

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE EDUCACIÓN A DISTANCIA  
MÁSTER UNIVERSITARIO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA QUÍMICA**

**TRABAJO DE FIN DE MÁSTER  
PROYECTO DE INVESTIGACIÓN  
MÓDULO DE QUÍMICA ORGÁNICA**

**SÍNTESIS EN UN SOLO PASO DE NUCLEÓTIDOS DE  
INTERÉS EN LA DIETA MEDIANTE UN  
BIOCATALIZADOR MAGNÉTICO**

**Autor: Jon del Arco Arrieta**

**Tutora: Rosa M<sup>a</sup> Claramunt Vallespí**

**Director: Jesús Fernández Lucas**

# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	8
1.1 Biotecnología blanca y biotransformaciones.....	8
1.2. Organismos extremófilos.....	8
1.2.1. Organismos termófilos.....	9
1.3. Nucleósidos y nucleósidos-5'-monofosfato.....	11
1.3.1. Aplicaciones y síntesis enzimática de los nucleósidos-5'-monofosfato.....	14
1.4. Purina y pirimidina fosforribosiltransferasas: conceptos generales.....	15
1.4.1. Purina fosforribosiltransferasas.....	16
1.4.2. Hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa.....	17
1.5. Inmovilización de enzimas.....	18
1.5.1. Inmovilización por retención física.....	19
1.5.2. Inmovilización por unión química.....	20
2. OBJETIVOS.....	23
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
3.1. Material químico y medios de cultivo.....	24
3.2. Producción y purificación de <i>TtHGXPR</i> T.....	24
3.2.1. Expresión de <i>TtHGXPR</i> T en <i>E.coli</i> BL21 (DE3).....	24
3.2.2. Purificación de la enzima.....	25
3.2.2.1. Electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).....	25
3.4. Inmovilización enzimática.....	26
3.5. Ensayo de actividad enzimática.....	27
3.6. Caracterización bioquímica de la enzima libre e inmovilizada.....	27
3.7. Termoestabilidad de la enzima libre y del derivado inmovilizado.....	28
3.8. Reutilizaciones del derivado inmovilizado.....	28
3.9. Producción de IMP y GMP mediante el derivado inmovilizado.....	28
3.10. Métodos analíticos.....	28
3.11. Predicción estructura tridimensional.....	29
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
4.1. Sobreexpresión y purificación de <i>TtHGXPR</i> T.....	29
4.2. Caracterización bioquímica de <i>TtHGXPR</i> T.....	31
4.3. Inmovilización covalente de <i>TtHGXPR</i> T.....	32
4.3.1. Optimización de la carga enzimática.....	36
4.3.2. Caracterización bioquímica del derivado <i>MTtHGXPR</i> T.....	37
4.3.3. Termoestabilidad de los derivados inmovilizados.....	39

4.3.4. Reutilización del derivado.....	40
4.4. Evaluación del ratio molar.....	41
4.5. Síntesis enzimática de IMP y GMP.....	42
5. CONCLUSIONES.....	44
6. REFERENCIAS.....	45

## GLOSARIO DE ABREVIATURAS

**TtHGXPRT:** hipoxantina-guanina-xantina fosforribosiltransferasa de *Thermus thermophilus*

**MtHGXPRT:** derivado inmovilizado de hipoxantina-guanina-xantina fosforribosiltransferasa de *Thermus thermophilus*

**HGXPRT:** hipoxantina-guanina-xantina fosforribosiltransferasa

**HGPRT:** hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa

**HPRT:** hipoxantina fosforribosiltransferasa

**XPRT:** xantina fosforribosiltransferasa

**GPRT:** guanina fosforribosiltransferasa

**OPRT:** orotato fosforribosiltransferasa

**APRT:** adenina fosforribosiltransferasa

**PRT:** fosforribosiltransferasa

**NK:** nucleósido quinasa

**NP:** nucleósido fosforilasa

**NDT:** 2'-desoxirribosiltransferasa

**NMP:** nucleósido-5'-monofosfato

**dNMP:** 2'-desoxinucleósidos-5'-monofosfato

**dNTP:** 2'-desoxinucleósidos-5'-trifosfato

**GMP:** guanosina-5'-monofosfato

**IMP:** inosina-5'-monofosfato

**XMP:** xantina-5'-monofosfato

**TMP:** timidina-5'-monofosfato

**CMP:** citidina-5'-monofosfato

**CTP:** citidina-5'-trifosfato

**NaCl:** cloruro de sodio

**Mg:** magnesio

**MgCl<sub>2</sub>:** cloruro de magnesio

**PRPP:** 5'-fosfo- $\alpha$ -D-ribosil-1-difosfato

**PPi:** pirofosfato

**IPTG:** isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido

**Gua:** guanina

**Hyp:** hipoxantina

**Xan:** xantina

**ADN:** ácido desoxirribonucleico

**ARN:** ácido ribonucleico

**CLEAs:** *Cross-Linked Enzyme Aggregate*

**CLECs:** *Cross-Linked Enzyme Crystals*

**DO<sub>600</sub>:** densidad óptica a 600 nm

**HPLC:** *High Performance Liquid Chromatography* (cromatografía líquida de alta eficacia)

**IU:** unidades internacionales

**LB:** medio Luria-Bertani

**Lys:** lisina

**RPM:** revoluciones por minuto

**SDS:** *Sodium Dodecyl Sulfate* (dodecilsulfato sódico)

**SDS-PAGE:** *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico)

**TEMED:** N,N,N',N'-tetrametiletildiamina

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Biotecnología blanca y biotransformaciones

Durante muchos años, la biotecnología ha sido aplicada a una amplia gama de procesos industriales. Dentro de la misma podemos diferenciar varios tipos de biotecnología dependiendo del sector en el que esté centrada. La biotecnología blanca se refiere a la biotecnología industrial, donde células vivas enteras y/o sus enzimas se emplean para fabricar diversos productos biológicos de interés en diferentes sectores. En concreto, las enzimas bacterianas han sido ampliamente empleadas en la industria química, farmacéutica, alimentaria, textil, papelera, energética, etc.

Durante los últimos años, el aumento de los precios de la energía y los temores sobre la seguridad energética, entre otros, han implicado una renovación de la conciencia ambiental mundial. En este sentido, la biotecnología blanca se encuentra en pleno auge, ya que está basada en el desarrollo de procedimientos industriales sostenibles para reducir los requerimientos energéticos y la cantidad de residuos producidos. Además, presenta beneficios adicionales en comparación con los procesos químicos convencionales: mayor rendimiento y velocidad de reacción, conversión más eficaz y la obtención de un producto de mayor pureza.

En este sentido, la biotecnología blanca puede ser dividida en la biocatálisis y en la tecnología fermentativa. La biocatálisis se basa en el empleo de enzimas que catalizan diferentes reacciones químicas, mientras que la tecnología fermentativa utiliza microorganismos completos para fines industriales. Además, en ambos casos es habitual utilizar técnicas complementarias como la genética molecular, ingeniería enzimática e ingeniería metabólica con el objetivo de mejorar los procesos industriales. Respecto a la biocatálisis, a escala industrial la mejor alternativa suele ser la inmovilización del biocatalizador. Por una parte, en muchos casos, este proceso aumenta la estabilidad de la enzima. Por otra parte, el uso de enzimas inmovilizadas permite la reutilización del catalizador y una mejor separación del biocatalizador de los productos finales. Dichas ventajas suponen un ahorro energético y económico en los procesos industriales.

## 1.2. Organismos extremófilos

Algunos factores ambientales afectan directamente a la actividad y a la evolución de los seres vivos. La mayoría de los organismos están adaptados a condiciones que consideramos "estándar" cuyos valores son aplicables a las condiciones de vida humana: temperaturas que oscilan entre 20 y 25 °C, valores de neutros de pH, presión atmosférica y atmósfera oxidante. Sin embargo, desde que Thomas Brock introdujo el concepto de

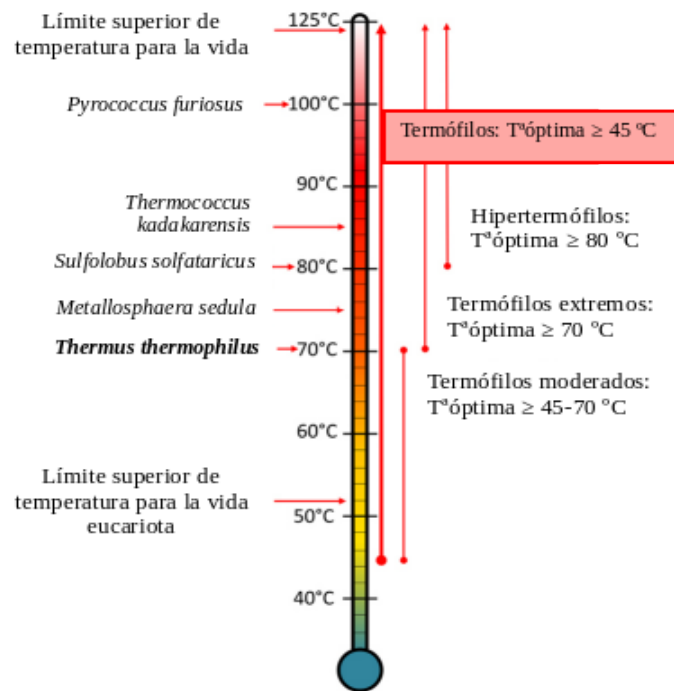
termofilia<sup>1</sup>, se han descrito diversos organismos capaces de adaptarse a condiciones radicalmente diferentes al estándar mencionado. Conocidos como extremófilos, algunos de estos organismos han sufrido adaptaciones tan significativas en sus mecanismos moleculares que se han vuelto dependientes de tales condiciones. En general, los extremófilos pertenecen a los dominios Archaea y Bacteria, debido a su flexibilidad genética y a sus cortos tiempos de generación, los procesos evolutivos de adaptación y selección en estos microorganismos se han visto acelerados.

Las adaptaciones encontradas en estos extremófilos cubren un amplio espectro de variables fisicoquímicas que permiten su clasificación. Por lo tanto, atendiendo a la temperatura óptima de crecimiento, los organismos psicrófilos viven por debajo de los 20 °C (por ejemplo los géneros *Pseudoalteromonas* o *Shewanella*) y los mesófilos entre 20 y 40 °C. Finalmente, cuando la temperatura de crecimiento supera los 40 °C, se distinguen diferentes grados de termófilos (por ejemplo *Thermus* o *Pyrolobus*). Hablamos de halófilos cuando habitan en entornos de alta fuerza iónica (por ejemplo *Halomonas*), acidófilos o alcalófilos cuando habitan en pH extremos (*Acidiphilium* o *Bacillus*) o piezófilos cuando crecen a altas presiones (*Colwellia* por ejemplo). Finalmente, los xerófilos (metalófilos o microaerófilos) crecen en condiciones de baja humedad. Además, un hábitat extremo a menudo presenta múltiples condiciones simultáneamente, por lo que hay muchos ejemplos de extremófilos “múltiples”<sup>2</sup>.

Los métodos enzimáticos han reemplazado los procedimientos químicos para la síntesis de diferentes compuestos, ya que son metodologías más eficientes y sostenibles. Aunque presentan varias ventajas, estos procedimientos no siempre pueden ser aplicados a nivel industrial. De hecho, en ocasiones se requieren condiciones de reacción drásticas: altas temperaturas y valores de pH para la solubilización de los sustratos, por ejemplo. En general, las enzimas mesófilas no son capaces de resistir estas condiciones tan duras. De esta forma, debido a su adaptación a ambientes extremos, el uso de enzimas provenientes de organismos extremófilos ha demostrado ser una interesante alternativa en estos casos.

### 1.2.1. Organismos termófilos

Entre los diferentes tipos de extremófilos, los termófilos han demostrado ser de especial interés para la comunidad científica en las últimas décadas debido a sus implicaciones evolutivas y bioquímicas. Estos microorganismos se encuentran en áreas volcánicas y fuentes hidrotermales, por lo que están adaptados para vivir a altas temperaturas. Dependiendo de su temperatura óptima de crecimiento, pueden clasificarse en termófilos moderados (45-65 °C), termófilos extremos (65-80 °C) e hipertermófilos (> 80 °C)<sup>3</sup> (Figura 1).



**Figura 1.** Organismos termófilos y su temperatura óptima de crecimiento<sup>4</sup>.

En las especies termófilas conocidas hasta la fecha se ha observado una gran variedad de metabolismos, se han encontrado cepas tanto aerobias como anaerobias, además de metabolismos que van desde quimiotácticos a heterotróficos<sup>5</sup>. Dicha variedad, junto con el creciente número de genomas secuenciados, muestra el gran potencial de estos microorganismos como fuente de enzimas con interesantes propiedades para su aplicación a los procesos de biocatálisis. Estos microorganismos suelen pertenecer a los dominios Bacteria y Archaea, siendo las especies Archaea las que presentan las temperaturas de crecimiento óptimo más altas. *Pyrolobus fumarii*, por ejemplo, puede crecer a una temperatura máxima de 113 °C<sup>6</sup>. Actualmente, el límite superior de vida está representado por la Archaea llamada cepa 121, capaz de crecer a 121 °C (condiciones de laboratorio)<sup>7</sup>.

Dentro de los microorganismos termófilos, *Thermus* es uno de los géneros más estudiados. De hecho, en la actualidad, cientos de cepas pertenecientes a este género han sido estudiadas y aisladas de diferentes partes del planeta<sup>8</sup>. Estos son bacilos inmóviles de tinción Gram-negativa que crecen formando filamentos concatenados en cultivos exponenciales. Cuando alcanzan la fase estacionaria, los filamentos son separados por fisión binaria. Además, estos organismos tienden a acumular carotenoides que les dan un color amarillo anaranjado. En general son aerobios, por lo que el oxígeno es el único aceptor



de electrones que permite el crecimiento en muchas cepas<sup>9</sup>. Sin embargo, también se han descrito cepas anaerobias facultativas de *Thermus thermophilus*, pudiendo crecer en anaerobiosis por desnitrificación parcial o total<sup>10</sup>.

Los estudios comparativos del 16S rRNA y de las secuencias de proteínas han relacionado a los miembros de este género con el género *Deinococcus*. Ambos géneros pertenecen a una rama filogenética independiente del árbol evolutivo bacteriano<sup>11-14</sup>. Después de divergir de un ancestro mesófilo, *Thermus* adquirió su carácter termófilo mediante la transferencia horizontal de genes tanto de bacterias como de arqueas hipertermófilas. Sin embargo, *Deinococcus* mantuvo su carácter mesófilo y adquirió otras resistencias que están codificadas en algunos genes adaptativos ubicados en un plásmido muy variable<sup>13</sup>.

En general, los microorganismos que pertenecen a este género son fáciles de cultivar y mantener a escala de laboratorio. Además, pueden incorporar ADN exógeno de hasta 40 kb.s<sup>-1</sup> y sus proteínas pueden cristalizarse fácilmente<sup>15</sup>. Estas características, junto con la gran disponibilidad de sus genomas en las bases de datos, han convertido a *Thermus* en un modelo ideal para el estudio de las bases moleculares de la termofilia. De hecho, se ha desarrollado un programa de genómica estructural dedicado a la cepa HB8 de *T. Thermophilus*<sup>16</sup>. Por otra parte, el uso de enzimas termoestables en la industria permite trabajar a temperaturas elevadas con las ventajas que ello conlleva:

1. Se produce una disminución de la viscosidad del medio de reacción, lo que supone un ahorro energético al necesitar una agitación y aireación menos vigorosa.
2. Se reduce el riesgo de contaminación por microorganismos mesófilos que no crecen a elevadas temperaturas.
3. Tiene lugar un aumento de la biodisponibilidad y solubilidad de los compuestos orgánicos.
4. Aumenta el coeficiente de difusión de los sustratos y productos que resultan de altas tasas de reacción .

