.
- Kopf, J., Hormigo, D., García, J.L., Acebal, C., de la Mata, I., Arroyo, M. (2011)** Inhibition of recombinant D-Amino acid oxidase from *Trigonopsis variabilis* by Salts. *Enzyme Res.* Article ID 158541, doi:10.4061/2011/158541.
- Koutsopoulos, S. (2012)** Molecular fabrications of smart nanobiomaterials and applications in personalized medicine. *Adv Drug Deliv Rev.* 64, p. 1459-1476.
- Kuan, I., Liao, R., Hsieh, H., Chen, K., Yu, C. (2008)** Properties of *Rhodotorula gracilis* D-amino acid oxidase immobilized on magnetic beads through his-tag. *J Biosci Bioeng.* 105, p. 110-115.
- Kunamneni, A., Plou, F.J., Ballesteros, A., Alcalde, M. (2008)** Laccases and their applications: a patent review. *Recent Pat Biotechnol.* 2, p. 10-24.
- Laemmli, U.K. (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, p. 680–685.
- Lankveld, D.P., Oomen, A.G., Krystek, P., Neigh, A., Troost-de Jong, A., Noorlander, C.W., Van Eijkeren, J.C., Geertsma, R.E., De Jong, W.H. (2010)** The kinetics of the tissue distribution of silver nanoparticles of different sizes. *Biomaterials* 31, p. 8350–8361.
- Lemoigne, M. (1926)** Products of dehydration and of polymerization of b-hydroxybutyric acid. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 8, p. 770-782.
- Lenz, R.W., Marchessault, R.H. (2005)** Bacterial polyesters: biosynthesis, biodegradable plastics and biotechnology. *Biomacromolecules* 6, p. 1-8.
- Ley, C., Holtmann, D., Mangold, K.M., Schrader, J. (2011)** Immobilization of histidine-tagged proteins on electrodes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 88, p. 539– 551.
- Li, B., Zhang, Z. (2000)** Chemiluminescence flow biosensor for determination of total D-amino acid in serum with immobilized reagents. *Sens Actuators B: Chem* 69, p. 70-74.

- Li, J., Yang, Z., Tang, Y., Zhang, Y., Hu, X. (2013)** Carbon nanotubes-nanoflake-like SnS<sub>2</sub> nanocomposite for direct electrochemistry of glucose oxidase and glucose sensing. *Biosens Bioelectron.* 41, p. 698-703.
- Li, Y (2011)** Self-cleaving fusion tags for recombinant protein production. *Biotechnol Lett.* 33, p. 869-881.
- Lillehoj, E.P., Malik, V.S. (1989)** Protein purification. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 40, p. 19-71.
- Llull, D., López, R., García, E. (2006)** Characteristic signatures of the *lytA* gene provide a basis for rapid and reliable diagnosis of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* 44, p. 1250–1256.
- López-Gallego, F., Betancor, L., Mateo, C., Hidalgo, A., Alonso-Morales, N., Dellamora-Ortiz, G., Guisán, J.M., Fernandez-Lafuente, R. (2005)** Enzyme stabilization by glutaraldehyde crosslinking of adsorbed proteins on aminated supports. *J. Biotechnol.* 119, p. 70–75.
- López, R., García, E. (2004)** Recent trends on the molecular biology of pneumococcal capsules, lytic enzymes, and bacteriophage. *FEMS Microbiol Rev* 28, p. 553–580.
- López, R., García, E., García, P., García, J.L. (2004)** Cell wall hydrolases. In Tuomanen EI, Mitchell TJ, Morrison DA, Spratt BG (eds.): *The Pneumococcus*, ASM Press, Washington, D.C., p. 75–88.
- López, R., García, E., García, P., Ronda, C., Tomasz, A. (1982)** Choline-containing bacteriophage receptors in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* 151, p. 1581–1590.
- Lu, L., Zhao, M., Wang, T.N., Zhao, L.Y., Du, M.H., Li, T.L., Li, D.B. (2012)** Characterization and dye decolorization ability of an alkaline resistant and organic solvents tolerant laccase from *Bacillus licheniformis* LS04. *Bioresour Technol.* 115, p. 35-40.
