

Universidad ORT Uruguay  
Facultad de Ingeniería

# Aplicaciones enzimáticas para la modificación de la ribostamicina.

Entregado como requisito para la obtención del título de Licenciado en Biotecnología.

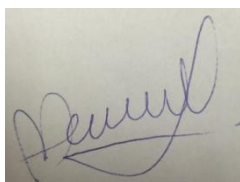
Virginia Toledo - 177090  
Tutor: Lorena Betancor  
Co-tutor: Erienne Jackson

2016

## Declaración de autoría.

Yo, Virginia Toledo, declaro que el trabajo que se presenta en esta obra es de mi propia mano. Puedo asegurar que:

- La obra fue producida en su totalidad mientras realizaba este trabajo de grado denominado “Aplicaciones enzimáticas in vitro para la modificación de la ribostamicina”.
- Cuando he consultado el trabajo publicado por otros, lo he atribuido con claridad;
- Cuando he citado obras de otros, he indicado las fuentes. Con excepción de estas citas, la obra es enteramente mía;
- En la obra, he acusado recibo de las ayudas recibidas;
- Cuando la obra se basa en trabajo realizado conjuntamente con otros, he explicado claramente qué fue contribuido por otros, y que fue contribuido por mi;
- Ninguna parte de este trabajo ha sido publicada previamente a su entrega, excepto donde se han realizado las aclaraciones correspondientes.



Virginia Toledo 12 de septiembre de 2016

## Resumen

Debido al gran auge de nuevos antibióticos que surge de la resistencia por parte de los microorganismos, el estudio de la obtención de nuevos antibióticos como la modificación de antibióticos existentes ha sido un área de interés en los últimos años.

Si bien la producción de un nuevo fármaco implica una gran inversión económica y de tiempo, estos siguen siendo la mejor alternativa para combatir infecciones en el área clínica.

La modificación de antibióticos se ha estudiado tanto a nivel químico como mediante bio-catálisis. Esta última, provee una gran ventaja frente a otras estrategias ya que las reacciones son sumamente específicas, selectivas y muy eficientes.

Sin embargo, es importante destacar algunas de las desventajas que estos catalizadores poseen para su uso *in-vitro*, como su baja estabilidad y su limitada reutilización, es por ello que existen estrategias para mejorar las posibilidades de uso *in-vitro* de las enzimas. Una de ellas es la integración de las enzimas a soportes sólidos.

La Butirosina es un antibiótico aminoglucósido utilizado para tratar infecciones de bacterias gran-negativas. En su síntesis se ven implicadas más de 15 enzimas, de las cuales 2 son los protagonistas, la aciltransferasa BtrH y ciclotransferasa BtrG. La primera de estas se encarga de transferir un grupo acil desde un sustrato hacia otro, mientras que la segunda desglutamina, liberando así un grupo amino de la Butirosina.

El objetivo de este trabajo es fue la expresión, purificación y estudio *in-vitro* de las ribostamicina.

Se realizó la optimización del protocolo de purificación tanto para BtrH como para BtrG, obteniendo una mejora en el tiempo empleado para llevar a cabo esta tarea. Para BtrH se obtuvo 13.6 mg totales con una actividad enzimática de  $5,9 \times 10^{-6}$  UI, mientras que para BtrG se obtuvieron 23.4 mg.

Por otra parte, se inmovilizó la proteína BtrH mediante dos estrategias. Una de ellas fue por atrapamiento en nanopartículas de sílica biomimética. La segunda estrategia consistió en la inmovilización en superficie de nanopartículas de sílica biomiméticas a través de glutaraldehído. Para la inmovilización de BtrH, se obtuvo un 81.5% en la inmovilización con glutaraldehído mientras que para la inmovilización por atrapamiento fue de 76%.

Como resultados de estos inmovilizados, se puede decir que ambas estrategias resultaron efectivas en la estabilidad frente a la temperatura, obteniéndose una mayor estabilidad de la enzima inmovilizada frente a la soluble a las temperaturas testeadas.

Por otra parte, se analizó tanto la temperatura como el pH óptimo de la enzima soluble, como parte del a caracterización de la misma. Según los resultados preliminares obtenidos, el pH óptimo ronda entre 7,5 – 7,9.

## **Palabras clave**

Inmovilización – Sílica biomimética – Purificación – Caracterización enzimática –  
Aciltransferasa - BtrH – Ciclotransferasa - BtrG

## Abreviaturas

%I: Porcentaje de inmovilización

%R: Porcentaje de rendimiento

AHBA: (S)-2-hidroxitiril -4-amino

BCA: Ácido bicinconínico

BSA: seroalbúmina Bovina

BtrG: Ciclotransferasa

BtrH: Aciltrasferasa

E. coli: Escherichia coli

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

HEPES: Ácido 4-(2-hidroxietyl)-1-piperazineetanesulfónico

His: Histidina

IPTG: Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido

NaCl: Cloruro de sodio

PEI: Polietilenimina

PVP: Polivinilpirrolidona

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

# Índice

<b>1. Introducción</b> .....	<b>8 - 14</b>
1.1. Biocatálisis .....	8
1.2. Síntesis biocatalítica de antibióticos .....	8 - 9
1.2.1. El caso de los antibióticos aminoglucósidos .....	9 – 10
1.3. Cascada biosintética para la síntesis de Butirosina .....	
1.4. Inmovilización de enzimas.	
1.5. Sílica biomimética como soporte de inmovilización.	
1.6. Hipótesis de trabajo.	
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>13</b>
<b>3. Materiales</b> .....	<b>14</b>
<b>4. Metodología</b> .....	<b>15- 25</b>
4.1. <b>Expresión de BtrG y BtrH</b> .....	<b>15</b>
4.2. <b>Purificación de BtrG y BtrH</b> .....	<b>15 – 19</b>
4.2.1. Síntesis de agarosa-IDA .....	
4.2.2. Optimización de la purificación.....	16 - 18
4.2.2.1. Protocolo de purificación .....	16
4.2.2.2. Intercambiador aniónico mediante el soporte Dietilaminoetil Sephadex (DADE).....	17
4.2.2.3. Hidratación del soporte comercial DADE.....	18
4.2.2.4. Purificación de BtrH por intercambio aniónico.....	18
4.2.2.5. Tratamiento de concentradores de membrana 30 KDa.....	19
4.3. Cuantificación de la concentración proteica.....	19 - 20
4.4. Medida de actividad enzimática.....	20
4.5. Análisis electroforéticos.....	19- 20
4.6. <b>Estudio de algunas propiedades bioquímicas de BtrH</b> .....	
4.6.1. Temperatura óptima.	
4.6.2. Estabilidad en temperatura.	
4.6.3. pH óptimo.	
4.6.4. Estabilidad en pH.	
4.7. <b>Estrategias de inmovilización en nano-partículas de sílica</b> ...	<b>20 – 22</b>
4.7.1. Inmovilización covalente en nanopartículas de sílica activada con glutaraldeído .....	
4.7.1.1. Síntesis de nanopartículas de sílica con núcleo de BSA .....	
4.7.1.2. Funcionalización de nanopartículas de sílica con glutaraldeído ..	20
4.7.1.3. Inmovilización de BtrH y BtrG sobre la superficie de las nanopartículas con núcleo de BSA .....	
4.7.2. Inmovilización por atrapamiento en nanopartículas de sílica .	
4.7.3. Estabilidad en temperatura .....	
<b>5. Resultados y discusión</b> .....	<b>26- 39</b>
5.1. Expresión de BtrH y BtrG.....	26
5.2. Optimización de la purificación de BtrH y BtrG.....	26- 35