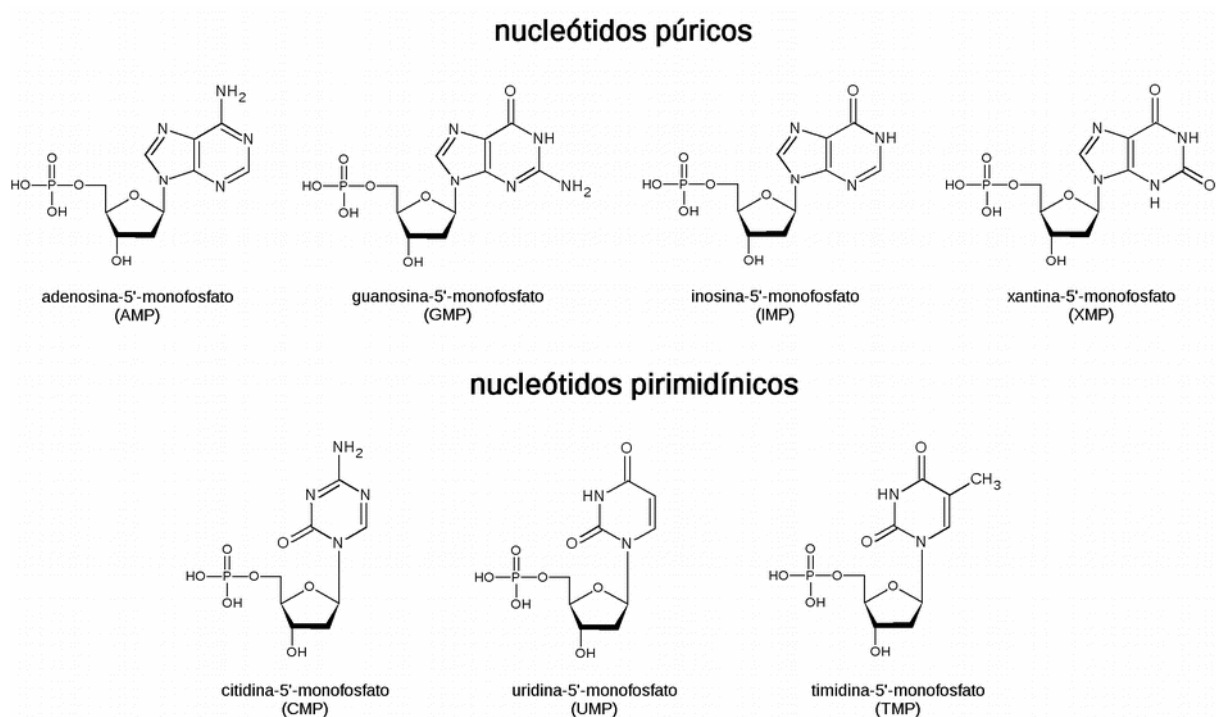
Más concretamente, las bases púricas presentan una solubilidad muy baja a temperatura ambiente y medio acuoso por lo que es muy interesante el uso de enzimas provenientes de organismos termófilos a la hora de trabajar con este tipo de bases.

### 1.3. Nucleósidos y nucleósidos-5'-monofosfato

Los nucleótidos o nucleósidos-5'-monofosfato son metabolitos esenciales en los metabolismos celulares. Actúan como señales químicas en respuesta a hormonas y otros estímulos extracelulares, además de ser componentes estructurales de algunos cofactores

enzimáticos e intermediarios metabólicos. Finalmente, los nucleótidos son los constituyentes de los ácidos nucleicos, ADN y ARN, involucrados en el almacenamiento y la transferencia de información genética. Recordemos que la estructura de todas las biomoléculas y cada uno de los componentes celulares está directamente relacionada con la información programada en la secuencia de nucleótidos de los ácidos nucleicos de la célula.

Los nucleótidos (Figura 2) están formados por tres componentes: una base nitrogenada, una pentosa y un fosfato. Cuando la molécula carece del grupo fosfato, se la conoce como nucleósido, y por lo tanto, un nucleósido-5'-monofosfato (NMP) se refiere a un nucleótido. Tanto las pentosas como las bases nitrogenadas presentes en los NMPs comunes son compuestos heterocíclicos. Este último está unido covalentemente al carbono 1' de la pentosa mediante un enlace N-β-glicosídico, mientras que el grupo fosfato está esterificado con el carbono 5'. Finalmente, las nucleobases se derivan de dos compuestos parentales: pirimidina y purina. En los sistemas vivos existen dos vías de síntesis para estos productos:



**Figura 2.** Nucleótidos púricos y pirimidínicos.

- **Síntesis de novo.** La ribosa-5'-fosfato se obtiene de la ruta de las pentosas fosfato mientras que el anillo de purina o pirimidina es sintetizado utilizando precursores de bajo peso molecular. En función de la naturaleza de la base (púrica o pirimidínica), se distinguen dos tipos de rutas:

- Síntesis de *novο* de purinas. El anillo de purina es sintetizado a partir de los siguientes precursores: glicina, aspartato, glutamina, tetrahidrofolato y CO<sub>2</sub>. Para comenzar, se obtiene el 5'-fosfo-α-D-ribosil-1-difosfato (PRPP), intermediario activado de la ribosa-5'-fosfato. Después, la síntesis del anillo púrico ocurre por la acción de una serie de reacciones catalizadas por enzimas, en consecuencia se obtiene el ácido inosínico o inosina-5'-monofosfato (IMP). A partir del IMP se da la síntesis de la guanosina-5'-monofosfato (GMP) y adenosina-5'-monofosfato (AMP).
- Síntesis de *novο* de pirimidinas. Para la formación del anillo de pirimidina se parte de los siguientes precursores: glutamina, aspartato y bicarbonato. En este caso, para empezar, se sintetiza el anillo pirimidínico mediante la formación del carbamoil aspartato. Después, mediante una serie de reacciones el anillo sintetizado es unido al PRPP. Se obtiene uridina-5'-monofosfato (UMP) que actúa como precursor de la timidina-5'-monofosfato (TMP) y la citidina-5'-monofosfato (CMP).
- **Síntesis a través de rutas de salvamento.** Como en el caso anterior, la ribosa-5'-fosfato proviene de la ruta de las pentosas fosfato. Sin embargo, la base nitrogenada se obtiene a partir de la reutilización de las bases tanto púricas como pirimidínicas, provenientes de la degradación de los ácidos nucleicos. Mediante una serie de reacciones de fosforribosilación dichas bases nitrogenadas libres son convertidas en sus correspondientes nucleósidos-5'-monofosfato. Estas reacciones de fosforribosilación son catalizadas por enzimas pertenecientes a la familia de las fosforribosiltransferasas, las cuales requieren Mg<sup>2+</sup> como cofactor.
  - Ruta de salvamento de purinas. En esta ruta toman parte dos enzimas: hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (HGPRT) y adenina fosforribosiltransferasa (APRT). Estas enzimas son responsables de la transferencia del grupo fosforribosil del PRPP a la base púrica correspondiente (adenina o hipoxantina), siempre en presencia de Mg<sup>2+</sup>. Como resultado de esta reacción se obtienen los nucleósidos-5'-monofosfato AMP o IMP y el pirofosfato (PPi).
  - Ruta de salvamento de pirimidinas. En esta ruta están implicadas las siguientes enzimas: orotato fosforribosiltransferasa (OPRT) y uracilo fosforribosiltransferasa (UPRT). La UPRT cataliza la formación de UMP y PPi en presencia de Mg<sup>2+</sup>. Así, el UMP puede ser fosforilado para la obtención de su forma trifosfato y posteriormente formar también la citidina-5'-trifosfato (CTP). Sin embargo, la OPRT, es responsable de la formación de la orotidina-5'-monofosfato (OMP) y PPi en presencia de Mg<sup>2+</sup>.

### 1.3.1. Aplicaciones y síntesis enzimática de los nucleósidos-5'-monofosfato

Debido a que los derivados de los ácidos nucleicos juegan un papel clave en diversos procesos bioquímicos, son moléculas especialmente interesantes para el tratamiento de algunas enfermedades humanas, como el cáncer, las infecciones parasitarias y las enfermedades virales<sup>17-19</sup>. La mayoría de los análogos de nucleósidos son profármacos para nucleótidos, generados por fosforilación intracelular del grupo 5'-hidroxilo, dando como resultado los correspondientes nucleósidos mono-, di- o trifosfato. En este sentido, la disponibilidad de análogos de nucleósidos-5'-monofosfato sintéticos permite el estudio de las relaciones estructura-actividad, la cinética y otras consecuencias metabólicas de la administración de nucleósidos. Además, los 2'-desoxinucleósidos-5'-monofosfato (dNMP) son precursores básicos de los correspondientes 2'-desoxinucleósidos-5'-trifosfato (dNTP), ampliamente utilizados como reactivos químicos y bioquímicos en experimentos de biología molecular.

Finalmente, los nucleósidos-5'-monofosfato también tienen su aplicación como aditivos alimentarios. Por ejemplo, algunos NMPs, como el ácido inosínico o inosina-5'-monofosfato y el ácido guanosínico o guanosina-5'-monofosfato (Figura 2), son aditivos comunes utilizados como potenciadores del sabor en los alimentos. Estas moléculas son responsables de inducir una sensación a sabor umami en los alimentos<sup>20</sup>. Además, ya se han descrito los efectos positivos que puede tener la suplementación de la dieta con NMPs en el crecimiento y desarrollo del sistema inmune en recién nacidos<sup>21</sup>. Como resultado de la relevancia económica y social de este tipo de compuestos, la demanda actual de NMPS está aumentando significativamente. Por lo tanto, el desarrollo de metodologías sintéticas estereoselectivas, sostenibles y baratas se ha vuelto una necesidad relevante para la industria.

Los NMPs pueden producirse utilizando métodos químicos y biológicos, incluida la reacción enzimática y la fermentación. La síntesis química de NMPs se realiza rutinariamente mediante la 5'-fosforilación del nucleósido precursor. A menudo estos procesos requieren del uso de reactivos químicos (cloruro de fosforilo,  $\text{POCl}_3$  o pentóxido de fósforo,  $\text{P}_2\text{O}_5$ ), condiciones ácidas y disolventes orgánicos, que son caros y nocivos para el medioambiente<sup>22</sup>. De hecho, la glicosilación química del nucleósido precursor a menudo requiere de múltiples pasos, que incluyen reacciones de desprotección y protección de grupos en la base heterocíclica y/o en la molécula de ribosa, para permitir la modificación de los nucleósidos naturales<sup>23</sup>. Además, estas metodologías necesitan el control exhaustivo de la regio- y estereoselectividad para la formación del enlace glicosídico C-N. Debido a estos factores, la síntesis química de NMPs generalmente proporciona bajos rendimientos

globales, baja pureza del producto final. Estos procesos químicos también se asocian con condiciones de reacción extremas y con problemas de eliminación de desechos<sup>22,24</sup>. En consecuencia, dichos inconvenientes conducen a un alto precio de los nucleósidos y NMPs, impidiendo sus ensayos y estudios biológicos, así como limitando su amplia aplicación terapéutica.

El uso de enzimas como catalizadores industriales (biotecnología blanca) puede proporcionar esquemas sintéticos novedosos y sencillos. Además se postulan como metodologías adecuadas y eficientes para el desarrollo procesos industriales sostenibles. Como resultado, se pueden obtener productos de alta calidad mediante procesos económicos y tecnológicamente competitivos. El uso de enzimas en la síntesis orgánica (biocatálisis) está aumentando en un intento de lograr una "química sostenible", en particular cuando la producción industrial tiene que lidiar con un alto impacto ambiental. En este marco, la síntesis enzimática de los NMPs es un campo atractivo, ya que las biotransformaciones muestran muchas ventajas en comparación con los métodos químicos. Permiten reacciones de un solo paso utilizando condiciones suaves, alta estereo- y regioselectividad, y son una tecnología respetuosa con el medio ambiente. Entonces, dado que las metodologías basadas en enzimas han simplificado enormemente las estrategias sintéticas, la síntesis química de NMPs está siendo reemplazada por enfoques enzimáticos o quimio-enzimáticos. Para este fin, diferentes tipos de enzimas han sido empleadas como catalizadores para la síntesis mono o multi-enzimática de NMPs<sup>25-27</sup>, incluyendo nucleósido quinasas (NKs)<sup>24-29</sup>, fosfotransferasas (AP/Ptasas)<sup>30</sup>, 5'-fosfodiesterasas<sup>31-32</sup> o fosforribosiltransferasas (PRTs)<sup>33-34</sup>. Entre las enzimas mencionadas, en el presente trabajo se utilizó una hipoxantina-guanina-xantina fosforribosiltransferasa (HGXPRT) como biocatalizador eficiente para la síntesis de NMPs de interés en la industria alimentaria (IMP y GMP).

#### 1.4. Purina y pirimidina fosforribosiltransferasas: conceptos generales

El metabolismo de las purinas es una ruta metabólica de vital importancia en todos los organismos vivos, ya que las purinas son esenciales para la síntesis de ácidos nucleicos, proteínas y otros metabolitos. Tal y como mencionamos anteriormente, en la vía de novo, las células usan precursores simples como glicina, glutamina o aspartato para la síntesis de diferentes nucleótidos púricos. Por el contrario, la ruta de salvamento está compuesta por un grupo de rutas de reciclaje mediante las cuales la célula puede satisfacer sus necesidades de purinas a partir de fuentes endógenas y/o exógenas. En este sentido, numerosas enzimas de la ruta de salvamento de purinas se han convertido en valiosos catalizadores para la síntesis de derivados de los ácidos nucleicos, tales como nucleósido quinasas (NKs)

<sup>24-29</sup>, fosforribosiltransferasas (PRTs)<sup>35-38</sup>, nucleósido fosforilasas (NPs)<sup>39-42</sup> y 2'-desoxirribosiltransferasas (NDTs)<sup>23,43-45</sup>, entre otros.

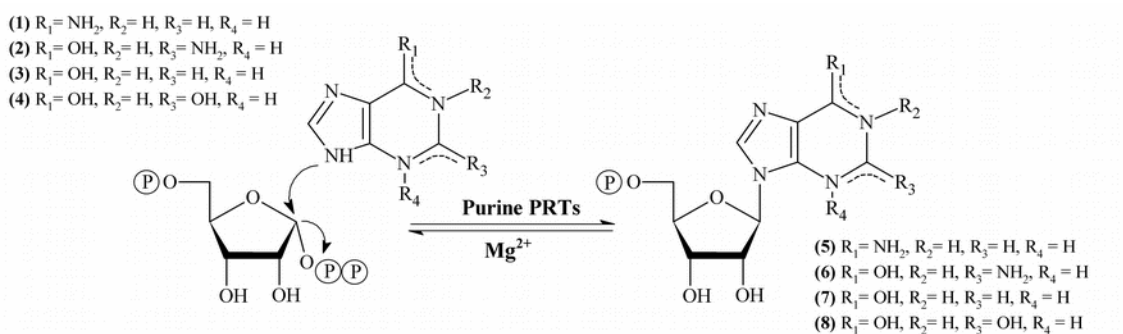
Las fosforribosiltransferasas de purinas y pirimidinas (PRTs) catalizan la transferencia reversible del grupo 5'-fosforribosil del 5'-fosfo- $\alpha$ -D-ribosil-1-pirofosfato (PRPP) a nucleobases o a sus derivados en presencia de  $Mg^{2+}$ . Están involucrados en la formación de los enlaces glicosídicos C-N en los NMPs, tanto en la ruta de salvamento como en la *de novo*, por lo que son esenciales para la síntesis de ácidos nucleicos (ARN y ADN)<sup>46-49</sup>. Respecto a la cinética de la reacción, se han propuesto varios mecanismos basándose en los datos experimentales. Por un lado, la transferencia del grupo 5'-fosforribosil del PRPP a la nucleobase correspondiente parece catalizarse siguiendo un mecanismo ordenado secuencial, en el que la unión al PRPP es seguida por el ataque a la nucleobase, el PPI se libera permitiendo la formación del correspondiente NMP<sup>50-51</sup>. Algunos ejemplos son la UPRT de *Bacillus caldolyticus*, *E. coli* o *Mycobacterium tuberculosis*<sup>50-51</sup>, y la HGPRT de *Homo sapiens* y *Tritrichomonas foetus*<sup>52-53</sup>. Por otro lado, algunas PRTs, como la OPRT de *Plasmodium falciparum* y *S. typhimurium*, parecen seguir un mecanismo cinético secuencial aleatorio<sup>54-55</sup>. Sin embargo, la hipótesis más aceptada es en la que la reacción procede por la unión secuencial ordenada de los sustratos y la liberación ordenada de los productos. Es interesante observar que el PRPP se une a la enzima en asociación con un ion metálico divalente, generalmente  $Mg^{2+}$ . Un primer  $Mg^{2+}$  es quelado con el grupo pirofosforilo (sitio metálico 1), mientras que un segundo  $Mg^{2+}$  (sitio metálico 2) o un aminoácido básico ayuda a estabilizar el grupo pirofosforilo. Además, este segundo  $Mg^{2+}$  o aminoácido básico contribuye a una orientación adecuada de la base para que la catálisis tenga lugar<sup>56-58</sup>.