- Lu, X.Y., Wu, D.C., Li, Z.J., Chen, G.Q. (2011)** Polymer nanoparticles. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 104, p. 299-323.
- Madison, L.L., Huisman, G.W. (1999)** Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiol Mol Biol Rev.* 63, p.21-53.
- Madoz, J., Kuznetsov, B.A., Medrano, F.J., García, J.L., Fernández, V.M. (1997)** Functionalization of gold surfaces for specific and reversible attachment of a fused  $\beta$ -galactosidase and choline-receptor protein. *J. Am. Chem. Soc.* 119, p. 1043-1051.
- Maestro, B., Galán, B., Alfonso, C., Rivas, G., Prieto, M.A., Sanz, J.M. (2013)** A new family of intrinsically disordered proteins: Structural characterization of the major phasin PhaF from *Pseudomonas putida* KT2440. *PLoS ONE* 8: e56904. doi:10.1371/journal.pone.0056904.
- Maestro, B., Sanz, J.M. (2007)** Novel approaches to fight *Streptococcus pneumoniae*. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov.* 2, p. 188-196.

- Maestro, B., Velasco, I., Castillejo, I., Arévalo-Rodríguez, M., Cebolla, A., Sanz, J.M. (2008)** Affinity partitioning of proteins tagged with choline-binding modules in aqueous two-phase systems. *J Chromatogr A*. 1208, p. 189-196.
- Majeau, J.A., Brar, S.K., Tyagi, R.D. (2010)** Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. *Bioresour Technol*. 101, p. 2331-2350.
- Marques, D., Pessela, B.C., Betancor, L., Monti, R., Carrascosa, A.V., Rocha-Martin, J., Guisán, J.M., Fernandez-Lorente, G. (2011)** Protein hydrolysis by immobilized and stabilized trypsin. *Biotechnol Prog*. 27, p. 677-683.
- Más sen, M., Liu, Z., Haruyama, T., Kobatake, E., Ikariyama, Y., Aizawa, M. (1995)** Immunosensing with amperometric detection, using galactosidase as label and p-aminophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside as substrate. *Analytica Chimica Acta* 304, p. 353-359.
- Mateo, C., Abian, O., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J.M. (2000)** Reversible enzyme immobilization via a very strong and nondistorting ionic adsorption on support-polyethylenimine composites. *Biotechnol. Bioeng.*, 68, p. 98–105.
- Mateo, C., Grazu, V., Palomo, J.M., Lopez-Gallego, F., Fernandez-Lafuente, R., Guisán, J.M. (2007a)** Immobilization of enzymes on heterofunctional epoxy supports. *Nat Protoc*. 2, p. 1022-1033.
- Mateo, C., Palomo, J.M., Fernandez-Lorente, G., Guisán, J.M., Fernandez-Lafuente, R. (2007b)** Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technol* 40, p. 1451–1463.
- McCool, G.J., Cannon, M.C. (1999)** Polyhydroxyalkanoate inclusion body-associated proteins and coding region in *Bacillus megaterium*. *J Bacteriol* 181, p. 585-592.
- Mejías, R., Pérez-Yagüe, S., Gutiérrez, L., Cabrera, L.I., Spada, R., Acedo, P., Serna, C.J., Lázaro, F.J., Villanueva, A., Morales, M., Barber, D.F. (2011)** Dimercaptosuccinic acid-coated magnetite nanoparticles for magnetically guided *in vivo* delivery of interferon gamma for cancer immunotherapy. *Biomaterials* 32, p. 2938-2952.
- Meng, F.G., Hong, Y.K., He, H.W., Lyubarev, A.E., Kurganov, B.I., Yan, Y.B., Zhou, H.M. (2004)** Osmophobic effect of glycerol on irreversible thermal denaturation of rabbit creatine kinase. *Biophys J*. 87, p. 2247-2254.
- Miller, J.H. (1972)** Assay of  $\beta$ -galactosidase, *In: Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Mishra, A., Kumar, S., Pandey, A. (2011)** Laccase production and simultaneous decolorization of synthetic dyes in unique inexpensive medium by new isolates of white rot fungus. *Int Biodeterioration & Biodegradation* 65, p. 487–493.