5.3.	Estudios preliminares de algunas características bioquímicas de la aciltransferasa BtrH .....	35
5.3.1.	Actividad recuperada.....	35 - 36
5.3.2.	Estabilidad en temperatura.....	36 - 37
5.3.3.	pH óptimo.....	37
5.4.	Inmovilización de la enzima BtrH.....	37 - 38
5.4.1.	Estabilidad en temperatura.....	39
<b>6.</b>	<b>Análisis económico.....</b>	<b>40</b>
<b>7.</b>	<b>Conclusiones.....</b>	<b>41</b>
<b>8.</b>	<b>Bibliografía.....</b>	<b>42 - 43</b>

## 1. Introducción

### 1.1. Biocatálisis

La biocatálisis consiste en la utilización de microorganismos o enzimas para acelerar reacciones químicas que en la naturaleza ocurren en un tiempo prolongado. Dichos procesos han sido utilizados por cientos de años a lo largo de la historia para la elaboración de vino, cerveza o el pan, sin embargo, en las últimas décadas el aporte de la ciencia en este campo ha aumentado notoriamente la disponibilidad de aplicaciones biocatalíticas *in-vitro*.<sup>1</sup>

El uso de estos catalizadores ofrece varias ventajas sobre los catalizadores tradicionales. En un primer lugar, las enzimas son eficaces, lo cual proporciona velocidades de reacción mayores que las obtenidas mediante catalizadores químicos, a concentraciones inferiores. Por otra parte, las enzimas funcionan a temperaturas y condiciones de pH más suaves y en entornos acuosos, lo cual permite una tendencia hacia los procesos sostenibles a gran escala. Por último, las enzimas ofrecen una gran especificidad, ya que ofrecen quimio, regio, diastereo y enantioespecificidad de modo que su objetivo, son grupos funcionales específicos. Las enzimas reducen los costos de la síntesis química y pueden producirse de manera masiva.<sup>2</sup>

Sin embargo, las condiciones de uso aplicado de las enzimas son muchas veces incompatibles con su naturaleza biológica y por esta razón deben ser mejoradas. Las herramientas modernas de ingeniería, producción y descubrimiento de proteínas así como los avances en biología molecular y estructural, facilitan el desarrollo de catalizadores y su diseño a medida para integrarlos en procesos industriales.<sup>3</sup>

Es fundamental para el desarrollo de procesos verdes, sustentables, amigables con el medio ambiente, sin embargo, aún existen conversiones que aún no se han logrado, por lo que hay espacios para proponer nuevas rutas catalíticas.

### 1.2. Síntesis biocatalítica de antibióticos.

Los compuestos naturales son ricos en diversidad estructural y poseen un amplio abanico de actividades biológicas como lo son: anti-microbianas, anti-tumorales, inmunosupresores, entre otras.

Desde el descubrimiento de la penicilina en el año 1928 y su desarrollo en la industria clínica en el 1940, los productos naturales, en particular los antibióticos promovieron grandes beneficios. En estos 86 años, dichos compuestos resultaron indispensables en la clínica. Sin embargo, los microorganismos poseen al menos 20,000 genes que poseen potencial resistencia ante estos agentes. Como consecuencia, más del 70% de las bacterias patogénicas son resistentes a la mayoría de los antibióticos disponibles en el mercado.<sup>4</sup>

Debido a la alta correlación que existe entre los productos naturales y la funcionalidad farmacológica que estos poseen, el esfuerzo por expandir la diversidad química ha llevado a desarrollar estrategias multidisciplinarias para aprovechar los productos naturales en el descubrimiento de nuevos fármacos.<sup>5</sup>

La combinación de las herramientas de síntesis químicas y el uso de biocatalizadores tales como las enzimas recombinantes, tiene una gran ventaja sobre otras herramientas para la síntesis de metabolitos funcionales.<sup>6</sup>

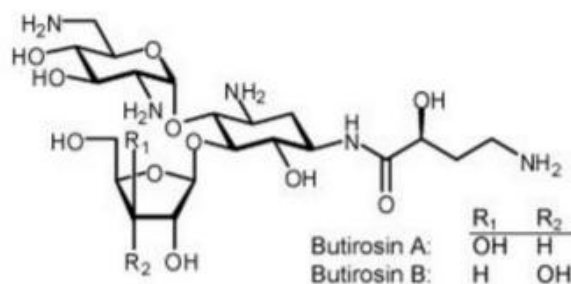
Algunos ejemplos de estas técnicas para obtener nuevos metabolitos funcionales son las estrategias quimioenzimáticas. Algunos ejemplos de estas modificaciones son la sulfuración, la glicosilación, la acilación, la oxidación de azúcares, entre otras. Este enfoque, tiene entre otras ventajas, ser amigable con el medio ambiente, por lo cual se ha convertido de gran interés.<sup>5</sup>

### 1.2.1. El caso de los antibióticos aminoglucósidos.

Los antibióticos aminoglucósidos-aminociclitoles constituyen un grupo de agentes antibacterianos con propiedades para tratar infecciones bacterianas, particularmente aquellas producidas por bacilos gram-negativos aeróbicos.

La actividad bactericida de este tipo de antibióticos, recae en su interacción con el 16S del ARN ribosomal de la bacteria. Estos se posicionan en el sitio A impidiendo la incorporación de aminoácidos complementarios a la cadena polipeptídica. Debido a esta alta afinidad por la los ARNt no específicos, no es posible que el ARNt se incorporen a la cadena polipeptídica concluyendo en un ARNm trunco.<sup>7,8</sup> Estos antibióticos son utilizados para el tratamiento de una variedad de infecciones, pero su administración debe ser monitoreada ya que conllevan el riesgo de nefrotoxicidad reversible y ototoxicidad irreversible.<sup>9,10</sup>

El primer compuesto aminoglucósido conocido por ser producido por una bacteria no ascomycete, *Bacillus circulans*, fue la Butirosina (Figura 1.1). La misma es producida como una mezcla de epímeros A y B las cuales son estructuralmente idénticas a la ribostamicina y xilostastina respectivamente pero con el agregado del componente (S)-4-amino-2-hidroxi-butiril (AHBA) como cadena lateral en la posición 1-N del anillo 2-DOS.<sup>11</sup> Dicha cadena tiene gran importancia clínica debido a que confiere resistencia a algunos mecanismos contra compuestos aminoglucósidos. La incorporación de esta cadena no solo ha demostrado resistencia a dichos mecanismos, sino que además muestra mejora en la actividad antibacterial.<sup>12</sup>