Las PRTs muestran una estructura cuaternaria singular, ya que no se conocen PRTs monoméricas y en la mayoría de los casos, la región central de la PRT es parte de una interfaz entre dímeros en la que un residuo básico de cada monómero está en contacto con  $Mg\cdot PRPP$  en la subunidad adyacente. Sin embargo, a pesar de estas interacciones cruzadas entre subunidades, la mayoría de las PRTs no muestran un mecanismo cooperativo en la unión  $Mg\cdot PRPP$ . Además, solo unas pocas proteínas de la familia de las PRTs, como la UPRT de *E. coli*<sup>59</sup>, *Sulfolobus shibatae*<sup>60</sup> muestran fenómenos alostéricos.

#### 1.4.1. Purina fosforribosiltransferasas

Las PRTs específicas para purinas catalizan la transferencia reversible del grupo 5'-fosforribosilo del PRPP al N9 de bases 6-amino o 6-oxopúricas, como adenina (1), hipoxantina (2), guanina (3) y xantina (4), en presencia de  $Mg^{2+}$ , obteniendo adenosina-5'-monofosfato, AMP (5), inosina-5'-monofosfato, IMP (6), guanosina-5'-monofosfato, GMP (7) o xantina-5'-monofosfato, XMP (8) respectivamente<sup>61</sup> (Esquema 1). La especificidad de las

PRTs varía según la naturaleza de la especie, pero en todos los casos, la actividad para adenina es distinta de la actividad sobre hipoxantina, guanina o xantina. En este sentido, según su especificidad de sustrato, las PRTs de purinas se clasifican en dos clases generales: por una parte, PRTs de 6-aminopurina (APRT), estrictamente específicas para 6-aminopurinas, como la adenina, 2-fluoroadenina o 2-cloroadenina<sup>62-64</sup>. Por otra parte, las PRTs para 6-oxopurinas (HPRT, GPRT, XPRT, HGPRT o HGXPRT), capaces de reconocer diferentes 6-oxopurinas, tales como hipoxantina, guanina, xantina y otros análogos de 6-oxo y 6-mercaptopurina<sup>33-34,62-64</sup>.



**Esquema 1.** Síntesis enzimática de nucleósidos-5'-monofosfato catalizado por fosforribosiltransferasas.

#### 1.4.2. Hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa

La hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (EC 2.4.2.8, HGPRT) es una de las enzimas más importantes de la ruta de salvamento de purinas<sup>46</sup>. Cataliza la transferencia reversible del grupo 5'-fosforribosilo del PRPP al N9 de las bases 6-oxopúricas hipoxantina (2) y guanina (3) para formar IMP (6), GMP (7), respectivamente, en presencia de  $\text{Mg}^{2+}$  (Esquema 1). Además, en algunas especies esta enzima es capaz de actuar sobre la base púrica xantina (4), obteniendo xantina-5'-monofosfato, XMP (8). Por lo tanto, esta enzima se clasifica dentro de las 6-oxopurina fosforribosiltransferasas, las fosforribosiltransferasas más abundantes en los organismos<sup>38</sup>.

Respecto a su estado oligomérico en solución, se ha descrito la presencia de HGXPRTs diméricas y tetraméricas. HGXPRT de *Sulfolobus solfataricus* (SsHGXPRT) es dimérica, mientras que HGXPRT de *Thermus thermophilus* (TtHGXPRT) y HGPRT de *Toxoplasma gondii* (TgHGPRT) son descritas como tetrámeros. Parece que el estado de oligomerización de las PRTs de 6-oxopurinas podría desempeñar un papel importante en la catálisis y la estabilización de la conformación activa de la enzima, así como en la estabilidad global de la proteína.



Todas las HG(X)PRT descritas y el resto de 6-oxopurina fosforribosiltransferasas (HPRT, GPRT y XPRT) comparten una estructura global similar. Todas ellas muestran sitios de unión para la nucleobase de purina y el PRPP/PPi y comparten uniones al sustrato similares. En todos los casos, la unión de la purina se estabiliza mediante una red de enlaces de hidrógeno entre un residuo de Valina y Lisina, y el N1, O6 exocíclico y N7 del anillo de purina. Sin embargo, no hay consenso sobre la naturaleza de los dos residuos acídicos adyacentes implicados en el reconocimiento del PRPP. Algunas PRTs de 6-oxopurinas, tales como *Tt*HGXPR, *Tg*HGPRT o XPRT y HGPRT de *Leishmania donovani* (*Ld*XPRT y *Ld*HGPRT)<sup>38,46,66</sup> muestran un residuo de glutámico seguido de un residuo de aspártico, mientras que *Tx*PRT, *Ec*XGPRT o *Bs*XPRT muestra dos residuos de aspártico.

Como se menciona anteriormente, las enzimas mesófilas no suelen ser biocatalizadores adecuados para la industria debido a la baja actividad y estabilidad en condiciones de reacción agresivas, tales como valores de pH extremos, temperaturas elevadas o la presencia de disolventes orgánicos. Por lo tanto, el uso de termozimas es una alternativa interesante para sortear los problemas más habituales del escalado de los procesos (por ejemplo, la viscosidad del medio y la concentración de sustratos). En este sentido, se han descrito varias hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasas termófilas, como las HGPRT de *Thermoanaerobacter tengcongensis* (*Tt*HGPRT)<sup>67</sup>, *Pyrococcus horikoshi* (*Ph*HGPRT)<sup>68</sup> y *Sulfolobus solfataricus* (*Ss*HGPRT)<sup>69</sup>. Además, la HGPRT de *Thermus thermophilus* HB8 (*Tt*HGPRT) también fue clonada, expresada y cristalizada<sup>38,70</sup>, y en este trabajo, se describirá la inmovilización de esta enzima, así como la evaluación de su potencial como posible biocatalizador<sup>71</sup>.

## 1.5. Inmovilización de enzimas

Hoy en día es posible producir una gran variedad de enzimas a precios aceptables, pero debido a su baja estabilidad y al alto costo de los procesos de purificación, su aplicación industrial es limitada. La inmovilización enzimática viene a resolver estos problemas, ya que aumenta la estabilidad de la proteína además de permitir su reutilización en ciclos consecutivos<sup>72</sup>. En este proceso, la enzima es ubicada en una región definida de una determinada matriz, obteniendo formas insolubles del biocatalizador<sup>73</sup>. Por lo tanto, la actividad final del complejo está determinada por la interacción entre el componente inactivo, la matriz o el soporte, y el componente activo, la enzima<sup>72</sup>.

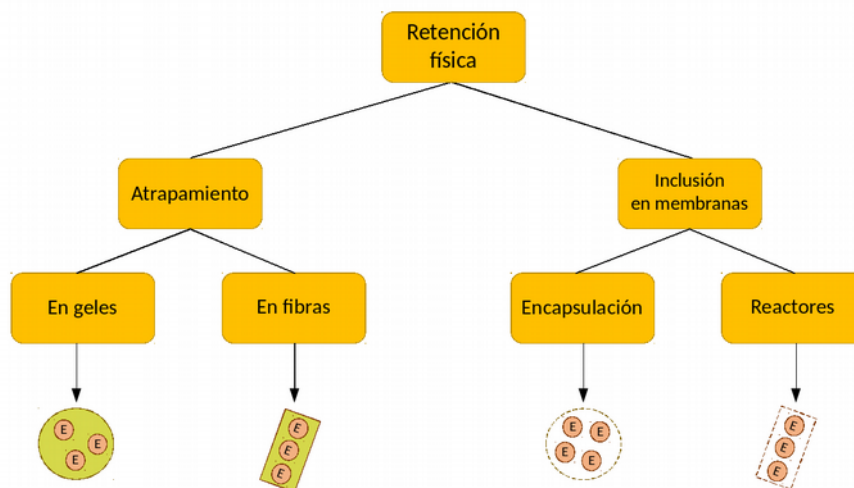
Los diferentes soportes disponibles para la inmovilización están diseñados para facilitar la separación y aumentar la estabilidad de la enzima<sup>74</sup>, y se clasifican como soportes orgánicos e inorgánicos. Además, las características de la matriz juegan un papel clave en el



comportamiento del catalizador inmovilizado. Debe ser resistente a la compresión y al ataque microbiano, hidrófilo, inerte a la enzima, biocompatible y de bajo costo. En particular, el diámetro de poro y el tamaño de partícula determinan el área superficial total y, por lo tanto, afectan a la capacidad de unión de la enzima. Los soportes no porosos tienen pocas limitaciones de difusión, pero muestran una capacidad de carga limitada. Al contrario, los soportes porosos muestran una superficie más grande, lo que permite una mayor carga enzimática y la protección de la enzima contra el medio externo<sup>75</sup>. Las enzimas se pueden unir al soporte mediante retención física o unión química.

### 1.5.1. Inmovilización por retención física

La retención física se divide en dos procesos diferentes: atrapamiento de enzimas en geles o fibras e inclusión de enzimas en membranas (Figura 3). El primero de ellos se basa en la oclusión de la enzima en una red polimérica (alginato, poliacrilamida o poliuretano) que permite que los sustratos y productos pasen a través de ella, pero no la enzima<sup>76</sup>. La enzima es añadida a una solución que contiene una especie monomérica que posteriormente se polimeriza. Este tipo de inmovilización se lleva a cabo en geles o fibras, siendo esta última más resistente. Requiere poca cantidad de enzima para obtener derivados activos, y la estructura de la proteína no sufre ninguna alteración.



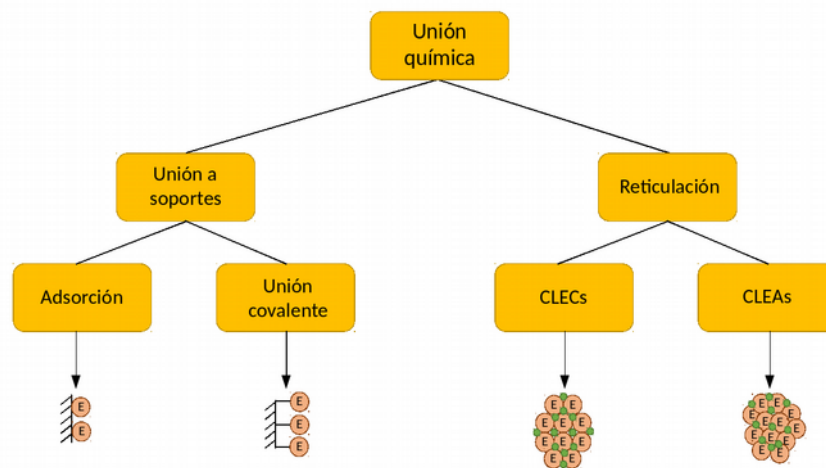
**Figura 3.** Tipos de inmovilización por retención física.

En el proceso de inclusión de enzimas en membranas, las proteínas están rodeadas por membranas semipermeables. De manera similar, las moléculas de sustrato y producto pueden atravesar la membrana, mientras que el paso de la enzima queda impedido<sup>77</sup>. Dentro de esta categoría, se pueden distinguir la microencapsulación y la inmovilización en

reactores de membrana. En la técnica de microencapsulación, la enzima queda protegida del entorno externo. En este caso, cuando se utilizan grandes cantidades de sustratos, su transferencia puede estar restringida, por lo que la aplicación de este tipo de derivados inmovilizados es limitada<sup>77</sup>. Además, para evitar su adsorción a la membrana, el sustrato debe ser de alto peso molecular y soluble en agua. Este entra en el reactor, donde se produce la reacción y el producto formado emerge a través de la membrana.

### 1.5.2. Inmovilización por unión química

La unión química de la enzima a los soportes puede producirse por unión no covalente o covalente y reticulación (Figura 4). En la unión no covalente, la enzima se une a un soporte no funcionalizado por adsorción (interacciones de Van der Waals o enlaces de hidrógeno), interacción hidrofóbica, interacción iónica o unión a metales. En este caso, el proceso se vuelve reversible cuando cambian las condiciones que influyen en la intensidad de la interacción: pH del medio, fuerza iónica, temperatura, permeabilidad, área superficial del soporte o polaridad del disolvente. El proceso de inmovilización es simple y de bajo costo, además preserva la actividad catalítica de la enzima. Sin embargo, la débil unión entre la enzima y el soporte podría plantear diversos problemas, por lo que las variables que controlan la adsorción deben ser rigurosamente optimizadas.



**Figura 4.** Tipos de inmovilización por unión química.

La unión covalente entre las proteínas y el soporte es el procedimiento de inmovilización más común. Es una unión irreversible donde la estabilidad de los enlaces formados impide la liberación de la enzima al medio. En este método, los grupos químicos del soporte se activan para generar grupos electrófilos que reaccionan con los grupos nucleófilos de las

enzimas. Estos últimos grupos provienen de las cadenas laterales de aminoácidos como la lisina, cisteína, tirosina o histidina, y en menor medida, metionina, triptófano, arginina y ácido aspártico. Debido a su carácter hidrofóbico, el resto de los aminoácidos no están expuestos al disolvente en la superficie de la proteína, por lo que no pueden intervenir en la unión covalente. Normalmente, en la inmovilización covalente, las enzimas se unen al soporte a través de grupos amida, éter, tioéter o carbamato. Para llevar a cabo una inmovilización covalente óptima, debe conocerse la densidad de los grupos activos mencionados por unidad de superficie del soporte. Este parámetro determina el rendimiento de inmovilización, así como la estabilidad de la enzima unida al soporte. Por lo tanto, es posible agregar un agente de reticulación durante el proceso para mantener las propiedades estructurales y funcionales de la enzima. El glutaraldehído es el agente más utilizado, es soluble en medio acuoso y forma enlaces covalentes estables entre las diferentes subunidades<sup>78</sup>. Teniendo en cuenta que en este trabajo se realizó la inmovilización covalente de *TtHGXPR*T, es importante mencionar los efectos que este tipo de inmovilización puede tener sobre la estabilidad y actividad de la enzima.

- a) **Efectos sobre la estabilidad enzimática.** Normalmente los procesos de inmovilización aumentan la estabilidad de las enzimas. Este fenómeno es debido a que la inmovilización provoca una alteración del microentorno, lo cual puede llegar a proteger a la proteína de los cambios en el medio. En este sentido, se pueden ver prevenidos fenómenos tales como la agregación enzimática, el ataque de las proteasas además de la interacción con burbujas de aire. Por otro lado, las diferentes uniones establecidas por la inmovilización entre la enzima y el soporte hacen que la enzima adquiera rigidez conformacional a través de su estructura terciaria. En consecuencia, la enzima muestra mayor resistencia frente a los procesos de desactivación.
- b) **Efectos sobre la actividad enzimática.** Aunque existan excepciones, el proceso de inmovilización puede provocar la disminución o incluso la desaparición de la actividad enzimática. Una de las causas más comunes de pérdida de actividad es debida por una parte a la distorsión de algún aminoácido esencial, o que forme parte del centro activo. Por otra parte, la unión al soporte puede impedir u obstaculizar el acceso del sustrato al centro activo. Sin embargo, existen otros factores que también pueden llegar a ser responsables de la pérdida de actividad enzimática, tales como: resistencias difusionales internas o externas, efectos electrostáticos entre el sustrato y el soporte, impedimentos estéricos por el tamaño del sustrato o efectos del microentorno.

Tal y como acabamos de mencionar, la inmovilización de la enzima en soportes sólidos puede reducir la actividad específica y volumétrica del biocatalizador, por lo que en ciertos

casos es interesante inmovilizar las enzimas sin la utilización de un soporte. En este tipo de inmovilización, se emplean reactivos bifuncionales que conducen a uniones intermoleculares entre las moléculas de la enzima. Comúnmente, los reactivos más utilizados son dialdehídos, diiminoésteres, diisocianatos y sales de bisdiazonio. Cuando las enzimas están cerca una de la otra, se pueden producir biocatalizadores físicamente más fuertes mediante reticulación. Ejemplo de ello son los cristales reticulados de enzima (CLEC), formados por la cristalización de enzimas y su posterior reticulación con glutaraldehído<sup>79</sup>. Como los cristales contienen un solo tipo de enzima, este método garantiza la ausencia de contaminantes. Sin embargo, se requieren muestras totalmente puras de proteína para permitir su cristalización. Por lo tanto, un método menos costoso se basa en la precipitación de proteínas y la posterior reticulación del agregado formado, obteniendo CLEAs(Agregados enzimáticos reticulados)<sup>80</sup>.

## 2. OBJETIVOS

### Objetivo general:

La inosina-5'-monofosfato y la guanosina-5'-monofosfato son moléculas de interés en la industria alimentaria, ya que pueden utilizarse como aditivos para potenciar el sabor umami de los alimentos. Además, en los últimos años se ha producido un aumento de la conciencia social por el cuidado del medio ambiente. En este sentido, se ha promovido la utilización de técnicas más sostenibles a nivel de producción industrial, lo que ha despertado un mayor interés por los procesos de síntesis enzimática.