- Mittag, A., Tarnok, A. (2011)** Recent advances in cytometry applications: preclinical, clinical and cell biology. *In: Methods in cell biology* 103. Recent Advances in Cytometry, Part B:

- Advances in Applications (fifth edition) Edited by: Zbigniew Darzynkiewicz, Elena Holden, Alberto Orfao, William Telford, Donal Wlodkowic, p. 3-14. Academic press, Elsevier, EE.UU.
- Mohorčič, M., Friedrich, J., Pavko, A. (2004)** Decoloration of diazo dye reactive black 5 by immobilised *Bjerkandera adusta* in a stirred tank bioreactor. *Acta Chim. Slov.* 51, p. 619–628.
- Moldes, C. (2003)** Desarrollo de nuevos sistemas para la producción de proteínas de fusión por fermentación. Tesis Doctoral, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, España.
- Moldes, C., García, P., García, J.L., Prieto, M.A. (2004)** *In vivo* immobilization of fusion proteins on bioplastics by the novel tag BioF. *Appl Environ Microbiol.* 70, p. 3205-3212.
- Moldes, C., Farinós, G.P., de Eugenio, L.I., García, P., García, J.L., Ortego, F., Hernández-Crespo, P., Castañera, P.; Prieto, M.A. (2006)** New tool for spreading proteins to the environment: Cry1Ab toxin immobilized to bioplastics. *Appl Microbiol Biotechnol* 72, p. 88-93.
- Molina-Guijarro, J.M., Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., Guillén, F., Moya, R., Hernández, M., Arias, M.E. (2009)** Detoxification of azo dyes by a novel pH-versatile, salt-resistant laccase from *Streptomyces ipomoea*. *Int Microbiol.* 12, p. 13-21.
- Molina, R., González, A., Stelter, M., Pérez-Dorado, I., Kahn, R., Morales, M., Moscoso, M., Campuzano, S., Campillo, N.E., Mobashery, S., García, J.L., García, P., Hermoso, J.A. (2009)** Crystal structure of CbpF, a bifunctional choline-binding protein and autolysis regulator from *Streptococcus pneumonia*. *EMBO Rep.* 10, p. 246-251.
- Moreno-Guzmán, M., González-Cortés, A., Yáñez-Sedeño, P., Pingarrón, J.M. (2011)** A disposable electrochemical immunosensor for prolactin involving affinity reaction on streptavidin-functionalized magnetic particles. *Anal Chim Acta.* 692, p. 125-130.
- Moreno-Guzmán, M., Ojeda, I., Villalonga, R., González-Cortés, A., Yáñez-Sedeño, P., Pingarrón, J.M. (2012)** Ultrasensitive detection of adrenocorticotropin hormone (ACTH) using disposable phenylboronic-modified electrochemical immunosensors. *Biosens & Bioelectron* 35, p. 82-86.
- Moutaouakkil, A., Blaghen, M. (2011)** Decolorization of the anthraquinone dye Cibacron Blue 3G-A with immobilized *Coprinus cinereus* in fluidized bed bioreactor. *Prikl Biokhim Mikrobiol.* 47, p. 66-72.
- Moya, R., Hernández, M., García-Martín, A.B., Ball, A.S., Arias, M.E. (2010)** Contributions to a better comprehension of redox-mediated decoloration and detoxification of azo dyes by a laccase produced by *Streptomyces cyaneus* CECT 3335. *Bioresour Technol.* 101, p. 2224-2229.
- Murray, J., King, D. (2012)** Climate policy: oil's tipping point has passed. *Nature* 481, p. 433–435.

- Murugesan, K., Arulmani, M., Nam, I.H., Kim, Y.M., Chang, Y.S., Kalaichelvan, P.T. (2006)** Purification and characterization of laccase produced by a white rot fungus *Pleurotus sajor-caju* under submerged culture condition and its potential in decolorization of azo dyes. *Appl Microbiol Biotechnol.* 72, p. 939-946.
- Najdegerami, E.H., Tran, T.N., Defoirdt, T., Marzorati, M., Sorgeloos, P., Boon, N., Bossier, P. (2012)** Effects of poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) on Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) fingerlings performance and its gastrointestinal tract microbial community. *FEMS Microbiol. Ecol.* 79, p. 25–33.