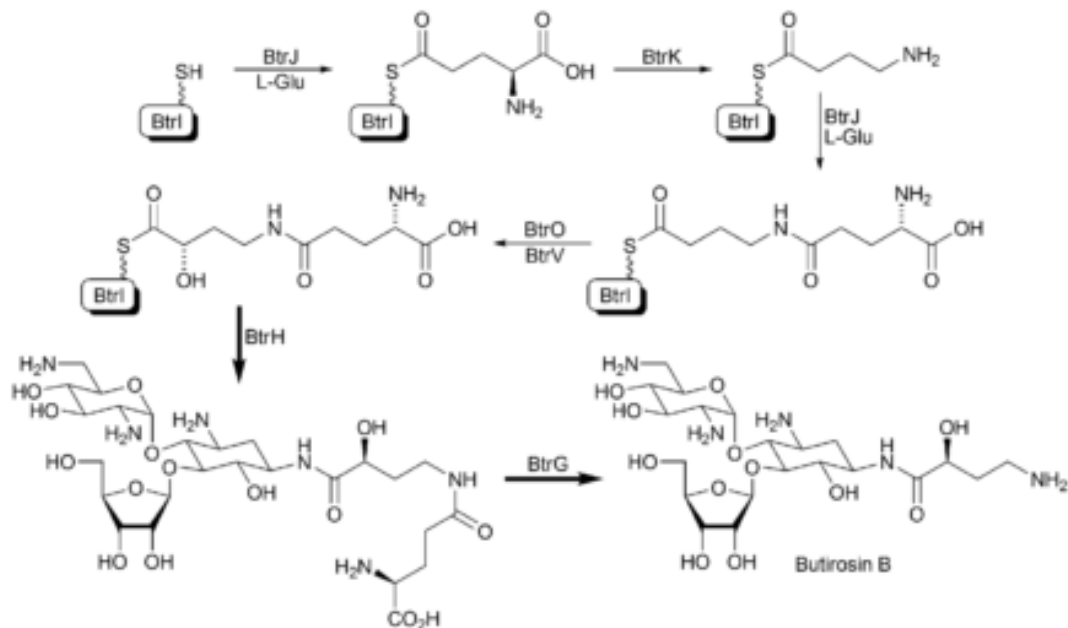
**Figura 1.1.** Estructura de la Butirosina A y B.<sup>13</sup>

Los aminoglucósidos más ampliamente utilizados son la gentamicina, tobramicina, amikacina, netilmicina y estreptomina. Estas drogas actúan interrumpiendo la síntesis proteica mediante la unión irreversible a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano como se comentó anteriormente.

Sin embargo la resistencia de los mismos hace presión en la comunidad científica para el desarrollo de nuevas estrategias de síntesis de nuevos antibióticos. Para ello, la alta selectividad especificidad de las enzimas las hacen ideales para este uso.

### 1.3. Cascada biosintética para la síntesis de Butirosina.

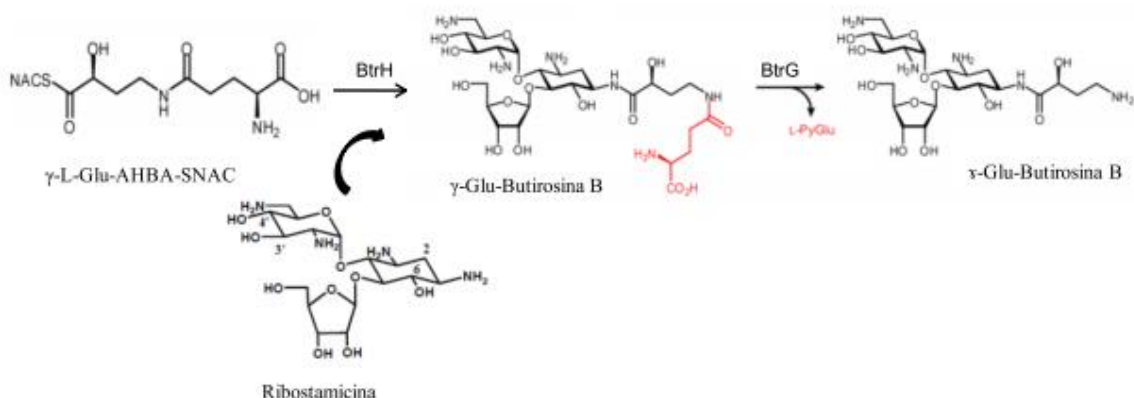
En la naturaleza, la síntesis de la butirosina conlleva al menos 6 enzimas para su síntesis. Esta, como se puede ver en la Figura 1.2 comienza con una proteína transportadora de acilos (ACP), BtrI, la cual carga un L-Glutamato mediante una ligasa BtrJ, ATP dependiente. El intermediario  $\gamma$ -L-Glutamil-S-BtrI es descarboxilado por la enzima BtrK obteniéndose así el segundo intermediario GABA-S-BtrI, este es inmediatamente convertido en  $\gamma$ -L-glutamyl-GABA-S-BtrI por una segunda acción de la enzima BtrJ. Esto es un raro ejemplo de lo que es llamado química de protección en biosíntesis. El  $\gamma$ -L-glutamyl-GABA-S-BtrI es hidroxilado por un sistema monooxigenasa de dos componentes, uno dependiente de la enzima BtrO y otro de la BtrV. Es así que se obtiene  $\gamma$ -L-glutamyl-AHBA-S-BtrI el cual es incorporado hacia la ribostamicina mediante acción de la aciltransferasa BtrH y luego desprotegido por la ciclotransferasa BtrG liberando un grupo glutamato.<sup>14,15</sup>



**Figura 1.2.** Incorporación de la cadena (S)-4-amino-2-hidroxibutiril hacia la Butirosina. <sup>14</sup>

Estudios previos, han demostrado que la enzima BtrH es la encargada de incorporar el compuesto  $\gamma$ -L-glutamyl-AHBA-S- Btri hacia el sustrato ribostamicina formando así  $\gamma$ -L-Glu-butirosina. Por otra parte, la producción de L-Glu – butirosina en ausencia de BtrG, demuestra que BtrG es la responsable de la deprotección de la cadena lateral L-Glu- AHBA. <sup>15</sup>

Es por ello que estudios previos describieron la síntesis de un intermediario L-Glu AHBA SNAC, el cual es tomado directamente por la enzima BtrH y posteriormente por BtrG para la obtención de butirosina, esto puede observarse en la Figura 1.3. <sup>14</sup> Esto es un gran avance en la obtención de este compuesto de manera más sencilla evitándose así el uso de gran parte de las enzimas descritas.



**Figura 1.3.** Síntesis quimioenzimática de Butirosina. Se parte del  $\gamma$ -Glu-AHBA-SNAC previamente sintetizado. El grupo  $\gamma$ -glutamyl-AHBA se transfiere a una molécula de ribostamicina por la aciltransferasa, BtrH y se escinde el L-glutamato, por BtrG para dar Butirosina B. <sup>16</sup>

Es por ello que el estudio de estas dos enzimas, BtrH y BtrG, implicadas en la síntesis de butirosina, es de gran importancia tanto a nivel soluble como inmovilizadas ya que actualmente se cuenta con muy poca bibliografía sobre las mismas.