El siguiente trabajo tiene como objetivo principal la producción, inmovilización y caracterización de la enzima HGXPRT del organismo termófilo *Thermus thermophilus*. Con la finalidad de utilizar el biocatalizador inmovilizado en la síntesis de IMP y GMP a partir de altas concentraciones de sustratos (hipoxantina y guanina) poco solubles en medio acuoso.

### Objetivos específicos:

1. Producción y purificación de la enzima *TtHGXPRT*
2. Caracterización bioquímica de *TtHGXPRT*
  - Influencia de la temperatura sobre la actividad enzimática
  - Influencia del pH sobre la actividad enzimática
  - Evaluación de la termoestabilidad
3. Inmovilización covalente de *TtHGXPRT* en micropartículas magnéticas MagResyn®Amine
  - Inmovilización a través del amino terminal a pH 8,5
  - Inmovilización multipuntual a través de las lisinas superficiales a pH 10
4. Caracterización bioquímica del derivado inmovilizado *MTtHGXPRT*
  - Influencia de la temperatura sobre la actividad enzimática
  - Influencia del pH sobre la actividad enzimática
  - Evaluación de la termoestabilidad
5. Evaluación de número de reutilizaciones posibles del derivado inmovilizado *MTtHGXPRT*
6. Aplicación del derivado *MTtHGXPRT* en la síntesis de IMP y GMP a partir de altas concentraciones de hipoxantina y guanina, respectivamente.

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1. Material químico y medios de cultivo

Los reactivos para la elaboración de los medios de cultivo se compraron a Difco (St. Louis, MO). El acetato de trimetilamonio y el PRPP se adquirieron a través de Sigma-Aldrich. Por otro lado, todas las bases púricas naturales y los NMPs utilizados en el trabajo fueron comprados a Carbosynth Ltd (Compton, Reino Unido). Finalmente, el resto de reactivos químicos utilizados se obtuvieron a través de Scharlab (Barcelona, España) y Symta (Madrid, España).

### 3.2. Producción y purificación de *TtHGXPRT*

#### 3.2.1. Expresión de *TtHGXPRT* en *E.coli* BL21 (DE3)

La cepa de *E.coli* BL21(DE3)pET28b<sub>TtHGXPRT</sub> que contiene el plásmido recombinante pET28b<sub>TtHGXPRT</sub> fue sembrada en una placa de LB agar suplementada con kanamicina 50 µg/µL y se incubó a 37 °C. Una vez crecido el cultivo, se tomó una colonia aislada para preparar dos preinóculos en 20 mL de LB con kanamicina 50 µg/µL. Estos preinóculos se incubaron a 37 °C en agitación (250 rpm) durante toda la noche. Al día siguiente, tras comprobar que el cultivo había crecido satisfactoriamente, cada preinóculo fue trasvasado a un volumen total de 100 mL de medio líquido LB con kanamicina 50 µg/µL. El cultivo fue incubado a 37 °C y 250 rpm hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 0,6-0,8. Tras la incubación, la sobreexpresión del gen *hgxpRT* fue inducida añadiendo al medio de cultivo isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración de 0,5 mM. En este caso, el cultivo fue incubado a 37 °C y con agitación a 250 rpm durante cinco horas.

Para la posterior separación de las células del sobrenadante se realizaron dos centrifugaciones sucesivas a 3500 x *g*. En la primera centrifugación, tras descartar el sobrenadante, el pellet de células fue resuspendido en 5 mL de Tris-HCl 10 mM, pH 8. En la segunda centrifugación, el sobrenadante fue nuevamente descartado el pellet fue almacenado a -20 °C hasta su utilización. Para la obtención de la proteína intracelular, primero el pellet de células fue resuspendido en 5 mL de tampón Tris-HCl 10 mM, pH 8. A continuación, las células de *E. coli* fueron lisadas mediante el empleo de ultrasonidos. Acto seguido, se centrifugaron las células lisadas a 17500 x *g* durante 20 minutos a 4 °C. En este caso la fracción descartada fue el pellet, por lo que el sobrenadante fue recogido y guardado a 4 °C justo antes del proceso de purificación.

### 3.2.2. Purificación de la enzima

La purificación de *TtHGXPRT* se llevó a cabo mediante tres pasos de purificación. Para empezar, el sobrenadante obtenido en el paso anterior fue sometido a un tratamiento térmico que consistió en incubarlo a 70 °C durante 20 minutos. Posteriormente, los componentes insolubles formados por dicho tratamiento fueron retirados por centrifugación (17500 x *g*, 20 minutos, 4 °C). El sobrenadante se pasó a través de un filtro de 0,22 µm.

Debido a que el gen *hgxpRT* se clonó después de una secuencia que codificaba para una cola de histinas, la enzima se expresó como una proteína de fusión que presenta una cola de histidinas. Por este motivo, el segundo paso de purificación consistió en realizar una cromatografía de afinidad empleando una columna de níquel His-Trap HP (GE Healthcare) de 5mL. La columna fue equilibrada con Tris-HCl 20 mM, pH 8, NaCl 100 mM e imidazol 20 mM. Para la elución de *TtHGXPRT*, se utilizó un gradiente lineal de imidazol (20-500 mM). Las fracciones que contenían la enzima, registradas mediante el visualizador LP Data View, fueron identificadas mediante SDS-PAGE, confirmando que las fracciones del pico de elución se correspondían con *TtHGXPRT*. Estas fracciones se juntaron y concentraron para realizar el último paso de purificación que consiste en una cromatografía de exclusión molecular por tamaño. Para ello se utilizó una columna HiLoad 16/60 Superdex 200 equilibrada con Tris-HCl 20 mM, pH 8. Una vez más, las fracciones correspondientes a la proteína de interés fueron identificadas por SDS-PAGE y juntadas. La proteína fue concentrada mediante una serie de centrifugaciones a 3500 x *g* a 4 °C utilizando un centricon Millipore 10 kDa, y finalmente guardada a 4 °C. La concentración de la proteína fue determinada espectrofotométricamente por absorción UV a 280 nm utilizando  $\epsilon_{280} = 11,920 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ <sup>81</sup>.

#### 3.2.2.1. Electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)

Se realizó una electroforesis SDS-PAGE con muestras recogidas después de cada etapa de purificación para comprobar el grado de pureza obtenido en cada paso. Para ello, 20 µL de muestra proveniente de cada paso de purificación fueron mezclados con 5 µL de tampón de ruptura 5x (glicerol al 20%, azul de bromofenol al 0,05%, SDS al 10 %, β-mercaptoetanol 10 mM, Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8). Con el objetivo de asegurar la desnaturización de la enzima, las muestras fueron incubadas a 95 °C durante 5 minutos antes de ser cargadas en los carriles del gel. En cada carril se introdujeron 15 µL de muestra y la electroforesis se realizó a 50 mA. El gel fue preparado siguiendo la siguiente receta (cantidades para la preparación de dos geles al 5% de poliacrilamida):

Gel concentrador	Gel separador
H <sub>2</sub> O Milli-Q: 3,85 mL	H <sub>2</sub> O Milli-Q: 2,4 mL
Acrilamida/bisacrilamida 30%: 0,81 mL	Acrilamida/bisacrilamida 30%: 4,65 mL
Tris-HCl 2,5 M pH 6,8: 0.25 mL	Tris-HCl 1 M pH 8,8: 4,2 mL
SDS 20%: 25 µL	SDS 20%: 57 µL
TEMED: 10 µL	TEMED: 12 µL
PSA 10%: 25 µL	PSA 10%: 60 µL

### 3.4. Inmovilización enzimática

La inmovilización covalente de *TtHGXPRT* se realizó empleando como soporte las micropartículas magnéticas MagResyn<sup>®</sup>Amine (ReSyn Biosciences, Pretoria, Sudáfrica), previamente activadas con glutaraldehído. Para empezar, a 25 µL de suspensión de micropartículas (20 mg de soporte por cada mL de suspensión) se mezclaron con H<sub>2</sub>O Milli-Q para lavarlas. Tras el lavado, se utilizó tampón fosfato sódico 50 mM pH 8,5 para equilibrar el soporte. Mediante el empleo de un imán, el sobrenadante fue descartado y se preparó una disolución de glutaraldehído al 5% para el proceso de activación. Para dicha activación, a las microesferas se les añadieron 200 µL de la disolución de glutaraldehído preparada y se dejaron en agitación *end-over-end* durante 3 horas a temperatura ambiente. Tras finalizar la activación, el exceso de glutaraldehído fue eliminado mediante sucesivos lavados con H<sub>2</sub>O Milli-Q.

Después, se continuó con el proceso de unión entre la enzima y el soporte (*binding*). Para optimizar la carga enzimática, se añadieron diferentes cantidades de enzima (75-225 µg) a las micropartículas activadas. Asimismo, para evaluar diferentes estrategias de inmovilización, por una parte el *binding* se realizó en presencia de tampón fosfato sódico 50 mM, pH 8,5 empleando 75, 150 y 225 µg de enzima (derivados inmovilizados *MTtHGXPRT*1-3). Por otra parte, para la segunda estrategia de inmovilización, los soportes se trataron con tampón borato sódico 50 mM, pH 10, utilizando 150 y 225 µg de enzima (derivados inmovilizados *MTtHGXPRT*4-5).

Las mezclas se incubaron durante 4 horas a temperatura ambiente en agitación *end-over-end*. Al finalizar el proceso de *binding*, el sobrenadante fue descartado separando las partículas de este el empleo de un imán. De manera similar al activado, la enzima que no unida al soporte fue eliminada mediante lavados sucesivos utilizando H<sub>2</sub>O Milli-Q. Para bloquear cualquier residuo de amina reactivo que pudiera quedar en el soporte, este fue incubado con 200 µL de glicina 3 N durante 2 horas a temperatura ambiente. Por último, el



sobrenadante fue nuevamente descartado, y el derivado inmovilizado fue resuspendido el tampón correspondiente (fosfato sódico 50 mM, pH 8,5 o borato sódico 50 mM, pH 10). Los derivados inmovilizados se guardaron a 4 °C para las pruebas posteriores.

### 3.5. Ensayo de actividad enzimática

Por una parte, la comprobación de la actividad enzimática mostrada por la *TtHGXPRT* libre se realizó incubando 6 µg de enzima con PRPP 10 mM; hipoxantina 10 mM y MgCl<sub>2</sub> 12 mM en tampón Tris-HCl 12 mM, pH 8, en un volumen final de 80 µL. La reacción se llevó a cabo a 60 °C durante 10 minutos y con agitación a 300 rpm. A la hora de parar la reacción, tras los 10 minutos, se recogieron 40 µL de la mezcla de reacción que fueron inmediatamente mezclados con 40 µL de metanol frío y almacenados en un baño de hielo durante 5 minutos. Posteriormente, las muestras recogidas se incubaron durante 5 minutos a 95 °C y centrifugadas a 9000 x *g* durante 5 minutos. El producto de la reacción fue medido cuantitativamente a través de HPLC, y para ello las muestras fueron diluidas a la mitad en agua. La actividad específica se definió como la cantidad de producto µmol/min (IU, unidades internacionales) formado por mg de enzima. Todos los ensayos se hicieron por triplicado y el error máximo fue de menos del 5%.

Por otro lado, para determinar la actividad de la enzima inmovilizada se empleó el mismo procedimiento seguido en el caso la enzima libre. Sin embargo, en este caso se añadieron diferentes cantidades de derivado (9-30 µg, que contenían 6 µg de enzima inmovilizada) a la mezcla de reacción en función del derivado utilizado (*MTtHGXPRT1-5*). La separación del biocatalizador del medio de reacción se realizó mediante la aplicación de un campo magnético por acción de un imán. Se definió la actividad específica como la cantidad de producto µmol/min (IU, unidades internacionales) formado por mg de enzima. Todos los ensayos se hicieron por triplicado y el error máximo fue de menos del 5%.

### 3.6. Caracterización bioquímica de la enzima libre e inmovilizada

Para la caracterización bioquímica, se evaluó la influencia que ejercen el pH y la temperatura sobre la actividad enzimática tanto de la enzima libre como del derivado inmovilizado.

Para la evaluación del efecto del pH, se realizó el ensayo estándar explicado anteriormente con los derivados inmovilizados (*MTtHGXPRT1-5*) pero utilizando diferentes tampones de reacción. Los tampones utilizados fueron los siguientes: citrato sódico (pH 4, 5 y 6), fosfato sódico (pH 6, 7 y 8), Tris-HCl (pH 7, 8 y 9) y borato sódico (pH 8, 9 y 10), todos ellos a una concentración de 50 mM.

Respecto al efecto que ejerce la temperatura sobre la actividad, el ensayo estándar se realizó de nuevo con los derivados inmovilizados pero esta vez empleando diferentes temperaturas (40-100 °C).

### 3.7. Termoestabilidad de la enzima libre y del derivado inmovilizado

Para la ver el efecto que ejerce la temperatura sobre la estabilidad de la enzima tanto libre como inmovilizada, se emplearon 25 µg de enzima libre y diferentes cantidades de derivado inmovilizado (M7tHGXPRT1-3 y M7tHGXPRT4-5) equivalentes a esta masa de enzima. En este sentido, las muestras fueron incubadas a 60 °C durante 24 horas y se recogieron alícuotas a diferentes tiempos (0, 1, 3, 6, 8, 17 y 24 horas) durante el periodo de incubación. Todas las alícuotas se almacenaron a 4 °C y, posteriormente, se llevó a cabo el ensayo estándar de actividad descrito en el apartado 3.5.

### 3.8. Reutilizaciones del derivado inmovilizado

Para evaluar la capacidad de reutilización del derivado inmovilizado, M7tHGXPRT3 fue escogido para realizar reacciones consecutivas. Tras cada ciclo de reacción las partículas magnéticas fueron recuperadas mediante la aplicación de un campo magnético y lavadas con tampón Tris-HCl 12 mM, pH 8. Una vez lavadas, las partículas fueron añadidas a un nuevo medio de reacción para realizar una nueva reutilización.

### 3.9. Producción de IMP y GMP mediante el derivado inmovilizado

La producción enzimática de IMP y GMP se realizó utilizando diferentes cantidades de enzima inmovilizada (12-30 µg). Las diferentes cantidades necesarias de derivado fueron incubadas junto con diferentes concentraciones de sustratos y cofactor: PRPP 10-40 mM, bases púricas (hipoxantina o guanina) 20-80 mM y MgCl<sub>2</sub> 12-48 mM, en un volumen final de 80 µL. La incubación se realizó durante 10 minutos a 60 °C y 300 rpm empleando Tris-HCl 12 mM pH 8 como tampón de reacción. La reacción fue detenida tal y como se explica en el apartado 3.5. y el producto generado se midió cuantitativamente por HPLC. Como en todos los casos anteriores, los ensayos se hicieron por triplicado y el error máximo fue de menos del 5%.

### 3.10. Métodos analíticos

La actividad de la T7HGXPRT libre e inmovilizada fue cuantificada utilizando cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Para ello, el equipo de HPLC empleado fue: 1100 series (Agilent). Asimismo, se utilizó una columna ACE Excel 5 µm, modelo CN-ES de 250x4,6 mm (Advanced Chromatography Technologies). El análisis se realizó condiciones isocráticas

utilizando 100% de acetato de trimetilamonio, a un flujo de 0,7 mL/min, y los productos se detectaron a una longitud de onda de 254 nm.

Los tiempos de retención para las bases y NMPs con los que hemos trabajado, son los siguientes (nombres abreviados de acuerdo con las recomendaciones de la Comisión para Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB):

- Bases púricas:  
Gua, 4.8 min; Hyp, 4.5 min.
- Nucleósidos-5'-monofosfato:  
GMP, 2.8 min; IMP, 2.5 min.