- Nakagawa, T., Izawa, K., Yagi, S., Shibukawa, A., Tanaka, H., Tashima, T., Imai, M. (1989)** Development of effective cross-linking method for bioactive substance--enzyme immobilization using glutaraldehyde oligomers. *Chem Pharm Bull* 37, p. 2463-2466.
- Nishina, Y., Horiike, K., Shiga, K., Miyake, Y., Yamano, T. (1977)** Effect of halide anions on the binding of FAD to D-amino acid oxidase and the tryptophanyl fluorescence of the apoenzyme. *J Biochem.* 81, p. 1455-1463.
- Nyanhongo, G.S., Gomes, J., Gübitz, G.M., Zvauya, R., Read, J., Steiner, W. (2002)** Decolorization of textile dyes by laccases from a newly isolated strain of *Trametes modesta*. *Water Res.* 36, p. 1449-1456.
- Paillard, F. (1998)** Cancer gene therapy using oxidative stress. *Hum. Gene Ther.* 9, p. 159–160.
- Peoples, O.P., Saunders, C., Nichols, S., Beach, L. (2001)** Animal nutrition compositions. *US Patent* 06207217.
- Pereira, L., Coelho, A.V., Viegas, C.A., Santos, M.M., Robalo, M.P., Martins, L.O. (2009)** Enzymatic biotransformation of the azo dye Sudan Orange G with bacterial CotA-laccase. *J Biotechnol.* 139, p. 68-77.
- Pérez-Dorado, I., Galan-Bartual, S., Hermoso, J.A. (2012)** Pneumococcal surface proteins: when the whole is greater than the sum of its parts. *Mol Oral Microbiol.* 27, p. 221-245.
- Perlack, R.D., Wright, L.L., Turhollow, A., Graham, R.L., Stokes, B., Erbach, D.C. (2005)** Biomass as feedstock for a bioenergy and bioproducts industry: The technical feasibility of a billion-ton annual supply. *U.S. Department of Energy.* DOE/GO-102005-2135.
- Perler, F.B., Davis, E.O., Dean, G.E., Gimble, F.S., Jack, W.E., Neff, N., Noren, C.J., Thorner, J., Belfort, M. (1994)** Protein splicing elements: inteins and exteins--a definition of terms and recommended nomenclature. *Nucleic Acids Res.* 22, p.1125-1127.
- Peterson, A.A., Fischer, C.R. (2010)** Conversion of natural products including cellulose to hydrocarbons, hydrogen and/or other related compounds. *US Patent Application* 2010/0228067.
- Philip, S., Keshavarz, T., Roy, I. (2007)** Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. *J Chem Technol Biotechnol* 82, p. 233–247.

- Piscitelli, A., Pezzella, C., Giardina, P., Faraco, V., Giovanni, S. (2010)** Heterologous laccase production and its role in industrial applications. *Bioeng Bugs*. 1, p. 252-262.
- Pollegioni, L., Falbo, A., Pilone, M.S. (1992)** Specificity and kinetics of *Rhodotorula gracilis* D-amino acid oxidase. *Biochem Biophys Acta* 1120, p.11–16.
- Pollegioni, L., Molla, G. (2011)** New biotech applications from evolved D-amino acid oxidases. *Trends Biotechnol.* 29, p. 276-283.
- Pollegioni, L., Pilone, M.S. (1992)** Purification of *Rhodotorula gracilis* D-amino acid oxidase. *Protein Expression Purif* 3, p.165–167.
- Porath, J. (1992)** Immobilized metal ion affinity chromatography. *Protein Expr. Purif.* 3, p. 263–281.
- Pötter, M., Steinbüchel, A. (2005)** Poly(3-hydroxybutyrate) granule-associated proteins: impacts on poly(3-hydroxybutyrate) synthesis and degradation. *Biomacromolecules* 6, p. 552-560.
- Prieto, M.A., Bühler, B., Jung, K., Witholt, B., Kessler, B. (1999)** PhaF, a polyhydroxyalkanoategranule-associated protein of *Pseudomonas oleovorans* GP01 involved in the regulatory expression system for pha genes. *J Bacteriol* 181, p. 858-868.
- Qi, Q., Steinbüchel, A., Rehm, B.H. (2000)** *In vitro* synthesis of poly(3-hydroxydecanoate): purification and enzymatic characterization of type II polyhydroxyalkanoate synthases PhaC1 and PhaC2 from *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol* 54, p. 37-43.