#### 1.4. Inmovilización de enzimas.

El uso de los biocatalizadores como lo son las enzimas, tiene una serie de desventajas para su uso en la industria. Algunas de estas restricciones son la baja estabilidad, la dificultad de la separación del catalizador, la contaminación y el re-uso limitado que los mismos poseen. Es importante tener en cuenta, que es ventajoso poder reciclar y reutilizar las enzimas, en especial si se piensa en la economía de los procesos.

Es por ello que la inmovilización es una estrategia ventajosa, ya que permite el uso en forma continua de las enzimas (minimizando costos), puede proveer estabilidad frente a la temperatura, solventes orgánicos y o cambios de pH. Las enzimas son por naturaleza solubles, por lo que la inmovilización de enzimas consiste en insolubilizarlas por unión a un soporte sólido.<sup>17</sup> La estabilización puede mejorar las propiedades enzimáticas, fijando conformaciones proteicas que mejoren la especificidad de sustrato y reduzcan el efecto de inhibidores.<sup>18,19</sup>

Sin embargo, la inmovilización de enzimas, puede acarrear algunas desventajas frente a la enzima soluble. Durante la inmovilización, las enzimas pueden perder su actividad y cambiar alguna otra característica como puede ser el pH, la temperatura óptima y/o la constante de Michaelis y Mendel.<sup>20</sup>

Hoy en día existen diferentes estrategias de inmovilización las cuales pueden reducir estas desventajas y a su vez maximizar las propiedades de las enzimas que se requieren para su uso aplicado.

En la bibliografía se describen una amplia gama de opciones para realizar la inmovilización de enzimas. Estas estrategias pueden involucrar la unión a un soporte, donde las enzimas pueden utilizar una serie de interacciones o simplemente una unión física con el soporte. Las estrategias de interacción enzima-soporte pueden ser covalentes, iónicas, hidrofóbicas, por afinidad o incluso mixtas. Cada una de ellas presenta ventajas y desventajas que deben ser consideradas según su aplicación y el biocatalizador implicado.

Las características de la matriz a utilizar para la inmovilización son de gran importancia para lograr obtener resultados. A su vez, los requerimientos de cada enzima varían, por lo que para la elección de técnicas de inmovilización adecuadas, se debe tener en consideración las características proteicas, las condiciones de utilización final, un diseño racional y un elemento de ensayo y error. Las características físicas de la matriz como el diámetro de las partículas, la hidratación y la resistencia al estrés mecánico son todos factores que afectan a la hora de elegir el soporte adecuado para cada situación.<sup>17</sup>

La porosidad y el tamaño de las partículas del soporte van a determinar el área superficial total, lo cual afecta la capacidad de carga. A igual diámetro de partícula, los

soportes porosos van a tener mayor capacidad de carga y dentro de los poros se pueden generar microambientes que protegen a la enzima, pero por otro lado se aumentan los tiempos de difusión y se disminuye la transferencia de masa en comparación con materiales no porosos.<sup>21</sup>

La sílica tiene como ventajas su bajo costo, que permite inmobilizaciones rápidas en condiciones suaves, y tiene tamaños nanométricos (lo cual provee menores limitaciones difusionales), gran robustez, entre otras lo cual la hace una alternativa adecuada para la inmobilización de enzimas.<sup>17</sup>

### 1.5. Sílica biomimética como soporte de inmobilización.

La sílica es el segundo compuesto más abundante en la corteza y manto terrestre. Gracias a esto y su gran utilidad, en los últimos años se ha puesto gran interés en varios campos de investigación.

La biomimetización en la naturaleza, es un mecanismo por el cual organismos generan materiales duros utilizando proteínas como soporte de estructuras inorgánicas. Algunos ejemplos de estas son los caparzones, los huesos y los dientes, etc. Cuando dicho productos obtenidos son de sílica, se denomina biosilificación. Este fenómeno ha sido estudiado ampliamente en las diatomeas.

El entendimiento del mecanismo molecular de biosilificación en organismos marinos ha avanzado en los últimos 10 años, lo cual ha promovido el progreso en la síntesis biomimética de nanopartículas de sílica *in vitro*.<sup>22</sup>

*In vitro*, la deposición de sílica biomimética resulta de las interacciones específicas entre biomoléculas poliaminadas y ácido silícico. Esta reacción ocurre rápidamente a pH neutro, temperatura ambiente y presión ambiental lo que resulta compatible con la encapsulación de numerosas proteínas que quedan atrapadas físicamente dentro de las nanopartículas.<sup>20</sup>

La síntesis de estas nanopartículas ocurre en segundos y en condiciones suaves, mezclando una solución de óxido de silicato tratada previamente con ácido clorhídrico y una molécula poliaminada que es la encargada de llevar a cabo la formación de las partículas. Para poder atrapar una proteína previo a la formación de las nanopartículas se debe adicionar la solución con la proteína de interés con la molécula animada. La encapsulación de la proteína ocurre en simultáneo a la formación de las partículas y es por esto que queda atrapada dentro de la malla de sílica. El preciso control que se posee en el tamaño, la porosidad, la cristalinidad y la forma de las nanopartículas de sílica refuerza la gran cantidad de posibilidades que ofrece esta técnica en la nanobiotecnología.<sup>20</sup>

Según bibliografía, la síntesis *in vitro* de estas nanopartículas de sílica mediante la metodología explicada anteriormente, se obtiene un tamaño de partícula de entre 700 a 1400 nm con algunos agregados, lo cual en presencia de una proteína inerte y globular como lo es la sero albúmina bovina, logra disminuir el tamaño a 300 nm logrando así una distribución homogénea.<sup>20</sup>

## 1.6. Hipótesis de trabajo.

En esta tesis nos planteamos el desafío de determinar si es posible desarrollar un protocolo de purificación de BtrG y BtrH, que rinda cantidades y calidades de preparaciones enzimáticas para su uso *in-vitro*.

## 2. Objetivo

### Objetivos generales

Optimización de la purificación de la aciltransferasa BtrH y ciclotransferasa BtrG para la obtención de preparados inmovilizados.

### Objetivos específicos

- Expresión y purificación de BtrH y BtrG
- Caracterización bioquímica de BtrH.
- Inmovilización de BtrH y BtrG mediante en nanopartículas de sílica biomimética.