### 3.11. Predicción estructura tridimensional

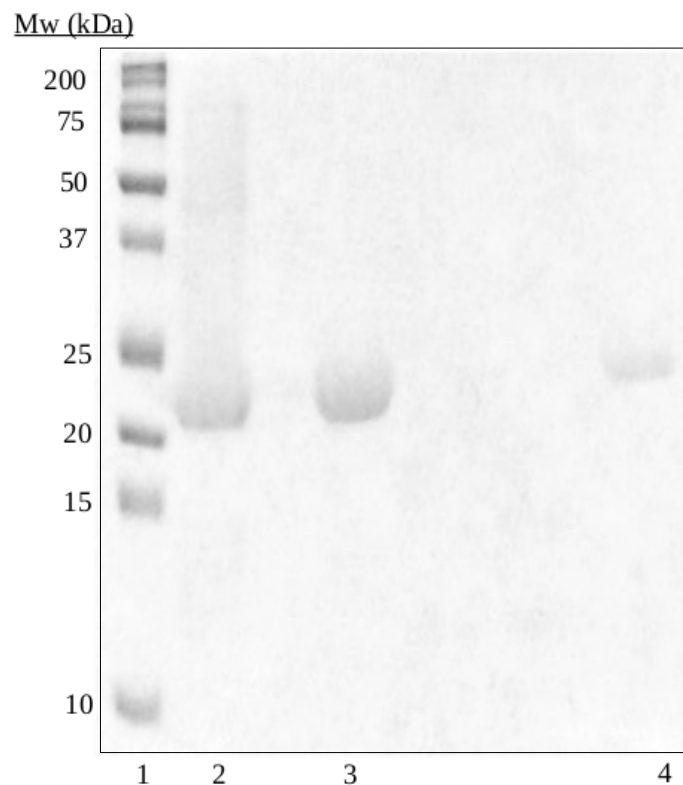
El modelo de la proteína se tomó de la estructura cristalina resuelta por difracción con rayos X de *Thermus thermophilus* hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (*TtHGPRT*) en complejo con IMP (PDB id. 3ACD) a 1.89 Å de resolución<sup>71</sup>. Sin embargo, algunas características estructurales tuvieron que ser revisadas, así la geometría de las regiones de loop se mejoró refinando su conformación. Para este fin, se evaluó la compatibilidad de la secuencia de aminoácidos con estructuras conocidas de PDB, y se corrigió la geometría de estas regiones usando Refine Loop/MODELER. Para la selección de los tampones utilizados en el proceso de inmovilización, los valores de pKa de los residuos de lisina de la proteína fueron pronosticados a pH 8,5 y 10,0 utilizando el servidor web H++ (<http://biophysics.cs.vt.edu/H++>). Asimismo, el potencial electrostático en la superficie de *TtHGXPR*T se calculó utilizando el programa APBS. La visualización de la molécula se realizó con el visor 3D PyMOL<sup>82</sup>.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Sobreexpresión y purificación de *TtHGXPR*T

La proteína *TtHGXPR*T etiquetada en su N-terminal con una cola de histidinas (His-6) fue sobreexpresada en *E. coli*. Para empezar, las células se cultivaron en medio LB suplementado con kanamicina hasta que se logró la densidad celular óptima. La sobreexpresión proteica se indujo mediante la adición de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido y las células se cultivaron durante otras 5 h. Las células fueron recolectadas por centrifugación y posteriormente lisadas por ultrasonidos tal y como se describe en la sección de materiales y métodos. La primera etapa de purificación se llevó a cabo incubando el lisado a 70 °C durante 20 min. Al provenir de un microorganismo termófilo, *TtHGXPR*T debe resistir el período de incubación sin sufrir alteraciones. Mientras

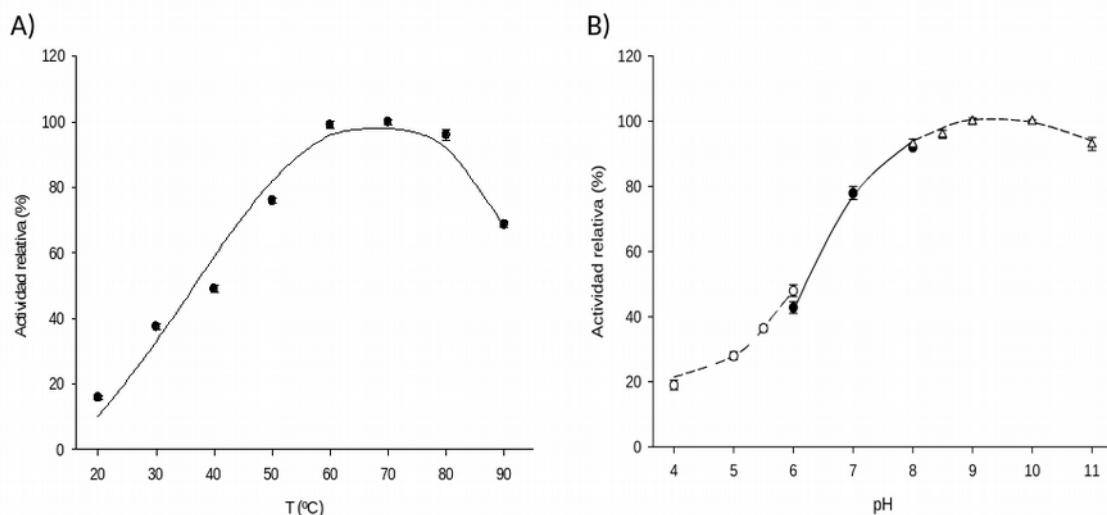
tanto, el resto de las proteínas de *E. coli* presentes en el medio se desnaturalizarán por efecto de la alta temperatura. El segundo carril del gel en la Figura 5 corresponde a este procedimiento de purificación. Se puede observar una banda bastante clara correspondiente a la proteína de interés, sin embargo, la presencia de más bandas tenues indica que la proteína fue purificada parcialmente. Por lo tanto, para una purificación total de la enzima, se realizaron dos etapas cromatográficas adicionales (ver la sección de Materiales y Métodos). En primer lugar, la etapa de cromatografía por afinidad proporcionó una única banda de proteína con una masa molecular aparente de 22 kDa, tal como se puede observar en el tercer carril de la Figura 5. Sin embargo, los agregados de la proteína deberían eliminarse para poder obtener una solución que únicamente contenga la enzima activa. Para este fin, se realizó una etapa cromatográfica final basada en la exclusión de tamaño molecular, obteniéndose una única banda de proteína que correspondía a la enzima activa (carril 4). Esta banda de proteína mostró una masa molecular cercana a 22 kDa, que corresponde a la masa molecular calculada a partir de la secuencia de aminoácidos (21,97 kDa).



**Figura 5.** Purificación de *TtHGXPRT*. SDS-PAGE de los diferentes pasos de purificación. Carril 1: estándar pre-teñido de proteína (BioRad) utilizado como marcador. Carril 2: Muestra del lisado después de tratamiento térmico a 70 °C. Carril 3: 20 ng de proteína tras la cromatografía de afinidad en la columna HisTrap FF (GE Healthcare). Carril 4: 10 ng de proteína tras la cromatografía de exclusión molecular por tamaño en la columna HiLoad 16/60 Superdex 200.

## 4.2. Caracterización bioquímica de *Tt*HGXPRT

*Tt*HGXPRT mostró una alta actividad en un amplio rango de temperaturas (50-90 °C), con una temperatura óptima alrededor de 60-70 °C (Figura 6A). Por otro lado, el perfil de pH reveló que la enzima funciona mejor a altos valores de pH (7-11), con un valor óptimo de alrededor de pH 9 (Figura 6B). En vista de estos resultados obtenidos, se seleccionaron 60 °C y pH 8 como condiciones óptimas de reacción. La mayoría de los factores limitantes para la síntesis industrial de NMPs están relacionados con la baja solubilidad en agua de algunas de las bases púricas utilizadas como sustratos (guanina e hipoxantina, por ejemplo). Para evitar estas limitaciones, se requieren altas temperaturas altas y/o condiciones alcalinas. Por lo tanto, en vista de los valores óptimos de actividad enzimática obtenidos con *Tt*HGXPRT (altas temperaturas y valores de pH), esta enzima podría ser un interesante biocatalizador para la producción industrial de NMPs de interés en la dieta, tales como IMP y GMP.



**Figura 6.** Influencia de la temperatura y el pH sobre la actividad de la *Tt*HGXPRT. (A) Efecto de la temperatura en la actividad de la *Tt*HGXPRT (●). (B) Efecto del pH en la actividad de la *Tt*HGXPRT, (○) citrato sódico 50 mM (pH 4-6), (●) fosfato sódico 50 mM (pH 6-8), (△) borato sódico 50 mM (pH 8-10).

Como algunos procedimientos sintéticos industriales requieren largos tiempos de reacción a temperaturas extremas, también se evaluó la estabilidad de la proteína. Definido como el tiempo durante el cual la enzima retiene el 50% de su actividad inicial. Dicha estabilidad se ve afectada por diferentes condiciones ambientales, como el pH y la temperatura. Los resultados mostraron que la incubación a pH 8 no inactivó la enzima durante el período de incubación. Estos resultados son muy interesantes, ya que se esperaba una gran termoestabilidad por parte de *Tt*HGXPRT, pero esta tolerancia a condiciones alcalinas, más común en enzimas provenientes de alcalófilos, no es muy habitual en proteínas de

organismos termófilos. Además, la estabilidad a valores de elevados de pH es ventajosa, ya que tales condiciones son necesarias para la solubilización del sustrato en este caso. Las condiciones alcalinas también son requeridas para la inmovilización enzimática. De hecho, las técnicas de inmovilización covalente generalmente emplean largos tiempos de reacción (1-10 horas) y tampones alcalinos (pH 8-10). Por lo tanto, la estabilidad térmica y de pH mostrada por *TtHXGPRT* sugirió que podría ser inmovilizada de manera eficiente.

Por último, se evaluó el efecto del almacenamiento de la enzima a 4 °C para asegurar la estabilidad del biocatalizador. En este sentido, se retuvo un 85% de la actividad enzimática durante más de 100 días.

### 4.3. Inmovilización covalente de *TtHGXPRT*

Generalmente, la inmovilización covalente de enzimas se basa en el ataque nucleofílico que realizan los grupos amino primarios de las proteínas sobre los grupos electrófilos presentes en el soporte. Recordemos, que este tipo de inmovilización se realiza empleando largos tiempos de reacción (2-10 horas) y condiciones alcalinas (pH 8-10), con el objetivo de evitar la protonación de los grupos amino.

En este trabajo se ha utilizado el soporte MagResyn®Amine, unas micropartículas magnéticas con un tamaño entre 5 y 10  $\mu\text{m}$ . Estas micropartículas constan de un núcleo de magnetita rodeado por una matriz polimérica porosa. Al ser magnéticas, son fácilmente recuperables mediante la aplicación de un campo magnético, por lo que se facilita su separación del medio tras la reacción, característica fundamental para su aplicación industrial. Este soporte presenta en su superficie grupos amino primarios que deben ser activados antes de llevar a cabo el proceso de inmovilización.

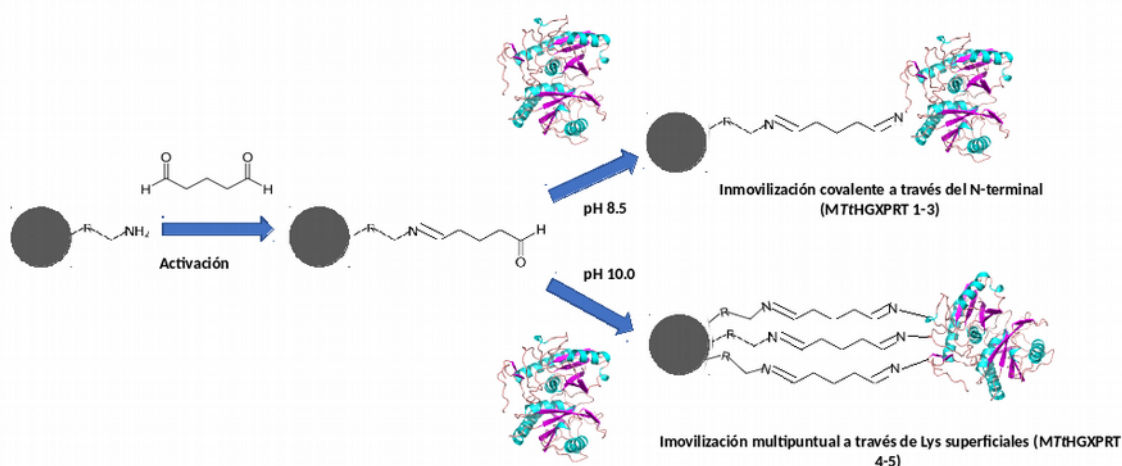
En este caso, el proceso de activación del soporte se realizó con glutaraldehído, uno de los reactivos más utilizados y versátiles para este procedimiento. Aunque la química y estructura de este reactivo no se conocen en detalle, se cree que se trata de un reactivo bifuncional con capacidad de polimerizar que se encuentra tanto en su forma monomérica como en la polimérica cuando está en estado de equilibrio. El mecanismo responsable de la interacción entre el glutaraldehído y la proteína tampoco es del todo conocido, de hecho, parece ser que dicha interacción no está limitado a un solo mecanismo.

- Al someter al glutaraldehído a condiciones básicas, sufre condensaciones aldólicas intramoleculares, y en consecuencia se obtiene una forma polimérica de un aldehído  $\alpha$ - $\beta$ -insaturado capaz de reaccionar con los grupos amino mediante dos mecanismos: Entre los grupos aldehído internos de esta forma polimérica del glutaraldehído y los grupos

amino primarios presentes en la proteína se forman bases de Schiff. El producto que se obtiene a través de esta reacción se estabiliza por resonancia.

- Por adición de Michael al doble enlace C-C. Como en este caso se pierde el efecto de la resonancia de los dobles enlaces conjugados el producto resultante es menos estable que en el mecanismo anterior. Al carecer de la estabilización por el efecto resonante, el producto de esta reacción es más lábil en condiciones ácidas.

Por último, respecto a la inmovilización covalente, parece estar aceptado por parte de muchos autores consideran que en este tipo inmovilización participan los grupos  $\epsilon$  pertenecientes a los grupos amino primarios más abundantes de la proteína. Específicamente, estos son los que pertenecen a los residuos de lisina. De hecho, debemos recordar que únicamente los grupos amino primarios desprotonados tienen la capacidad de actuar como nucleófilos en la reacción de unión enzima-soporte. En este sentido, el pKa del amino  $\epsilon$  de la lisina ronda entre 9,5-11, estando protonado a valores de pH superiores al pKa. Sin embargo, el amino terminal (N-terminal) muestra un pKa que ronda unos valores de 7,5-8,5. Por lo tanto, cuando los valores de pH del medio se encuentran entre 8-9,5, la inmovilización ocurrirá preferentemente a través del grupo amino terminal. Sin embargo, cuando los valores de pH superan el valor de 9,5, el grupo amino primario de las lisinas podrá estar desprotonado y la inmovilización



**Figura 7.** Resumen esquematizado del proceso de inmovilización de *TtHGXPRT*.

Según los resultados obtenidos a través del programa predictor de protonación H<sup>++</sup> (Tabla 1), el extremo N-terminal de la *TtHGXPRT* quedaría desprotonado a pH 8,5, pudiendo realizarse un ataque nucleófilo sobre los grupos aldehído, lo que conduce a un enlace

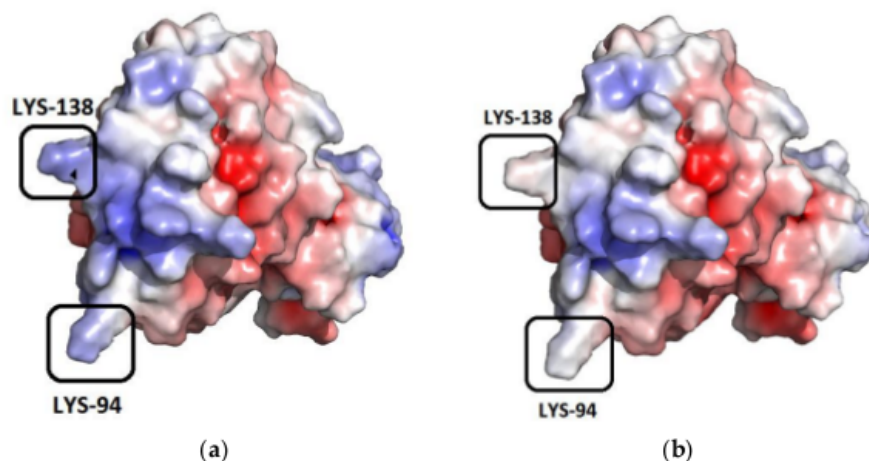
covalente. En consecuencia, *Tt*HGXPRT quedaría inmovilizado a través de su N-terminal a pH 8,5. Dado que se trata de un homotetrámero, existirían cuatro posibles sitios de interacción ya que la enzima cuenta con un grupo N-terminal por cada monómero. Desafortunadamente, dado que la única estructura disponible de *Tt*HGXPRT en Protein Data Bank (PDB) está depositada como un monómero (código PDB 3ACD), no podemos confirmar si todos los amino terminales están ubicados en el mismo plano, condición necesaria para que ocurra la unión por los cuatro puntos.

**Tabla 1.** Valores de pKa teóricos de los residuos de lisina en la *Tt*HGXPRT calculados computacionalmente utilizando el servidor H++ (<http://biophysics.cs.vt.edu/H++>). pK, int\*: valores de pKa de los grupos asumiendo que no tienen interacción con otros grupos titulables de la proteína. pKa\*\* corresponde con el punto medio de la curva de titulación (pK 1/2).