- Qu, X.H., Wu, Q., Zhang, K.Y., Chen, G.Q. (2006)** In vivo studies of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) based polymers: biodegradation and tissue reactions. *Biomaterials* 27, p. 3540-3548.
- Raibekas, A.A., Massey, V. (1997)** Glycerol-assisted restorative adjustment of flavoenzyme conformation perturbed by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem.* 272, p. 22248-22252.
- Rasiah, I.A., Rehm, B.H. (2009)** One-step production of immobilized alpha-amylase in recombinant *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 75, p. 2012-2016.
- Roriz, M.S., Osma, J.F., Teixeira, J.A., Rodríguez-Couto, S. (2009)** Application of response surface methodological approach to optimise Reactive Black 5 decolouration by crude laccase from *Trametes pubescens*. *J Hazard Mater.* 169, p. 691-696.
- Rosenow, C., Ryan, P., Weiser, J.N., Johnson, S., Fontan, P., Ortqvist, A., Masure, H.R. (1997)** Contribution of novel choline-binding proteins to adherence, colonization and immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* 25, p. 819–829.
- Rosini, E., Molla, G., Rossetti, C., Pilone, M.S., Pollegioni, L., Sacchi, S. (2008)** A biosensor for all D-amino acids using evolved D-amino acid oxidase. *J Biotechnol.* 135, p. 377-384.

- Rosini, E., Pollegioni, L., Ghisla, S., Orru, R., Molla, G. (2009)** Optimization of D-amino acid oxidase for low substrate concentrations--towards a cancer enzyme therapy. *FEBS J.* 276, p. 4921-4932.
- Ruiz-Ruiz, F., Benavides, J., Aguilar, O., Rito-Palomares, M. (2012)** Aqueous two-phase affinity partitioning systems: current applications and trends. *J Chromatogr A.* 1244, p. 1-13.
- Rusmini, F., Zhong, Z., Feijen, J. (2007)** Protein immobilization strategies for protein biochips. *Biomacromolecules* 8, p. 1775-1789.
- Sacchi, S., Pollegioni, L., Pilone, M.S., Rossetti, C. (1998)** Determination of D-amino acids using a D-amino acid oxidase biosensor with spectrophotometric and potentiometric detection. *Biotechnol Tech* 12, p. 149-153.
- Sambrook, J., Russell, D.W. (2001)** Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sánchez-Puelles, J.M., Sanz, J.M., García, J.L., García, E. (1992)** Immobilization and single-step purification of fusion proteins using DEAE-cellulose. *Eur J Biochem* 203, p. 153-159.
- Santhanam, N., Vivanco, J.M., Decker, S.R., Reardon, K.F. (2011)** Expression of industrially relevant laccases: prokaryotic style. *Trends Biotechnol.* 10, p. 480-489.
- Sanz, J.M., López, R., García, J.L. (1988)** Structural requirements of choline derivatives for 'conversion' of pneumococcal amidase. A new single-step procedure for purification of this autolysin. *FEBS Lett.* 232, p. 308-312.
- Sarayu, K., Sandhya, S. (2012)** Current technologies for biological treatment of textile wastewater- a review. *Appl Biochem Biotechnol.* 167, p. 645-666.
- Sassolas, A., Blum, L.J., Leca-Bourier, B.D. (2012)** Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnol Adv.* 30, p.489-511.
- Scharnagl, C., Reif, M., Friedrich, J. (2005)** Stability of proteins: temperature, pressure and the role of the solvent. *Biochim Biophys Acta.* 1749, p. 187-213.
- Schröper, F., Baumann, A., Offenhäusser, A., Mayer, D. (2012)** Direct electrochemistry of novel affinity-tag immobilized recombinant horse heart cytochrome c. *Biosens Bioelectron* 34, p. 171-177.
- Schüth, F., Lu, A.H., Salabas, E.L. (2007)** Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application. *Angew Chem Int Ed Engl.* 46, p. 1222-1244.
- Sendil, D., Gürsel, I., Wise, D.L., Hasirci, V. (1999)** Antibiotic release from biodegradable PHBV microparticles. *J Control Release.* 59, p. 207-217.