### 3. Materiales.

Las cepas de *E. coli* BL21- Codón Plus (DE3)-RP con los plásmidos que codifican para las proteínas aciltransferasa BtrH y la ciclitasferasa BtrG fueron donadas por el Departamento de Bioquímica de la Universidad de Cambridge, Inglaterra. Las sales: cloruro de sodio, bicarbonato de sodio, HEPES y el sulfato de níquel fueron obtenidos de Biopack (Buenos Aires, Argentina). La agarosa 6BCL, el glutaraldehído, la ribostamicina, el ácido 5,5`- Ditiobis (2-nitrobenzoico) (DTNB), el inhibidor de proteasa (Protease inhibitor cocktail tablets EDTA Free), el intercambiador aniónico DADE-Sephadex y la polietilenimina (PEI) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (Misuri, Estados Unidos). La columna HiTrap Q de 5 mL fue de General Electric (Connecticut, Estados Unidos), el marcador de peso molecular Sharp Pre-stained Protein Standard y la sonda SYPRO Orange fluorescent fueron Invitrogen (California, Estados Unidos), el kit para el ensayo de cuantificación de proteínas con ácido bicinconínico y la ADNasa fueron obtenidos de Thermo Fisher Scientific (Boston, Estados Unidos). El tetraetilortosilicato (TMOS) fue de MERCK (New Jersey, Estados Unidos). El sustrato L-Glu-AHBA-SNAC fue sintetizado previamente en el laboratorio de Química y Bioquímica de la Universidad de Rhur, Alemania acorde a protocolo descrito en bibliografía.<sup>12</sup> La seroalbúmina bovina (BSA), fue adquirida de New England Biolabs (Massachusetts, Estados Unidos). La kanamicina fue de Gibco by Life Technologies (Boston, Estados Unidos). Las columnas PD-10 se obtuvieron de GE Healthcare (Buckinghamshire, Reino Unido). La triptona fue de Oxoid (Hampshire, Reino Unido), extracto de levadura de BD Becton Dickinson Andco (New Jersey, Estados Unidos), el imidazol, el Tris fueron obtenidos de J.T Baker (New York, Estados Unidos), el glicerol y el ácido clorhídrico de Dorwil (Buenos Aires, Argentina).

Todos los demás reactivos fueron de grado analítico.

## 4. Metodología

### 4.1. Expresión de BtrG y BtrH

Se realizaron placas con el medio de cultivo Luria Broth agar para realizar un estriado partiendo de un criotubo con las células conteniendo los respectivos plásmidos donados por el Departamento de Bioquímica de la Universidad de Cambridge, Inglaterra. *E. coli* BL21- Codón-Plus (DE3)-RP.

Se tomaron colonias aisladas de *E. coli* BL21- Codón-Plus (DE3)-RP y se crecieron en 3 mL de medio Luria Broth, (LB, 10 g/L cloruro de sodio, 10 g/L triptona 5 g/L extracto de levadura) con kanamicina (50µg/mL). El cultivo fue incubado 16 horas a 37 °C con agitación a 220 rpm. Se tomaron 2,5 mL de cada cultivo y se inocularon 500 mL del LB suplementado kanamicina (50µg/mL). Se incubó a 37 °C con agitación a 220 hasta alcanzar una OD<sub>600</sub> de 0,6-0,9. La sobreexpresión de la proteína BtrH fue inducida con 0,2 mM de isopropil -D thiogalactopiranos (IPTG) y se dejó a 18°C 16 horas con 190 rpm para promover la expresión. La recolección de células se realizó por centrifugación con un programa de 5000 rpm por 10 minutos a 4°C. Posterior a esto se guardaron los pellet celular a -20°C hasta su purificación.

### 4.2. Purificación de BtrG y BtrH

Para la purificación se utilizaron dos metodologías para la disrupción celular. Una química en la cual se resuspendió en 35 mL por litro de cultivo (8 g) en tampón de lisis 1 (Tris-HCl 20 mM, Glicerol 10%, imidazol 5 mM, NaCl 0.5M pH 7.9) o tampón de lisis 2 (fosfato de sodio 25 mM, imidazol 5 mM y 10% glicerol pH 8) dependiendo el caso, seguido de una incubación de 30 minutos con lizozima (1 mg/mL).

Por último, se aplicó una lisis física por sonicado con un programa de 15 segundos ON y 15 segundos OFF por 3 minutos con una amplitud de 30%.

Utilizando la cola de histidina que ambas proteínas poseen, se procedió a su unión a un soporte de agarosa-IDA, con una relación 2 g de soporte por cada 2 gramos de pellet, en el cual se utilizó la unión de grupos histidina de las proteínas al soporte. Previo a la utilización del IDA el mismo fue lavado con un volumen de agua destilada y cargado con 2 volúmenes de una solución de sulfato de níquel 100 mM de NiSO<sub>4</sub> y por último equilibrada con 3 volúmenes de tampón de lisis.

Para luego poder recuperar las proteínas en estudio, se utilizó un competidor, el cual en este caso fue el imidazol.

#### 4.2.1. Síntesis de agarosa-IDA

El soporte para preparar una cromatografía por inmovilización de iones metálicos (IMAC), se preparó suspendiendo 50 g de sepharosa CL-6B en 50 mL de una solución de ácido clorhídrico 1 N y 10 mL de epíclorhidrina, esta se incorporó gota a gota y en agitación para. Previo a eso se enjugó exhaustivamente el soporte con agua destilada para remover los alcoholes presentes en la misma. Luego se incubó por 21 horas con 331 rpm para permitir que se activen los grupos epóxidos.

Posteriormente se filtró y se lavó el soporte con agua destilada para luego incubarlo con una solución de ácido iminodiacético 0.2 M en tampón bicarbonato de sodio 0.1 M pH 11. La mezcla se dejó reaccionar durante 24 horas con agitación a 342 rpm y temperatura ambiente.

Se filtró y se lavó para posteriormente cargarlo con sulfato de níquel ( $\text{NiSO}_4$ ) 100 mM.

#### 4.2.2. Optimización de la purificación.

##### 4.2.2.1. Protocolo purificación.

Para evaluar los parámetros óptimos de la purificación de BtrG y BtrH se realizaron diferentes ensayos en donde se probaron varios tiempos de incubación del soporte (agarosa-IDA) con el clarificado. Los tiempos testeados fueron de 15, 30 y 60 minutos. Esto se realizó para evaluar el tiempo necesario que se necesita para alcanzar la mayor adherencia de las enzimas en estudio al soporte.

Luego se realizó un lavado con 1 mL por cada 2 gramos de pellet con Tris-HCl 20 mM, Glicerol 10%, imidazol 5 mM, NaCl 0.5M pH 7.9 o fosfato de sodio 25 mM, imidazol 5 mM y 10% glicerol pH 8 para remover aquellas moléculas que se encuentren débilmente adheridas al soporte.

Por otra parte, se probaron diferentes tiempos de lavados con concentraciones de imidazol tales que remuevan proteínas adheridas por interacciones inespecíficas, los mismos fueron de 10 y 30 minutos con 30, 40 y 60 mM de imidazol.

Como se mencionó anteriormente, para los lavados se utilizaron tampones de lisis de 30, 40 y 60 mM de imidazol en dos diferentes tiempos, 10 y 30 minutos. De estos tampones, se agregó 4 mL de cada uno por 2 gramos de cultivo.

Para alcanzar la condición de elución se utilizó una concentración de imidazol de 250 mM y otra de 400 mM utilizando los mismos tiempos 10 y 30 minutos, para esto se utilizó 4 mL de los mismos por cada 2 gramos de cultivo.

Toda la purificación se realizó a 4°C.

Posteriormente, para la remoción del imidazol, el cual interfiere con los ensayos de actividad, se utilizó un concentrador de proteínas de corte de membrana 30 KDa.