<b>N-Terminal</b>	<b>Lys (#)</b>	<b>pK, int*</b>	<b>pKa**</b>
<i>Tt</i> HGXPRT		3,356	0,381
	18	9,405	9,295
	36	10	11
	37	9,554	9,847
	53	10,759	11,019
	94	10,182	10,408
	103	10,252	10,915

*Tt*HGXPRT también contiene siete residuos de lisina, todos ellos se encuentran bastante expuestos y dispersos en la superficie de la proteína. Sin embargo, el programa H++ predijo que solo cinco de ellos están desprotonadas, con valores aparentes de pKa inferiores a 10 (Lys18, Lys36, Lys37, Lys94 y Lys138) (Tabla 1). El potencial electrostático de *Tt*HGXPRT calculado a valores de pH de 8,5 y 10 se muestra en la Figura 8. En este sentido, los residuos Lys94 y Lys138 se encuentran resaltados para mostrar cómo el estado de protonación se modifica por el efecto del pH. Estos resultados teóricos sugieren que *Tt*HGXPRT podría haberse inmovilizado a través de los residuos de lisina superficiales al ser incubado a pH 10. Sin embargo, debido a la naturaleza tetramérica de *Tt*HGXPRT, es poco probable que la orientación de los residuos de Lys en la superficie del monómero juegue un papel muy importante. De forma similar al procedimiento de inmovilización anterior, dado que la única estructura de *Tt*HGXPRT depositada en PDB es el monómero (PDB 3ACD), no podemos predecir cómo ocurrió el proceso de inmovilización a pH 10.



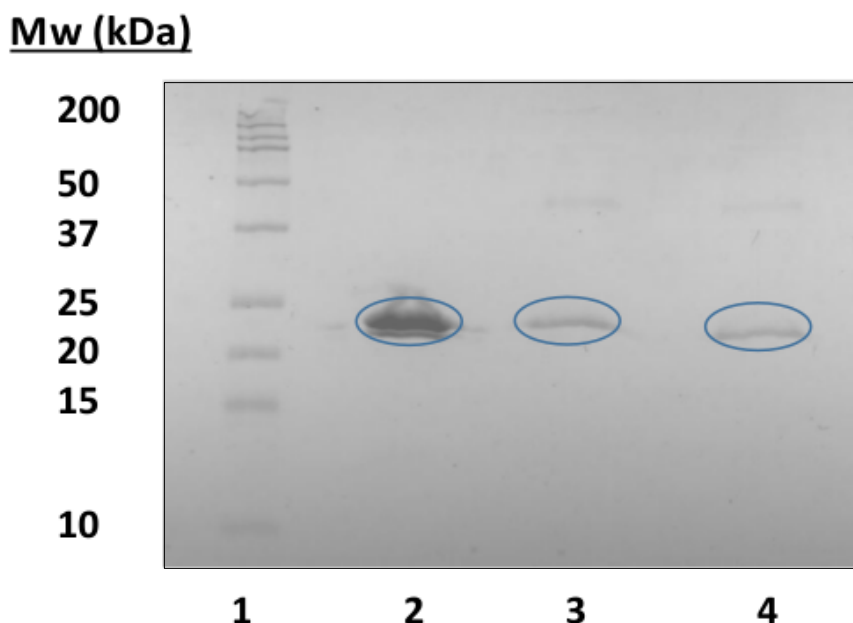


**Figura 8.** Potencial electrostático de la superficie de *TtHGXPRT* generado con el programa APBS. (a) Estado titratable de la proteína a pH 8,5; (b) estado titratable de la proteína a pH 10.

Tal y como acabamos de comentar *TtHGXPRT* es una enzima homotetramérica, y su estado oligomérico no solo contribuye a la alta estabilidad térmica exhibida por esta proteína, también juega un papel esencial en la catálisis y estabilización de la conformación activa. Como los derivados *MTtHGXPRT* mostraron una pérdida significativa de actividad, obteniéndose solo el 25-30% de la actividad retenida (Tabla 2), pensamos que el proceso de inmovilización podría afectar al ensamblaje oligomérico de la enzima, lo que llevaría a una falta de reactividad. Además, según la literatura, cuando se utiliza un soporte altamente activado con glutaraldehído, independientemente de la estructura del glutaraldehído en el soporte, el resultado final es un soporte con brazos espaciadores cortos con un grupo amino (grupo catiónico), un grupo hidrofóbico formado por el glutaraldehído y el grupo reactivo covalente<sup>83</sup>. Por este motivo, pueden darse tres tipos de interacciones entre la enzima y el soporte que estarán más o menos favorecidas dependiendo de las condiciones de reacción: Incluso si todas las moléculas de la enzima son incorporadas inmediatamente al soporte, no es seguro que la enzima esté unida covalentemente al soporte. De hecho, cuando se utiliza un soporte activado, en la mayoría de los casos, al principio se produce una reacción de intercambio iónico entre la enzima y los grupos amino del soporte<sup>83-84</sup>.

De este modo, para descartar que la inmovilización tuvo lugar a través del intercambio iónico, los derivados se lavaron cuatro veces con una solución de NaCl 1 M. Dado que los iones de la sal compiten con la proteína para unirse a los grupos activados del soporte, este procedimiento promueve la liberación de las proteínas. Sin embargo, en este caso no se detectó la presencia de *TtHGXPRT* en el sobrenadante. Además, también se realizó un análisis SDS-PAGE en condiciones desnaturalizantes y reductoras de los derivados

inmovilizados *MTtHGXPR*T para detectar cualquier subunidad no unida covalentemente. Como se muestra en la Figura 9, se observó la presencia de subunidades monoméricas de *TtHGXPR*T después de hervir los derivados en presencia de SDS y mercaptoetanol. Estos resultados nos sugieren que no todas las subunidades fueron unidas covalentemente, y además esta podría ser otra razón para la pérdida significativa de actividad.



**Figura 9.** Análisis SDS-PAGE de la *TtHGXPR*T soluble e inmovilizada. Carril 1: estándar pre-teñido de proteína (BioRad) utilizado como marcador. Carril 2: Muestra del sobrenadante después de hervir la enzima libre en presencia de SDS y mercaptoetanol. Carril 3: Muestra del sobrenadante después de hervir el derivado *MTtHGXPR*T3 en presencia de SDS y mercaptoetanol. Carril 4: Muestra del sobrenadante después de hervir el derivado *MTtHGXPR*T5 en presencia de SDS y mercaptoetanol.

#### 4.3.1. Optimización de la carga enzimática

*TtHGXPR*T fue inmovilizado covalentemente sobre microesferas MagResyn®Amine activadas con glutaraldehído. Para ello, basándose en la información comentada en el apartado anterior, se prepararon diferentes biocatalizadores inmovilizados mediante la inmovilización de la enzima siguiendo diferentes estrategias. Por una parte, se empleó un tampón de fosfato potásico 50 mM pH 8,5 para la inmovilización a través del extremo N-terminal, derivados *MTtHGXPR*T1-*MTtHGXPR*T3. Por otra parte, la inmovilización a través de los residuos de lisina expuestos en la superficie se llevó a cabo con un tampón de borato sódico 50 mM pH 10, derivados *MTtHGXPR*T4-*MTtHGXPR*T5.

Los biocatalizadores magnéticos se prepararon aumentando la cantidad de enzima en contacto con el soporte para obtener una carga elevada de enzima unida al soporte (Tabla 2) y, por lo tanto, optimizar así la carga enzimática. En el primer caso, para los derivados

inmovilizados *MTtHGXPR*T1-3 todos mostraron un rendimiento de inmovilización similar, por lo que la concentración de la enzima parece no afectar a este parámetro. La actividad retenida también fue bastante similar en los tres casos, siendo *MTtHGXPR*T3 el derivado con mayor actividad retenida (29%). Además, dicho derivado inmovilizado mostró una actividad enzimática de 1581 UI/g, mientras que con *MTtHGXPR*T1-2 se obtuvieron 800 UI/g y 802 UI/g de actividad, respectivamente. Los derivados inmovilizados de manera multipuntual, *MTtHGXPR*T4-5, mostraron una ligera diferencia en el rendimiento de inmovilización. Al utilizar la máxima cantidad de enzima para la inmovilización, *MTtHGXPR*T5, se obtuvo un rendimiento de inmovilización del 71%. Sin embargo, para la carga enzimática más baja, *MTtHGXPR*T4, se observó un rendimiento del 67%. Los valores de actividad retenida fueron bastante similares también en este caso, 21% y 23% para *MTtHGXPR*T4 y *MTtHGXPR*T5, respectivamente. Finalmente, con el derivado *MTtHGXPR*T5 se alcanzó una actividad enzimática de 1108 UI/g, un valor mayor en comparación con la actividad obtenida con *MTtHGXPR*T4 (783 UI/g).

**Tabla 2.** Efecto del ratio enzima/soporte en la inmovilización de *TtHGXPR*T sobre el soporte MagReSyn® Amine.

Derivado	Carga enzimática (mg <sub>enz</sub> /g <sub>soporte</sub> )	Porcentaje de inmovilización (%)	Actividad enzimática (IU/g <sub>soporte</sub> )	Actividad retenida (%)
<b><i>MTtHGXPR</i>T pH 8,5</b>				
<i>MTtHGXPR</i> T1	102	84 ± 1	800 ± 33	25 ± 2
<i>MTtHGXPR</i> T2	226	88 ± 4	802 ± 29	21 ± 1
<i>MTtHGXPR</i> T3	322	85 ± 3	1581 ± 27	29 ± 2
<b><i>MTtHGXPR</i>T pH 10</b>				
<i>MTtHGXPR</i> T4	226	67 ± 2	783 ± 26	21 ± 4
<i>MTtHGXPR</i> T5	322	71 ± 3	1108 ± 21	23 ± 1

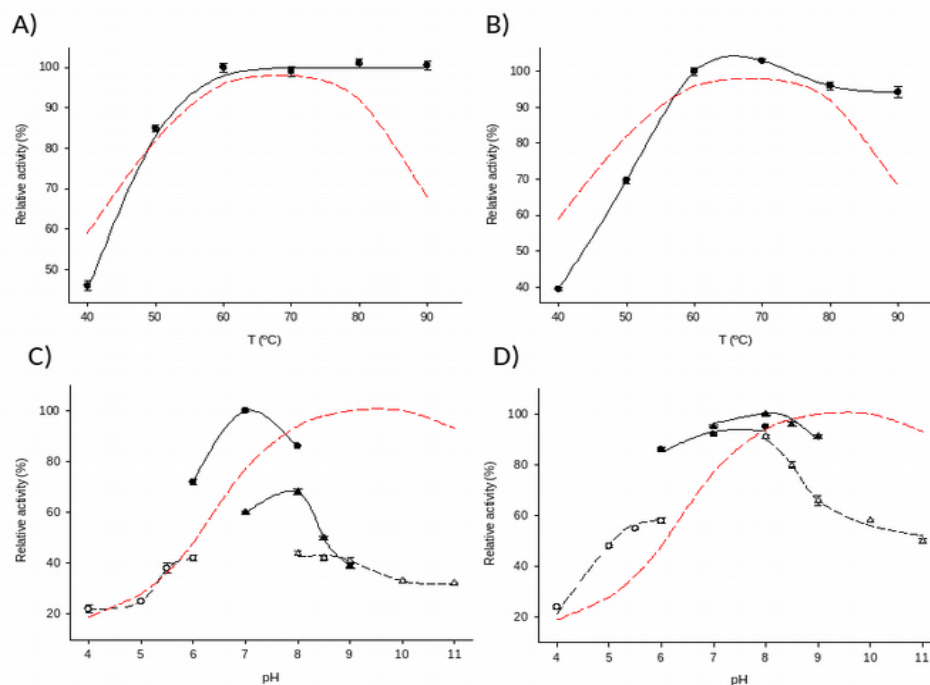
En vista de los resultados experimentales, *MTtHGXPR*T3 y *MTtHGXPR*T5 fueron elegidos como mejores derivados y fueron utilizados en los estudios bioquímicos posteriores. Entre estos dos, *MTtHGXPR*T3 mostró los mejores valores de actividad retenida y actividad enzimática (29% y 1581 UI/g, respectivamente), por lo que en función del criterio de actividad se consideró como el mejor biocatalizador entre el resto de derivados inmovilizados.

#### 4.3.2. Caracterización bioquímica del derivado *MTtHGXPR*T

Para determinar las condiciones de operación óptimas para el derivado inmovilizado se estudió la estabilidad y la actividad enzimática de los derivados *MTtHGXPR*T3 y *MTtHGXPR*T5 frente a diferentes valores de pH y temperatura. Además, con estas pruebas

también se evaluó si el proceso de inmovilización afectaba al comportamiento de la enzima frente a la temperatura y el pH.

El perfil de temperatura reveló que *MTtHGXPRT3* muestra una alta actividad (más del 80%) en un amplio rango de temperatura (de 50 °C a 90 °C), con un máximo de actividad a 60-90 °C (Figura 10A). De forma similar, *MTtHGXPRT5* mostró más del 90% de actividad en el rango de temperatura de 60-90 °C, con la su actividad máxima observada a 60-70 °C (Figura 10B). En este sentido, ambos derivados, *MTtHGXPRT3* y *MTtHGXPRT5*, mostraron una actividad mayor que la *TtHGXPRT* libre en un rango más amplio de altas temperaturas (actividad relativa <70% a 90 °C). Parece que las interacciones entre el soporte y la proteína aumentan la resistencia de la enzima frente a las altas temperaturas, lo que puede conducir a actividades más elevadas en tales condiciones.



**Figura 10.** Efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad de los derivados *MTtHGXPRT*. (A) Efecto de la temperatura sobre la actividad de (●) *MTtHGXPRT3* y *TtHGXPRT* (---). (B) Efecto de la temperatura sobre la actividad de (●) *MTtHGXPRT5* y *TtHGXPRT* (---). (C) Efecto del pH sobre la actividad de *MTtHGXPRT3* y *TtHGXPRT* (---); (○) citrato sódico 50 mM (pH 4-6), (●) fosfato sódico 50 mM (pH 6-8), (▲) Tris-HCl 50 mM (pH 7-9), (Δ) borato sódico 50 mM (pH 8-11). (D) Efecto del pH sobre la actividad de *MTtHGXPRT5* y *TtHGXPRT* (---); (○) citrato sódico 50 mM (pH 4-6), (●) fosfato sódico 50 mM (pH 6-8), (▲) Tris-HCl 50 mM (pH 7-9), (Δ) borato sódico 50 mM (pH 8-11).

No obstante, el perfil de pH reveló diferencias significativas entre ambos derivados. *MTtHGXPRT3* mostró alta actividad (actividad relativa > 80%) en el rango de pH 7-9, y no hubo diferencias sustanciales dependiendo de la naturaleza del tampón utilizado (actividad

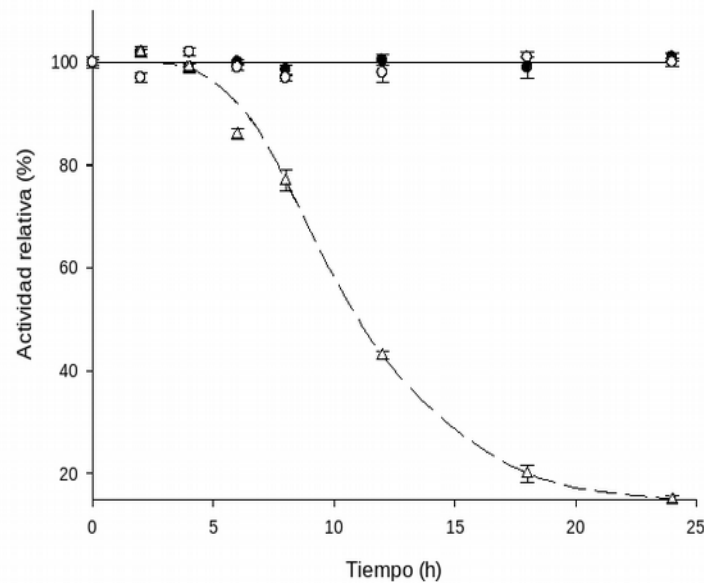
similar a pH 7 en tampón de fosfato sódico y Tris-HCl; actividad similar a pH 8 en tampón de fosfato sódico, Tris-HCl y borato sódico). Por el contrario, la actividad relativa de *MTtHGXPRT5* también fue alta (> 80%) en el rango de pH 7-8, pero en este caso si se vio fuertemente afectada por la naturaleza de la solución. De hecho, solo se observaron altos valores de actividad al ser incubada en fosfato sódico 50 mM. Dado que la *TtHGXPRT* libre tiene una excelente actividad (más del 80% respecto a la máxima actividad) en el rango de pH 8-11, los resultados mostrados en la Figura 10C-D demuestran que la dependencia del pH se ve afectada por el proceso de inmovilización.