- Serafín, V., Úbeda, N., Agüí, L., Yáñez-Sedeño, P., Pingarrón, J.M. (2012) Ultrasensitive determination of human growth hormone (hGH) with a disposable electrochemical magneto-immunosensor. *Anal Bioanal Chem.* 403, p. 939-946.
- Shi, C., Meng, Q., Wood, D.W. (2013) A dual ELP-tagged split intein system for non-chromatographic recombinant protein purification. *Appl Microbiol Biotechnol.* 97, p. 829-835.
- Singh, R.K., Tiwari, M.K., Singh, R., Lee, J.K. (2013) From protein engineering to immobilization: promising strategies for the upgrade of industrial enzymes. *Int J Mol Sci.* 14, p. 1232-1277.
- Singh, S.K., Grass, G., Rensing, C., Montfort, W.R. (2004) Cuprous oxidase activity of CueO from *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 186, p. 7815-7817.
- Smith, D.B., Johnson, K.S. (1988) Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* 67, p. 31-40.
- Somleva, M.N., Peoples, O.P., Snell, K.D. (2013) PHA bioplastics, biochemicals, and energy from crops. *Plant Biotechnol J.* 11, p. 233-252.
- Spahn, C., Minteer, S.D. (2008) Enzyme Immobilization in Biotechnology. *Recent Patents on Engineering* 2, p. 195-200.
- Sridewi, N., Lee, Y.F., Sudesh, K. (2011) Simultaneous adsorption and photocatalytic degradation of malachite green using electrospun P(3HB)-TiO<sub>2</sub> nanocomposite fibers and films. *Int J Photoenergy* 2011, Article ID 597854, doi:10.1155/2011/597854.
- Stegman, L.D., Zheng, H., Neal, E.R., Ben-Yoseph, O., Pollegioni, L., Pilone, M.S., Ross, B.D. (1998) Induction of cytotoxic oxidative stress by D-alanine in brain tumor cells expressing *Rhodotorula gracilis* D-amino acid oxidase: a cancer gene therapy strategy. *Hum Gene Ther.* 9, p. 185-193.
- Steinbüchel, A., Aerts, K., Babel, W., Follner, C., Liebergesell, M., Madkour, M.H., Mayer, F., Pieper-Furst, U., Pries, A., Valentin, H.E., et al. (1995) Considerations on the structure and biochemistry of bacterial polyhydroxyalkanoic acid inclusions. *Can J Microbiol.* 41, p. 94-105.
- Steinbüchel, A., Valentin, H.E (1995) Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiol Lett* 128, p. 219-228.
- Studier, F.W., Moffatt, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189, p. 113-130.
- Sudesh, K., Bhubalan, K., Chuah, J.A., Kek, Y.K., Kamilah, H., Sridewi, N., Lee, Y.F. (2011) Synthesis of polyhydroxyalkanoate from palm oil and some new applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 89, p. 1373-1386.

- Sudesh, K., Loo, C.Y., Goh, L.K., Iwata, T., Maeda, M. (2007)** The oil-absorbing property of polyhydroxyalkanoate films and its practical application: a refreshing new outlook for an old degrading material. *Macromol Biosci.* 7, p. 1199-1205.
- Sun, Q.Y., Hong, Y. Z., Xiao, Y. Z., Fang, W., Fang, J. (2009)** Decolorization of textile reactive dyes by the crude laccase produced from solid-state fermentation of agro-byproducts. *World J Microbiol Biotechnol.* 25, p. 1153-1160.
- Talbert, J.N, Goddard, J.M (2012)** Enzymes on material surfaces. *Colloids Surf B Biointerfaces* 93, p. 8-19.
- Terpe, K. (2003)** Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol.* 60, p. 523-533.
- Timasheff, S.N. (1998)** Control of protein stability and reactions by weakly interacting cosolvents: the simplicity of the complicated. *Adv Protein Chem.* 51, p. 355-432.
- Tishkov, V.I., Khoronenkova, S.V. (2005)** D-Amino acid oxidase: structure, catalytic mechanism, and practical application. *Biochemistry (Mosc)* 70, p. 40-54.