Para poder eliminar el paso de remoción del imidazol mediante el concentrador de proteínas dado que el mismo disminuía la actividad de las proteínas, se planteó un paso de intercambio aniónico.

#### 4.2.2.2. Intercambiador aniónico mediante el soporte dietilaminoetil Sephadex (DEAE)

Para el segundo paso de la purificación se utilizó el soporte comercial DEAE-Sephadex® (DEAE) para la cromatografía de intercambio aniónico.

La elución de la proteína en estudio se realizó aumentando la fuerza iónica, mediante el agregado de solución tampón con concentraciones crecientes de NaCl.

Para poder llevar a cabo este intercambio, se cambió el tampón de lisis del 1 al 2. Es por eso que el utilizado fue fosfato de sodio 25 mM pH 8 durante el protocolo. Este cambio fue necesario ya que el Tris, interfiere con la interacción iónica del intercambiador.

#### 4.2.2.3. Hidratación del soporte comercial DEAE

Se pesaron 5 g del soporte comercial y se llevó a cabo la hidratación del mismo siguiendo las especificaciones del fabricante, en tampón fosfato de sodio 25 mM pH 8 (tampón 1) 16 horas a temperatura ambiente.

#### 4.2.2.4. Purificación de BtrH por intercambio aniónico

Se prepararon 2 g del soporte DEAE hidratado por cada 2 gramos de cultivo, que fue previamente equilibrado con 3 volúmenes de tampón fosfato de sodio 25 mM 10% glicerol 0.5 NaCl pH 8.

Luego se incubó la fracción eluída del soporte agarosa IDA (IMAC) la cual poseía 250 mM de imidazol, con el DEAE durante 1, 2 y 16 horas en agitación y a 4°C para evaluar el tiempo óptimo para que toda la proteína se adhiriera a este soporte.

Para la elución se utilizó un barrido con el tampón 2 conteniendo concentraciones crecientes de NaCl: 25 mM, 100 mM, 250 mM y 500 m.

Se incubaron 4 mL por cada gramo de pellet celular de cada solución de NaCl con el soporte durante 15, 30 y 60 minutos en agitación y a 4°C.

**Tabla 1 Condiciones de purificación de BtrH**

Variables	IDA		DEAE	
	Tiempo (minutos)	Concentración imidazol (mM)	Tiempo (min)	Concentración NaCl (mM)
<b>Tiempo incubación</b>	15, 30 y 60	-	60, 120 y 960	-
<b>Lavados</b>	10 y 30	30, 40 y 60	1 y 10	50, 100, 250 y 400
<b>Elución</b>	10 y 30	250 y 400	60 y 120	50, 100, 250 y 500

#### 4.2.2.5. Tratamiento de concentradores de membrana 30 KDa.

Previo a la utilización de los concentradores de proteínas, se trató la membrana con 2% peso sobre volumen (p/v) de poli vinilpirrolidona (PVP).

#### 4.3. Cuantificación de la concentración proteica.

Se realizó la cuantificación de proteínas mediante la técnica de BCA.<sup>24</sup> Se sembraron 25 uL de cada muestra. Las muestras se sembraron diluidas se incubaron con 200 µL de solución de BCA (50:1 de *Bicinchoninic A Solution: Cupper (II) Sulfate Solution*). Estas se incubaron por 30 min a 37°C y posteriormente se midió la absorbancia a 595 nm.

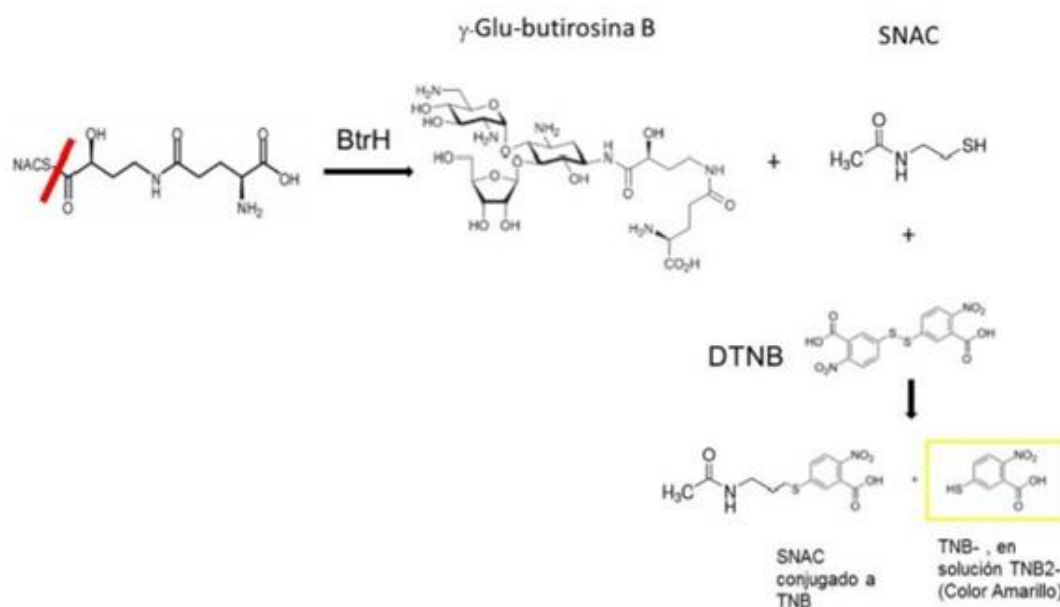
Los resultados obtenidos fueron interpolados en una curva de calibración realizada bajo las mismas condiciones con seroalbúmina bovina.

#### 4.4. Medida de actividad enzimática.

Para evaluar la actividad aciltransferasa de BtrH con  $\gamma$ -L-Glu AHBA SNAC como donador de grupo acilo se lleva a cabo el ensayo con 0.4 mg totales de BtrH en tampón fosfato de sodio 25 mM pH 7.9 con 0,1mM de ribostamicina 0,5 mM del derivado de SNAC y 0,39 mM de DTNB en un volumen final de 463 µL. A este mix de reacción se le midió la absorbancia cada 1 segundo por 10 min a 405 nm a 25 °C. Esto se realizó por duplicado. Los controles que se realizaron fueron: 1) Control negativo: ribostamicina, fosfato de sodio 25 mM pH 7.9 sin BtrH, DTNB y  $\gamma$ -L-Glu-AHBA SNAC. 2) Control de auto-hidrólisis de  $\gamma$ -L-Glu-AHBA SNAC: fosfato de sodio 25 mM pH 7.9 con BtrH, DTNB y  $\gamma$ -L-Glu-AHBA SNAC.

Como se observa en la Figura 3 el método de DTNB, mide tioles libres. Si la enzima es capaz de transferir un grupo acilo desde el  $\gamma$ -L-Glu-ABHA SNAC hacia la

ribostamicina, el sustrato sintético libera un grupo SNAC el cual reacciona con el DTNB para dar SNAC-TNB por un lado y TNB<sup>-</sup> por otro. Este TNB<sup>-</sup> es el que en solución puede ser detectado por un espectrofotómetro a una longitud de onda de 405 nm.