#### 4.3.3. Termoestabilidad de los derivados inmovilizados

La estabilidad de la enzima libre también puede verse influenciada por el proceso de inmovilización, por lo que se realizaron experimentos adicionales para evaluar este fenómeno. En primer lugar, se analizó el efecto que puede ejercer el almacenamiento a 4 °C sobre los derivados inmovilizados, para poder garantizar la estabilidad del biocatalizador. En este sentido, los dos derivados seleccionados, *MTtHGXPRT3* y *MTtHGXPRT5*, mantuvieron su actividad durante más de 100 días (85% de actividad relativa). También se evaluó el efecto de la temperatura sobre la estabilidad de ambos derivados. Para este fin, los derivados *MTtHGXPRT3* y *MTtHGXPRT5* se incubaron durante 24 h en fosfato sódico 50 mM, pH 8, a 60 ° C. Curiosamente, se detectó una insignificante pérdida de actividad en al ser incubados en estas condiciones experimentales (Figura 11). Por el contrario, en los experimentos realizados anteriormente con la enzima libre, podemos observar que la estabilidad de *TtHGXPRT* si que se ve afectada durante largos períodos de incubación a altas temperaturas. Por lo tanto, podemos concluir que el proceso de inmovilización aumenta claramente la estabilidad térmica de *TtHGXPRT*.

Parece ser que un estado multimérico conduce a la obtención de una enzima inmovilizada más funcional y estable debido a interacciones multipuntuales que rigen la inmovilización<sup>84</sup>. En este sentido, la inmovilización enzimática por los residuos de lisina superficiales implica una mayor superficie de la proteína, lo que significa que la mayoría de las subunidades participan en el proceso de unión. Este hecho puede explicar los buenos resultados de termoestabilidad logrados con la *TtHGXPRT* inmovilizada a pH 10 (*MTtHGXPRT5*) (sin pérdida de actividad cuando se incubaba a 60 °C durante 24 h). Sin embargo, anteriormente descubrimos que no todas las subunidades están unidas covalentemente al soporte (Figura 9). Además, también se observa una estabilidad térmica inesperadamente alta para *TtHGXPRT* inmovilizada a pH 8,5 (inmovilización a través del extremo N terminal, *MTtHGXPRT3*). En este caso, el estado oligomérico de la enzima podría conducir a un proceso de inmovilización que implicaría varios N-terminales, aumentando así la estabilidad térmica de la proteína. También es importante mencionar que después de la primera

inmovilización, ciertos residuos de lisina podrían reaccionar debido a la proximidad con el soporte.



**Figura 11.** Inactivación térmica a 60 °C y pH 8 de *TtHGXPR3* libre (Δ), *TtHGXPR3* (●) y *TtHGXPR5* (○).

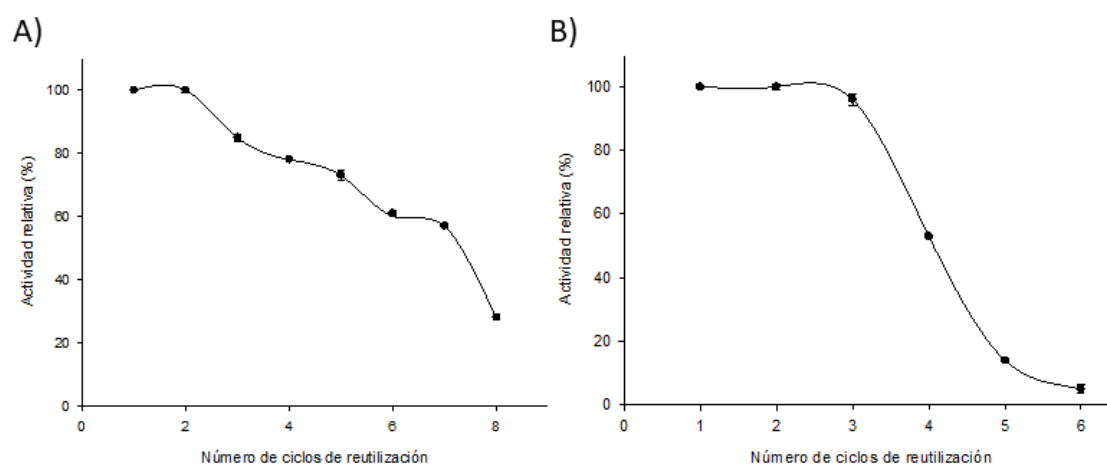
Resumiendo, los resultados experimentales obtenidos muestran una estabilidad térmica similar en ambos derivados. Recordemos que la reactividad de los residuos de lisina superficiales está alrededor del 50% a pH 10 y no todas las subunidades están covalentemente unidas. Por lo tanto, podemos decir que parece que la proteína estaría inmovilizada preferiblemente por los amino terminales en ambos casos (pH 8,5 y pH 10). Sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de una inmovilización covalente multipuntual adicional a pH 10.

#### 4.3.4. Reutilización del derivado

Una de las características más importantes que un biocatalizador inmovilizado debe mostrar para su aplicación en procesos industriales es la reutilización del derivado. El concepto de reutilización hace referencia al número de veces que el derivado puede ser utilizado conservando parte de su actividad. Se trata de una característica que permite una mayor sostenibilidad y un ahorro económico en el proceso industrial, ya que permite no tener que estar produciendo de nuevo la enzima para cada reacción de síntesis. En este sentido, como en las pruebas realizadas anteriormente pudimos establecer las condiciones óptimas de reacción, el siguiente paso fue evaluar la capacidad de reutilización de la *TtHGXPR3*

inmovilizada. Para este fin, ambos derivados inmovilizados fueron empleados en ocho reacciones consecutivas.

Tal y como podemos observar en la Figura 12, *MTtHGXPRT3* y *MTtHGXPRT5* sufrieron una pérdida progresiva de actividad a medida que aumentó el número de ciclos de reutilización. *MTtHGXPRT3* podría reutilizarse eficientemente durante al menos siete ciclos, manteniendo >60% de la actividad retenida en la síntesis enzimática de IMP. En el caso de *MTtHGXPRT5*, desafortunadamente sufrió una disminución drástica de la actividad después de tres ciclos, obteniendo un <60% de la actividad retenida después de cuatro ciclos. Estos resultados sugieren que la inmovilización covalente multipuntual podría estar ocurriendo a pH 10. Esta metodología de inmovilización puede conducir a la rigidificación de *TtHGXPRT*, alterando así la conformación de la enzima y distorsionando su centro activo. Aún así, podemos decir que ambos derivados muestran una tendencia similar.



**Figura 12.** Evaluación del número de reutilizaciones en la producción de IMP. (A) *MTtHGXPRT3*. (B) *MTtHGXPRT5*.

Teniendo en cuenta todos los resultados experimentales comentados previamente (carga enzimática, actividad retenida, influencia de la temperatura y pH sobre la actividad enzimática y estabilidad térmica), *MTtHGXPRT3* fue elegido como el mejor derivado para aplicaciones sintéticas, ya que se obtuvieron mejores resultados con este derivado.

#### 4.4. Evaluación del ratio molar

*TtHGXPRT* es responsable de la síntesis reversible de IMP y GMP. La naturaleza reversible de la reacción conduce a una menor conversión de los sustratos, obteniendo una menor cantidad de productos deseados. Por lo tanto, para evitar la reacción inversa, se analizaron diferentes proporciones iniciales de hipoxantina, PRPP y  $MgCl_2$ . Como se muestra en la Tabla 3, un exceso de hipoxantina conduce a un aumento de la conversión, y de esta



manera se consiguió una actividad enzimática  $\geq 2$  veces mayor. Por lo tanto, parece que un exceso de hipoxantina cambia parcialmente el equilibrio de la reacción. Sin embargo, un exceso de  $MgCl_2$  es claramente perjudicial para el proceso enzimático, ya que se obtuvieron tasas de conversión más bajas. De acuerdo con los resultados experimentales, la relación 2:1:1 (Hyp/PRPP/ $MgCl_2$ ) parece ser la relación molar óptima.

**Tabla 3.** Efecto del ratio de sustratos en la actividad de *MtHGXPRT3*.

<b>PRPP (mM)</b>	<b>Hipoxantina (mM)</b>	<b><math>MgCl_2</math> (mM)</b>	<b>IMP (mM)</b>	<b>Actividad enzimática (IU/gsoporte)</b>
10	10	12	2,1 ± 0,1	1830 ± 24
	10	24	1,1 ± 0,2	962 ± 32
	20	12	3,0 ± 0,1	2400 ± 57
	20	24	1,4 ± 0,1	1060 ± 35

Finalmente, se evaluó si la presencia de fosfato afecta a la reacción. Se sabe que una alta concentración de iones fosfato puede quelar los iones  $Mg^{2+}$ , disminuyendo la concentración de cationes en el medio de reacción. Como estos cationes son esenciales para la síntesis de NMPs, un exceso de fosfato podría disminuir la tasa de conversión. En este sentido, probamos la reacción de transferencia de grupo en presencia de tampón de fosfato sódico, Tris-HCl y tampón de borato sódico a pH 8. Los resultados mostraron que el fosfato sódico no afecta a la actividad de la proteína (Figura 10).

#### 4.5. Síntesis enzimática de IMP y GMP

Para explorar el potencial de *MtHGXPRT3* como biocatalizador industrial, se llevó a cabo la producción enzimática de varios NMPs de interés en la dieta (IMP y GMP) utilizando altas concentraciones de bases púricas poco solubles (guanina e hipoxantina) (Tabla 4). Para este fin, se usaron diferentes cantidades de enzima inmovilizada (12-30  $\mu g$ ) con el objetivo obtener la mayor conversión posible. Teniendo en cuenta la relación molar establecida como óptima en experimentos previos, se empleó una relación 2:1 de hipoxantina y PRPP, respectivamente. En este sentido, se emplearon concentraciones de hipoxantina y guanina que variaban de 20 mM a 80 mM. Debido al ratio 2:1 mencionado, se empleó un intervalo 10-40 mM de PRPP para las correspondientes concentraciones de bases púricas. La reacción se llevó a cabo con 12 o 48 mM  $MgCl_2$  a 60 °C durante 10 min.



**Tabla 4.** Producción enzimática de IMP y GMP catalizada por *MtHGXPRT3*.

	PRPP (mM)	Base (mM)	MgCl <sub>2</sub> (mM)	Derivado (µg)	NMP (mM)	Actividad enzimática (IU/g <sub>soporte</sub> )
<b>Síntesis de IMP</b>						
	10	20	12	12	2,9 ± 0,1	2200 ± 24
	20	40	24	12	2,4 ± 0,2	1654 ± 29
	40	80	48	12	4,8 ± 0,2	3365 ± 45
	10	20	12	30	3,8 ± 0,1	2800 ± 69
	20	40	24	30	5,6 ± 0,1	4400 ± 100
	40	80	48	30	7,5 ± 0,1	5600 ± 49
<b>Síntesis de GMP</b>						
	10	20	12	12	1,6 ± 0,1	1149 ± 120
	20	40	24	12	3,7 ± 0,1	2722 ± 80
	40	80	48	12	1,4 ± 0,2	1000 ± 70
	10	20	12	30	3,8 ± 0,1	2835 ± 87
	20	40	24	30	3,2 ± 0,1	2335 ± 90
	40	80	48	30	2,4 ± 0,2	1790 ± 56

La gran termoestabilidad del derivado inmovilizado junto con su tolerancia a condiciones alcalinas sugieren que podría emplearse como biocatalizador industrial para la síntesis de NMPs relevantes en la industria alimentaria. Como se observa en la Tabla 4, la mayor cantidad de IMP se logró cuando *MtHGXPRT3* se incubó con las mayores concentraciones de sustrato (80 mM de hipoxantina y 40 mM de PRPP) y en presencia de 48 mM de MgCl<sub>2</sub>. Por el contrario, en la producción de GMP, se obtuvieron los mejores resultados al utilizar guanina 20 mM en presencia de MgCl<sub>2</sub> 12 mM.

## 5. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- *Tt*HGXPRT muestra una significativa estabilidad y actividad fosforribosiltransferasa en un amplio rango de temperaturas (60-90 °C) y pH. Siendo los valores óptimos de reacción 60 °C y pH 8.
- Por primera vez, *Tt*HGXPRT fue inmovilizada covalentemente en microesferas magnéticas activadas con glutaraldehído (MagReSyn® Amine). Se llevaron a cabo dos procedimientos de inmovilización.
  - Inmovilización covalente a través del N-terminal.
  - Inmovilización covalente multipuntual a través de las lisinas expuestas en la superficie.
- *MTt*HGXPRT3 fue elegido como el mejor biocatalizador entre el resto de derivados inmovilizados.
  - Mostró una actividad de 1581 UI/g y una actividad retenida del 29%.
- *MTt*HGXPRT3 mostró mejores propiedades que la enzima libre.
  - Mantuvo la actividad enzimática máxima a través de un rango de temperatura más amplio (60-90 °C).
  - Mostró una mayor estabilidad térmica, manteniendo la máxima actividad enzimática tras el período de incubación (25 ha 60 °C).
- *MTt*HGXPRT3 pudo ser reutilizado hasta en siete ciclos consecutivos.

En conjunto, estos resultados sugieren que *Tt*HGXPRT puede ser inmovilizado eficientemente, ya que es capaz de resistir las duras condiciones requeridas en el proceso de inmovilización. Además, la enzima inmovilizada podría ser un biocatalizador adecuado para la producción industrial de NMPs de interés en la industria alimentaria, tales como IMP o GMP.

## 6. REFERENCIAS

1. Brock, T. D. Life at high temperatures. *Science*. **1985**, *230*, 132-138.
2. Mesbah, N. M.; Wiegel, J. Life at Extreme Limits. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2008**, *1125*, 44-57.
3. Sonnleitner, B.; Fiechter, A. Advantages of using thermophiles in biotechnological processes: expectations and reality. *Trends Biotechnol.* **1983**, *1*, 74-80.
4. Zeldes, B. M.; Keller, M. W.; Loder, A. J.; Straub, C. T.; Adams, M. W. W.; Kelly, R. M. Extremely thermophilic microorganisms as metabolic engineering platforms for production of fuels and industrial chemicals. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 1209.
5. Niehaus, F.; Bertoldo, C.; Kahler, M.; Antranikian, G. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1999**, *51*, 711-729.
6. Blochl, E.; Rachel, R.; Burggraf, S.; Hafenbradl, D.; Jannasch, H. W.; Stetter, K. O. *Pyrolobus fumarii*, gen. and sp. nov., represents a novel group of archaea, extending the upper temperature limit for life to 113 °C. *Extremophiles*. **1997**, *1*, 14-21.
7. Kashefi, K.; Lovley, D. R. Extending the upper temperature limit for life. *Science*. **2003**, *301*, 934.
8. Brock, T. D.; Freeze, H. *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile. *J. Bacteriol.* **1969**, *98*, 289-297.
9. Da Costa, M. S.; Nobre, M. F.; Rainey, F. Genus *Thermus*. *Bergey's Man. Syst. Bacteriol.* **2001**, *1*, 404-414.
10. Cava, F.; Zafra, O.; da Costa, M. S.; Berenguer, J. The role of the nitrate respiration element of *Thermus thermophilus* in the control and activity of the denitrification apparatus. *Environ. Microbiol.* **2008**, *10*, 522-533.
11. Weisburg, W. G.; Giovannoni, S. J.; Woese, C. R. The *Deinococcus-Thermus* phylum and the effect of rRNA composition on phylogenetic tree construction. *Syst. Appl. Microbiol.* **1989**, *11*, 128-134.
12. Griffiths, E.; Gupta, R. S. Distinctive protein signatures provide molecular markers and evidence for the monophyletic nature of the *Deinococcus-Thermus* phylum. *J. Bacteriol.* **2004**, *186*, 3097-3107.
13. Omelchenko, M. V.; Wolf, Y. I.; Gaidamakova, E. K.; Matrosova, V. Y.; Vasilenko, A.; Zhai, M.; Daly, M. J.; Koonin, E. V.; Makarova, K. S. Comparative genomics of *Thermus thermophilus* and *Deinococcus radiodurans*: divergent routes of adaptation to thermophily and radiation resistance. *BMC. Evol. Biol.* **2005**, *5*, 57.