- Tomasz, A. (1967)** Choline in the cell wall of a bacterium: novel type of polymer-linked choline in *Pneumococcus*. *Science* 157, p. 694–697.
- Tomasz, A. (1968)** Biological consequences of the replacement of choline by ethanolamine in the cell wall of *Pneumococcus*: chain formation, loss of transformability, and loss of autolysis. *P Natl Acad Sci USA* 59, p. 86–93.
- Tosa, T., Mori, T., Fuse, N., Chibata, I. (1966)** Studies on continuous enzyme reactions. II. Preparation of DEAE-cellulose-aminoacylase column and continuous optical resolution of acetyl-DL-methionine. *Enzymologia.* 31, p. 225-38.
- Uhlén, M. (2008)** Affinity as a tool in life science. *BioTechniques* 44, p. 649–654.
- Uhlén, M., Guss, B., Nilsson, B., Gatenbeck, S., Philipson, L., Lindberg, M. (1984)** Complete sequence of the staphylococcal gene encoding protein A. A gene evolved through multiple duplications. *J. Biol. Chem.* 259, p. 1695-1702.
- Uhlén, M., Nilsson, B., Guss, B., Lindberg, M., Gatenbeck, S., Philipson, L. (1983)** Gene fusion vectors based on the gene for staphylococcal protein A. *Gene* 23, p. 369-378.
- US Department of Energy (2011)** US billion-ton update: Biomass supply for a bioenergy and bioproducts industry. R. D. Perlack and B. J. Stokes (Leads), ORNL/TM-2011/2224, 2227 p. Oak Ridge, TN: Oak Ridge National Laboratory.
- van Walsem, J., Anderson, E., Licata, J., Sparks, K.A., Mirley, C., Sivasubramanian, M.S. (2011)** Process for producing a monomer component from a genetically modified polyhydroxyalkanoate biomass. *International Patent Application* WO/2011/100608.

- Vashist, S.K., Zheng, D., Al-Rubeaan, K., Luong, J.H., Sheu, F.S. (2011) Advances in carbon nanotube based electrochemical sensors for bioanalytical applications. *Biotechnol Adv.* 29, p. 169-188.
- Verma, A.K., Dash, R.R., Bhunia, P. (2012) A review on chemical coagulation/flocculation technologies for removal of colour from textile wastewaters. *J Environ Manage.* 93, p. 154-168.
- Vian, A., Carrascosa, A.V., García, J.L., Cortés, E. (1998) Structure of the beta-galactosidase gene from *Thermus* sp. strain T2: expression in *Escherichia coli* and purification in a single step of an active fusion protein. *Appl Environ Microbiol.* 64, p. 2187-2191.
- Vollmer, W. (2007) Structure and biosynthesis of the pneumococcal cell wall. In: Mitchell, T.J., Morrison, D.A., Spratt, B.G. (eds). *Molecular Biology of Streptococci*. Norfolk: *Horizon Bioscience*, p. 83–118.
- Walter, H., Johansson, G., Brooks, D.E. (1991) Partitioning in aqueous two-phase systems: recent results. *Anal Biochem.* 197, p. 1-18.
- Wang, F., Min, Y., Geng, X. (2012a) Fast separations of intact proteins by liquid chromatography. *J Sep Sci.* 35, p. 3033-3045.
- Wang, H.H., Zhou, X.R., Liu, Q., Chen, G.Q. (2011a) Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate homopolymers by *Pseudomonas putida*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 89, p. 1497-1507.
- Wang, S.J., Yu, C.Y., Kuan, I.C. (2008a) Stabilization of native and double D-amino acid oxidases from *Rhodospiridium toruloides* and *Trigonopsis variabilis* by immobilization on streptavidin-coated magnetic beads. *Biotechnol Lett.* 30, p. 1973-1981.
- Wang, W., Zhang, Z., Ni, H., Yang, X., Li, Q., Li, L. (2012b) Decolorization of industrial synthetic dyes using engineered *Pseudomonas putida* cells with surface-immobilized bacterial laccase. *Microb Cell Fact.* 11:75.
- Wang, Y., Liu, L., Li, M., Xu, S., Gao, F. (2011b) Multifunctional carbon nanotubes for direct electrochemistry of glucose oxidase and glucose bioassay. *Biosens Bioelectron.* 30, p. 107-111.