**Figura 4.1.** Esquema de ensayo de actividad para BtrH adaptado de Uso *in vitro* de sistemas enzimáticos inmovilizados Jackson E 2012-2015.

#### 4.5. Análisis electroforéticos.

Las proteínas se analizaron mediante SDS-PAGE 12% para BtrH y 15% para BtrG. Las muestras se preparan con tampón de carga (50 mM Tris-HCl, 100 mM DTT, 2% SDS, 0.1% azul de bromofenol, 10% glicerol, pH 6.8) y se incuban a 100°C por 10 minutos. Los geles se corrieron en tampón de corrida Tris-glicina (25 mM Tris, 250 mM glicina, 0.1% SDS, pH 8,3) a 120 V durante 90 minutos. Estos se tiñeron durante 16 horas a temperatura ambiente con solución de coomassie (2,5 g/L Coomassie Brilliant Blue en MeOH:H<sub>2</sub>O: ácido acético 4,5:4,5:1) y se decoloraron con solución decolorante (MeOH:H<sub>2</sub>O:ácido acético 4.5:4.5:1) agua destilada. Se documentaron utilizando un E-Gel® Imager (Life Technologies).

#### 4.6. Estudio de algunas propiedades bioquímicas de BtrH.

##### 4.6.1.1. Temperatura óptima.

Para testear la temperatura óptima de la proteína BtrH, se realizaron medidas de actividad a las diferentes temperaturas elegidas para la misma.

Para la medida de actividad se utilizó el protocolo descrito en la sección 3.4 de la metodología. Las temperaturas testeadas fueron 4°C, 25°C, 30°C, 40°C Y 50°C.

Para el caso de los inmovilizados, se tomó de los mismos la misma concentración la cual es la utilizada para medir óptimo con la enzima soluble. Dicha concentración fue de 0.4 mg finales

#### 4.6.1.2. Estabilidad en temperatura.

Para estudiar la estabilidad de la enzima BtrH inmovilizada frente a diferentes temperaturas, la suspensión fue incubada por 2 horas a las diferentes temperaturas elegidas. Pasado el tiempo de incubación, se tomó una muestra para medir su actividad a temperatura ambiente.

Se preparó una solución en la cual hubieran 0.4 mg de enzima total en un volumen tal que permitiera luego la medida de actividad.

Además se planteó utilizar la metodología novedosa basada en la utilización del equipo de PCR a tiempo real en (Rotor gene Q, QIAGEN). La sonda fluorescente *SYPRO Orange fluorescent* fue utilizada para monitorear la desnaturalización de BtrH. Este ensayo se lleva a cabo con 2.5 µl de *SYPRO orange* (1/40) en fosfato de sodio 25 mM pH 7.9 con 23 µL de BtrH con 2.4 mg/mL de concentración final.

Todas las muestras fueron sometidas a un rango de temperatura de entre 25-90°C aumentando 1°C cada 30 segundos y de a 1°C cada 1 minuto. Las muestras son excitadas a 470 nM y su longitud de onda de emisión es detectada a 610 nm. La desnaturalización de la proteína es revelada por el aumento de absorbancia en la emisión de fluorescencia debido a que la sonda Sypro Orange interacciona con las regiones hidrofóbicas de BtrH.

Para una mejor visualización de los resultados se grafica la derivada de la fluorescencia con respecto a la temperatura con el software del Rotor Gene.<sup>24</sup>

#### 4.6.1.3. pH óptimo

Para evaluar el pH óptimo en el cual la aciltransferasa BtrH lleva a cabo su actividad, se realizó una metodología en la cual, se midió la actividad de la enzima, en tampones con diferentes pH. En este caso, los pH elegidos fueron 5,5; 6,5; 7,5 y 8,0.

Lo que se realizó fue una dilución a partir de un stock de enzima la cual se encontraba en tampón fosfato de sodio 25 mM pH 7,9, en los diferentes tampones con los respectivos pH a testear.

Se debió tener en cuenta la molaridad de los mismos que fueran lo suficientemente altas, para que al incorporar la enzima no se desequilibre el pH. Es por eso que se utilizó 200 mM como fuerza iónica.

Los tampones utilizados fueron; fosfato de sodio 200 mM pH 6,5, 7,8 y 8,0 y acetato de sodio 200 mM pH 5,5.

#### 4.6.1.4. Estabilidad de pH.

Se estudió la estabilidad de la proteína midiendo la actividad luego de someter la proteína soluble a incubaciones de 2 horas en un rango de pH de 8,0 a 5,5.

Para poder llevar a cabo la estabilidad de la enzima BtrH frente a los diferentes pH planteados, lo que se realizó fue la siguiente metodología.

Se partió de una solución stock de enzima, la cual poseía una concentración de 1,8 mg/mL.

De este stock se realizaron las diluciones correspondientes para poder cambiar desde el tampón fosfato de sodio 25 mM pH 8,0 a los diferentes tampones con los pH. Fueron los siguientes: acetato de sodio 1 M pH 5,5, fosfato de sodio 200 mM pH 6,5; 7,5 y 8,0.

Posteriormente estas soluciones fueron incubadas en dichos tampones por 2 horas para luego poder medir su actividad.

En este caso, para poder medir la actividad se debió volver a diluir la enzima en el tampón de reacción, fosfato de sodio 25 mM pH 8,0.

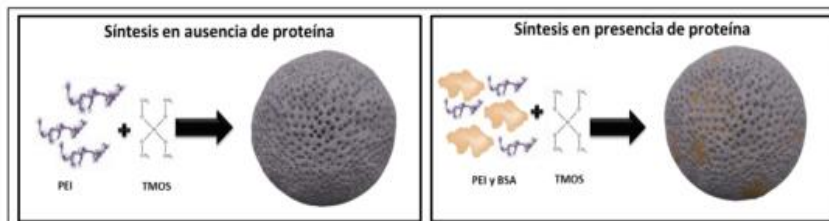
### 4.7. Estrategias de inmovilización de nanopartículas de sílica a BtrH y BtrG.

#### 4.7.1. Inmovilización covalente en nanopartículas de sílica activada con glutaraldeído.

##### 4.7.1.1. Síntesis de nanopartículas de sílica con núcleo de BSA.

Se preparó una solución de 1mg/mL de sero albúmina bovina (BSA) concentración final en un volumen de 1 mL. A la misma, se le añadió 250  $\mu$ L de Polietilenimina (PEI) al 10%, y se hidrolizó el tetrametilortosilicato (TMOS) mezclando 157  $\mu$ L de TMOS con 1 mL de ácido clorhídrico, de la cual se tomaron 250  $\mu$ L para mezclarse con la primera solución descrita. Se invierte el tubo unas 3 veces para promover la formación homogénea de las nanopartículas con núcleo de BSA. Posteriormente, se centrifugó por 3 min a velocidad máxima y se descartó el sobrenadante Figura 3.1. Luego se realizaron tres lavados, uno con 10 mL de tampón fosfato de sodio 0.1M pH 8 con 0.5 M de NaCl y otros dos con 10 mL de tampón fosfato de sodio 0.1M pH 8, para remover

partículas de BSA que puedan haber quedado adsorbidas en la superficie de las nanopartículas.