14. Griffiths, E; Gupta, R. S. Identification of signature proteins that are distinctive of the *Deinococcus-Thermus* phylum. *Int. Microbiol.* **2007**, *10*, 201-208.
15. Averhoff, B.; Muller, V. Exploring research frontiers in microbiology: recent advances in halophilic and thermophilic extremophiles. *Res. Microbiol.* **2010**, *161*, 506-514.
16. Jenney, F. E.; Adams, M. W. The impact of extremophiles on structural genomics (and vice versa). *Extremophiles.* **2008**, *12*, 39-50.
17. De Clercq, E. Recent highlights in the development of new antiviral drugs. *Curr. Opin. Microbiol.* **2005**; *8*, 552-560.
18. Galmarini, C. M.; Mackey, J. R.; Dumontet, C. Nucleoside analogues and nucleobases in cancer treatment. *Lancet. Oncol.* **2002**, *3*, 415-424.
19. Parker, W. B. Enzymology of Purine and Pyrimidine Antimetabolites Used in the Treatment of Cancer. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2880-2893.
20. Behrens, M.; Meyerhof, W.; Hellfritsch, C.; Hofmann, T. Sweet and umami taste: Natural products, their chemosensory targets, and beyond. *Angew Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 2220-2242.
21. Hawkes, J. S.; Gibson, R. A.; Robertson, D.; Makrides, M. Effect of dietary nucleotide supplementation on growth and immune function in term infants: A randomized controlled trial. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2006**, *60*, 254-264.
22. Yoshikawa, M.; Kato, T.; Takenishi, T. Studies of phosphorylation. III. Selective phosphorylation of unprotected nucleosides. *B. Chem. Soc. Jpn.* **1969**, *42*, 3505-3508.
23. Fresco-Taboada, A.; de la Mata, I.; Arroyo, M.; Fernández-Lucas, J. New insights on nucleoside 2'-deoxyribosyltransferases: a versatile biocatalyst for one-pot one-step synthesis of nucleoside analogs. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97*, 3773-3785.
24. Serra, I.; Conti, S.; Piškur, J.; Clausen, A. R.; Munch-Petersen, B.; Terreni, M.; Ubiali, D. Immobilized *Drosophila melanogaster* deoxyribonucleoside kinase (*DmdNK*) as a high performing biocatalyst for the synthesis of purine arabinonucleotides. *Adv. Synth. Catal.* **2014**, *356*, 563-570.
25. Li, Y.; Ding, Q.; Ou, L.; Qian, Y.; Zhang, J. One-pot process of 2'-deoxyguanylic acid catalyzed by a multi-enzyme system. *Biotechnol. Bioprocess. Eng.* **2015**, *20*, 37-43.
26. Fernández-Lucas, J. Multienzymatic synthesis of nucleic acid derivatives: a general perspective. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99*, 4615-4627.
27. Zou, Z.; Ding, Q.; Ou, L.; Yan, B. Efficient production of deoxynucleoside-5'-monophosphates using deoxynucleoside kinase coupled with a GTP-regeneration system. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97*, 9389-9395.

28. Mori, H.; Iida, A.; Teshiba, S.; Fujio, T. Cloning of a guanosine-inosine kinase gene of *Escherichia coli* and characterization of the purified gene product. *J. Bacteriol.* **1995**, *177*, 4921-4926.
29. Mori, H.; Iida, A.; Fujio, T.; Teshiba, S. A novel process of inosine 5'-monophosphate production using overexpressed guanosine/inosine kinase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1997**, *48*, 693-698.
30. Liu, Z. Q.; Zhang, L.; Sun, L. H.; Li, X. J.; Wan, N. W.; Zheng, Y. G. Enzymatic production of 5'-inosinic acid by a newly synthesised acid phosphatase/phosphotransferase. *Food. Chem.* **2012**, *134*, 948-956.
31. Mihara, Y.; Utagawa, T.; Yamada, H.; Asano, Y. Phosphorylation of nucleosides by the mutated acid phosphatase from *Morganella morganii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66*, 2811-2816.
32. Zou, H.; Cai, G.; Cai, W.; Li, H.; Gu, Y.; Park, Y.; Meng, F. Extraction and DNA digestion of 5'-phosphodiesterase from malt root. *Tsinghua. Sci. Technol.* **2008**, *13*, 480-484.
33. Scism, R. A.; Stec, D. F.; Bachmann, B. O. Synthesis of nucleotide analogues by a promiscuous phosphoribosyltransferase. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 4179-4182.
34. Scism, R. A.; Bachmann, B. O. Five-component cascade synthesis of nucleotide analogues in an engineered self-immobilized enzyme aggregate. *ChemBioChem.* **2010**, *11*, 67-70.
35. Del Arco, J.; Fernández-Lucas, J. Purine and Pyrimidine Phosphoribosyltransferases: A versatile tool for enzymatic synthesis of nucleoside-5'-monophosphates. *Curr. Pharm. Des.* **2017**, *23*, 1-15.
36. Del Arco, J.; Acosta, J.; Pereira, H.M.; Perona, A.; Lokanath, N.K.; Kunishima, N.; Fernández-Lucas, J. Enzymatic production of non-natural nucleoside-5'-monophosphates by a novel thermostable uracil phosphoribosyltransferase. *ChemCatChem.* **2017**, *9*, 1-11.
37. Del Arco, J.; Martinez, M.; Donday, M.; Clemente-Suarez, V.J.; Fernández-Lucas, J. Cloning, expression and biochemical characterization of xanthine and adenine phosphoribosyltransferases from *Thermus thermophilus* HB8. *Biocatal. Biotransfor.* **2017**, *36*, 1-8.
38. Del Arco, J.; Cejudo-Sanches, J.; Esteban, I.; Clemente-Suarez, V.J.; Hormigo-Cisneros, D.; Perona, A.; Fernández-Lucas, J. Enzymatic production of dietary nucleotides from low-soluble purine bases by an efficient, thermostable and alkali-tolerant biocatalyst. *Food. Chem.* **2017**, *237*, 605-611.
39. Mikhailopulo, I.A. *Biotechnology of nucleic acid constituents—State of the art and perspectives.* *Curr. Org. Chem.* **2007**, *11*, 317-335.

40. Lewkowicz, E.S.; Iribarren, A.M. Nucleoside phosphorylases. *Curr. Org. Chem.* **2006**, *10*, 1197–1215.
41. Zhou, X.; Szeker, K.; Janocha, B.; Böhme, T.; Albrecht, D.; Mikhailopulo, I.A.; Neubauer, P. Recombinant purine nucleoside phosphorylases from thermophiles: Preparation, properties and activity towards purine and pyrimidine nucleosides. *FEBS J.* **2013**, *280*, 1475–1490.
42. Iglesias, L.E.; Lewkowicz, E.S.; Medici, R.; Bianchi, P.; Iribarren, A.M. Biocatalytic approaches applied to the synthesis of nucleoside prodrugs. *Biotechnol. Adv.* **2015**, *33*, 412–434.
43. Fernández-Lucas, J.; Acebal, C.; Sinisterra, J.V.; Arroyo, M.; de la Mata, I. *Lactobacillus reuteri* 2'-deoxyribosyltransferase, a novel biocatalyst for tailoring of nucleosides. *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, 1462–1470.
44. Crespo, N.; Sánchez-Murcia, P. A.; Gago, F.; Cejudo-Sanches, J.; Galmes, M. A.; Fernández-Lucas, J.; Mancheño, J. M. 2'-deoxyribosyltransferase from *Leishmania mexicana*, an efficient biocatalyst for one-pot, one-step synthesis of nucleosides from poorly soluble purine bases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, *101*, 7187–7200.
45. Fresco-Taboada, A.; Serra, I.; Arroyo, M.; Fernández-Lucas, J.; de la Mata, I.; Terreni, M. Development of an immobilized biocatalyst based on *Bacillus psychrosaccharolyticus* NDT for the preparative synthesis of trifluridine and decytabine. *Catal. Today* **2016**, *259*, 197–204.
46. el Kouni, M. H. Potential chemotherapeutic targets in the purine metabolism of parasites. *Pharmacol. Ther.* **2003**, *99*, 283-309.
47. Villela, A. D.; Sanchez-Quitian, Z. A.; Ducati, R. G.; Santos, D. S.; Basso, L. A. Pyrimidine salvage pathway in *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 1286-1298.
48. Zhang, Y.; Evans, G. B.; Clinch, K.; Crump, D. R.; Harris, L. D.; Fröhlich, R. F.; Tyler, P. C.; Hazleton, K. Z.; Cassera, M. B.; Schram, V. L. Transition state analogues of *Plasmodium falciparum* and human orotate phosphoribosyltransferases. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 34746-34754.
49. Leija, C.; Rijo-Ferreira, F.; Kinch, L. N.; Grishin, N. V.; Nischan, N.; Kohler, J. J.; Hu, Z.; Phillips, M. A. Pyrimidine salvage enzymes are essential for *de novo* biosynthesis of deoxypyrimidine nucleotides in *Trypanosoma brucei*. *PLoS Pathog.* **2016**; *12*, 1-30.
50. Kadziola, A.; Neuhard, J.; Larsen, S. Structure of product-bound *Bacillus caldolyticus* uracil phosphoribosyltransferase confirms ordered sequential substrate binding. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **2002**, *58*, 936-945.

51. Villela, A. D.; Ducati, R. G.; Rosado, L. A.; Bloch, C. J., Prates, M. V., Gonçalves, D. C.; Ramos, C. H. I.; Basso, L. A.; Santos, D. S. Biochemical characterization of uracil phosphoribosyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS one*. **2013**, *8*, e56445.
52. Xu, Y.; Eads, J.; Sacchettini, J. C.; Grubmeyer, C. Kinetic mechanism of human hypoxanthine–guanine phosphoribosyltransferase: rapid phosphoribosyltransfer chemistry. *Biochemistry*. **1997**, *36*, 3700-3712.
53. Munagala, N. R.; Chin, M. S.; Wang, C. C. Steady-state kinetics of the hypoxanthine-guanine-xanthine phosphoribosyltransferase from *Trichomonas foetus*: the role of threonine-47. *Biochemistry*. **1998**, *37*, 4045-4051.
54. Tao, W.; Grubmeyer, C.; Blanchard, J. S. Transition state structure of *Salmonella typhimurium* orotate phosphoribosyltransferase. *Biochemistry*. **1996**, *35*, 14-21.
55. Zhang, Y.; Deng, H.; Schramm, V. L. Leaving group activation and pyrophosphate ionic state at the catalytic site of *Plasmodium falciparum* orotate phosphoribosyltransferase. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 17023-17031.
56. Krungkrai, S. R.; Aoki, S.; Palacpac, N. M. Q.; Sato, D.; Mitamura, T.; Krungkrai, J.; Horii, T. Human malaria parasite orotate phosphoribosyltransferase: functional expression, characterization of kinetic reaction mechanism and inhibition profile. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2004**; *134*, 245-255.
57. Natalini, P.; Ruggieri, S.; Santarelli, I.; Vita, A.; Magni, G. Baker's yeast UMP: pyrophosphate phosphoribosyltransferase. Purification, enzymatic and kinetic properties. *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 1558-1563.
58. Berti, P. J.; McCann, J. A. Toward a detailed understanding of base excision repair enzymes: transition state and mechanistic analyses of N-glycoside hydrolysis and N-glycoside transfer. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 506–555.
59. Jensen, K. F.; Mygind, B. Different oligomeric states are involved in the allosteric behavior of uracil phosphoribosyltransferase from *Escherichia coli*. *FEBS J.* **1996**, *240*, 637-645.
60. Linde, L.; Jensen, K. F. Uracil phosphoribosyltransferase from the extreme thermoacidophilic archaeobacterium *Sulfolobus shibatae* is an allosteric enzyme, activated by GTP and inhibited by CTP. *BBA. Protein. Struct. Mol. Enzymol.* **1996**, *1296*, 16-22.
61. Craig, S. P.; Eakin, A. E. Purine phosphoribosyltransferases. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 20231-20234.
62. Esipov, R. S.; Fateev, I. V.; Konstantinova, I. D.; Kostromina, M. A.; Muravyova, T. I.; Artemova, K.; G.; Miroshnikov, A. I. A cascade of thermophilic enzymes as an approach to the synthesis of modified nucleotides. *Acta Naturae*. **2016**, *8*, 82-90.

63. Iglesias LE, Lewkowicz ES, Medici R, Bianchi P, Iribarren AM. Biocatalytic approaches applied to the synthesis of nucleoside prodrugs. *Biotechnol. Adv.* **2015**, 33, 412-434.
64. Schramm, V. L.; Grubmeyer, C. Phosphoribosyltransferase mechanisms and roles in nucleic acid metabolism. *Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol.* **2004**, 78, 261-304.
65. Boitz, J. M.; Ullman, B. Amplification of adenine phosphoribosyltransferase suppresses the conditionally lethal growth and virulence phenotype of *Leishmania donovani* mutants lacking both hypoxanthine-guanine and xanthine phosphoribosyltransferases. *J. Biol. Chem.* **2010**, 285, 18555-18564.
66. Tuttle, J. V. Krenitsky, T. A. Purine phosphoribosyltransferases from *Leishmania donovani*. *J. Biol. Chem.* **1980**, 235, 909-916.
67. Chen, Q.; You, D.; Hu, M.; Gu, X.; Luo, M.; Lu, S. Cloning, purification, and characterization of thermostable hypoxanthine–guanine phosphoribosyltransferase from *Thermoanaerobacter tengcongensis*. *Protein Expr. Purif.* **2003**, 32, 239–245.
68. de Souza Dantas, D.; dos Santos, C. R.; Pereira, G. A. G.; Medrano, F. J. Biochemical and structural characterization of the hypoxanthine-guanine-xanthine phosphoribosyltransferase from *Pyrococcus horikoshii*. *BBA Proteins Proteom.* **2008**, 1784, 953–960.
69. Hansen, M. R.; Jensen, K. S.; Rasmussen, M. S.; Christoffersen, S.; Kadziola, A.; Jensen, K. F. Specificities and pH profiles of adenine and hypoxanthine–guanine–xanthine phosphoribosyltransferases (nucleotide synthases) of the thermoacidophile archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Extremophiles.* **2014**, 18, 179–187.
70. Kanagawa, M.; Baba, S.; Ebihara, A.; Shinkai, A.; Hirotsu, K.; Mega, R.; Kim, K.; Kuramitsu, G.; Kawai, G. Structures of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (TTHA0220) from *Thermus thermophilus* HB8. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **2010**, 66, 893–898.
71. Del Arco, J.; Martínez-Pascual, S.; Clemente-Suárez, V. J.; Corral, O. J.; Jordaan, J.; Hormigo, D.; Perona, A.; Fernández-Lucas, J. One-Pot, One-Step Production of Dietary Nucleotides by Magnetic Biocatalysts. *Catalysts.* **2018**, 8, 184.
72. Sheldon R. A. Enzyme immobilization: The quest for optimum performance. *Adv. Synth. Catal.* **2007**, 349, 1289-1307.
73. Tanaka, A.; Kawamoto, T. In protein immobilization: Fundamentals and applications; Taylor, R. F., Ed.; Marcel Dekker: New York, **1991**.
74. Cao L. In carrier-bound immobilized enzymes: principles, application and design; Wiley: New York, **2005**.
75. Brena, B. M.; Batista-Viera, F. Immobilization of Enzymes. A Literature survey. In *Immobilization of Enzymes and Cells*. Humana Press: New York, 2006; Vol. 22; pp 15-30.



76. O'Driscoll K. Techniques of enzyme entrapment in gels. In *Methods in enzymology*. Humana Press: New York, 1976; Vol. 44; pp 169-183.
77. Lalonde J.; Margolin A. Immobilization of enzymes. In *Enzyme catalysis in organic chemistry*. Wiley: New York, 2002; pp 163-184.
78. Datta S.; Christena L. R.; Rajaram Y. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *Biotech.* **2013**, *3*, 1-9.
79. St Clair, N.; Navia, M. Cross-linked enzyme crystals as robust biocatalysts. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7314-7316.
80. Cao L. Covalent Enzyme Immobilization. In *Carrier-bound Immobilized Enzymes*. Wiley: New York, 2005; pp 169-316.
81. Gill, S. C.; Von Hippel, P. H. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* **1989**, *182*, 319-326.
82. Yuan, S.; Chan, H. S.; Filipek, S.; Vogel, H. PyMOL and linkscape bridge the data and the data visualization. *Structure.* **2016**, *24*, 2041-2042.
83. Barbosa, O.; Ortiz, C.; Berenguer-Murcia, Á.; Torres, R.; Rodrigues, R. C.; Fernandez-Lafuente, R. Glutaraldehyde in bio-catalysts design: a useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 1583–600.
84. Barbosa, O.; Torres, R.; Ortiz, C.; Berenguer-Murcia, Á.; Rodrigues, R. C.; Fernandez-Lafuente, R. Heterofunctional supports in enzyme immobilization: from traditional immobilization protocols to opportunities in tuning enzyme properties. *Biomacromolecules.* **2013**, *14*, 2433–62.