- Wang, Z., Wu, H., Chen, J., Zhang, J., Yao, Y., Chen, G.Q. (2008b) A novel self-cleaving phasin tag for purification of recombinant proteins based on hydrophobic polyhydroxyalkanoate nanoparticles. *Lab Chip.* 8, p. 1957-1962.
- Waugh, D.S (2005) Making the most of affinity tags. *Trends Biotechnol.* 23, p. 316-320.
- Waugh, D.S (2011) An overview of enzymatic reagents for the removal of affinity tags. *Protein Expr Purif* 80, p. 283-293.
- Wesenberg, D., Kyriakides, I., Agathos, S.N. (2003) White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnol Adv.* 22, p. 161-187.

- Wieczozorek, R., Pries, A., Steinbüchel, A., Mayer, F. (1995)** Analysis of a 24-kilodalton protein associated with the polyhydroxyalkanoic acid granules in *Alcaligenes eutrophus*. *J Bacteriol* 177, p. 2425-2435.
- Wollenberger, U., Spricigo, R., Leimkühler, S., Schröder, K. (2008)** Protein electrodes with direct electrochemical communication. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 109, p. 19-64.
- Wood, D.W., Wu, W., Belfort, G., Derbyshire, V., Belfort, M. (1999)** A genetic system yields self-cleaving inteins for bioseparations. *Nat Biotechnol.* 17, p. 889-892.
- Wu, W.Y., Miller, K.D., Coolbaugh, M., Wood, D.W. (2011)** Intein-mediated one-step purification of *Escherichia coli* secreted human antibody fragments. *Protein Expr Purif* 76, p. 221-228.
- Xiong, Y.C., Yao, Y.C., Zhan, X.Y., Chen, G.Q. (2010)** Application of polyhydroxyalkanoates nanoparticles as intracellular sustained drug-release vectors. *J Biomater Sci Polym Ed.* 21, p. 127-140.
- Yang, X.D., Zou, X.H., Dai, Z.W., Luo, R.C., Wei, C.J., Chen, G.Q. (2009)** Effects of oligo(3-hydroxyalkanoates) on the viability and insulin secretion of murine beta cells. *J Biomater Sci Polym Ed.* 20, p. 1729-1746.
- Yoo, D., Lee, J.H., Shin, T.H., Cheon, J. (2012)** Theranostic magnetic nanoparticles. *Acc. Chem. Res.* 44, p. 863-874.
- York, G.M., Junker, B.H., Stubbe, J., Sinskey, A.J. (2001)** Accumulation of the PhaP phasin of *Ralstonia eutropha* is dependent on production of polyhydroxybutyrate in cells. *J Bacteriol* 183, p. 4217-4226.
- Young, C.L., Britton, Z.T., Robinson, A.S. (2012)** Recombinant protein expression and purification: a comprehensive review of affinity tags and microbial applications. *Biotechnol J.* 7, p. 620-634.
- Zaharia, C., Suteu, D. (2012)** Textile Organic Dyes – Characteristics, polluting effects and separation/elimination procedures from industrial effluents – A critical overview, in: Organic pollutants ten years after the Stockholm convention - Environmental and Analytical Update, Edited by Tomasz Puzyn, ISBN:978-953-307-917-2, InTech, p. 55-86.
- Zeng, J., Lin, X., Zhang, J., Li, X., Wong, M.H. (2011a)** Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the bacterial laccase CueO from *E. coli*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 89, p. 1841-1849.
- Zeng, X., Cai, Y., Liao, X., Zeng, X., Li, W., Zhang, D. (2011b)** Decolorization of synthetic dyes by crude laccase from a newly isolated *Trametes trogii* strain cultivated on solid agro-industrial residue. *J Hazard Mater.* 187, p. 517-525.

**Zheng, H., Wang, X., Chen, J., Zhu, K., Zhao, Y., Yang, Y., Yang, S., Jiang, W. (2006)** Expression, purification, and immobilization of his-tagged D-amino acid oxidase of *Trigonopsis variabilis* in *Pichia pastoris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 70, p. 683–689.

**Zinn, M., Witholt, B., Egli, T. (2001)** Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Adv Drug Deliv Rev.* 53, p. 5-21.