**Figura 4.2.** Estrategias de síntesis de nanopartículas. TMOS, tetraetilortosilicato. PEI, Polietilenoimina, BSA Seroalbúmina.<sup>17</sup>

#### 4.7.1.2. Funcionalización de nanopartículas de sílica con glutaraldehído.

La síntesis de nanopartículas de sílica-glutaraldehído se llevó a cabo tomando 0.5 g de nanopartículas de sílica-BSA previamente sintetizadas y se incubaron con 1 mL de una solución de glutaraldehído al 15% en tampón fosfato de sodio 200 mM pH 7. Las mismas se dejaron 16 h a 25°C en agitación

Pasado el tiempo de incubación, se centrifugó por un minuto a 1350 rpm, se descartó el sobrenadante, y se procedió a realizar dos lavados agregando 10 mL de tampón fosfato de sodio 200 mM pH 7, re suspendiendo y volviendo a centrifugar, y una última vez con tampón fosfato de sodio 25 mM pH 7.

#### 4.7.1.3. Inmovilización de BtrH y BtrG sobre la superficie de las nanopartículas con núcleo de BSA.

Una vez obtenidas las nanopartículas de sílica con núcleo BSA activadas con glutaraldehído, se le ofreció, en el caso de la co-inmovilización, por cada 0.1 gramo de las mismas 0.4 mg de BtrG y 0.2 gramos de BtrH. En el caso de la inmovilización por separado, se le ofreció a la misma cantidad de sílica-BSA 0.4 y 0.2 gramos de cada enzima respectivamente.

Dichas suspensiones se dejan incubando en agitación a 25 °C por 16 horas.

Pasado dicho periodo de tiempo, se centrifugó la suspensión para poder separarla del sobrenadante, y se realizan dos lavados, uno con fosfato de sodio 200 mM pH 7 con 500 mM de NaCl y dos lavados con el mismo tampón sin cloruro de sodio.

Todas las fracciones fueron recuperadas para el posterior análisis.

#### 4.7.2. Inmovilización por atrapamiento en nanopartículas de sílica.

Para poder llevar a cabo la inmovilización por atrapamiento de las enzimas BtrH y BtrG, se sintetizó las nanopartículas de sílica biomiméticas en presencia de las muestras de las enzimas en estudio.

Se partió de 2.5 mg/mL para ambas enzimas en un volumen final de 1 mL de tampón fosfato de sodio 0.1M pH 8. Posteriormente, se mezcló con 250 µL de PEI al 10%, y 250 µL de TMOS previamente hidrolizado con 1 mL de ácido clorhídrico 1 mM en 157 µL de TMOS.

El tubo eppendorff con la solución previamente mencionada se invirtió suavemente para lograr una homogeneización de la formación de las nanopartículas de sílica Figura 3.2. Luego de obtener una distribución homogénea de nanopartículas, se centrifugó mediante un spin a máxima velocidad, para lograr separar el soporte del sobrenadante.

Dicho sobrenadante se guardó para poder analizar la concentración de proteínas no adheridas al soporte. Luego, se realizaron tres lavados, uno con el tampón fosfato de sodio 0.1 M pH 8 con 0.5M de NaCl y otros dos con tampón fosfato de sodio 0.1M pH 8. Se guardó a 4 °C para su posterior análisis.

Se evaluó la enzima BtrH inmovilizada mediante el porcentaje de inmovilización (% I). Este se define como el porcentaje de la diferencia entre las enzimas que se ofrece al preparado a la hora de inmovilizarlo, y el sobrenadante del mismo con respecto a la enzima ofrecida.

$$I = \left( \frac{\text{Actividad de la enzima ofrecida} - \text{Actividad de la enzima del sobrenadante}}{\text{Actividad de la enzima ofrecida}} \right) * 100$$

En cambio, el rendimiento, lo que se llevó a cabo es la medida de actividad a punto final, de la suspensión obtenida.

Para ello, se resuspendió la suspensión en tampón fosfato de sodio 25 mM pH 7.9 y se le añadió 1 mM de ribostamicina y 5 mM del SNAC. Este preparado, se dejó incubando con agitación, temperatura ambiente y se tomaron muestras a los 5 y 10 minutos. Dichas muestras se centrifugaron para separar el inmovilizado del sobrenadante. Luego, al sobrenadante se le añadió 3.9 mM de DTNB y se realizó la correspondiente medida de actividad siguiendo el protocolo descrito en la sección 3.4.

El rendimiento se definió entonces como el porcentaje de actividad recuperada en el derivado con respecto a la diferencia de la enzima ofrecida y el sobrenadante. A continuación se muestra la ecuación utilizada.

$$R = \left( \frac{\text{Actividad de la suspensión}}{\text{Actividad de la enzima ofrecida} - \text{Actividad de la enzima del sobrenadante}} \right) * 100$$

Para algunos de los inmovilizados se realizaron estudios preliminares de estabilidad en temperatura.

#### 4.7.3. Estabilidad de temperatura.

Para estudiar la estabilidad de la enzima BtrH inmovilizada frente a diferentes temperaturas, la suspensión fue incubada por 2 horas a las diferentes temperaturas elegidas. Pasado el tiempo de incubación, se tomó una muestra para medir su actividad a temperatura ambiente.

Las temperaturas elegidas fueron 4°C, 25°C, 30°C, 40°C, y 50°C.

En el caso de los inmovilizados, para poder evaluar este parámetro lo que se realizó es, según el porcentaje de inmovilización se pesó la cantidad de soporte necesaria para realizar en ensayo con la misma cantidad de enzima soluble, es decir con 0.4 mg totales. Luego de obtener la cantidad de soporte necesaria, el mismo se resuspendió en un volumen igual al utilizado para la enzima soluble, es decir de 400 µL. A esta suspensión se le midió la actividad.

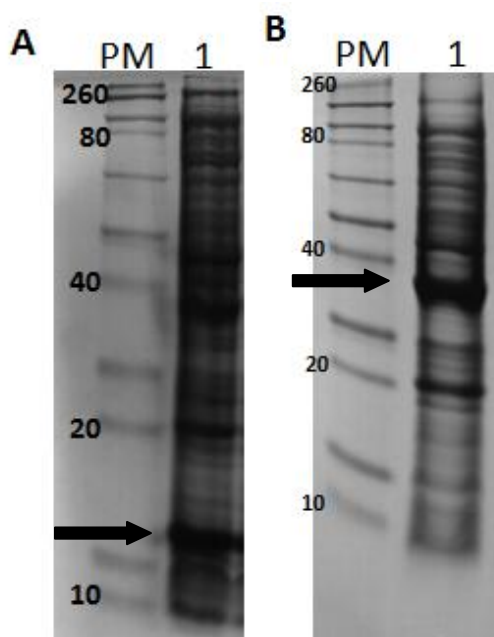
## 5. Resultados obtenidos y discusión.

### 5.1. Expresión de BtrH y BtrG.

Las enzimas BtrG y BtrH previamente habían sido expresadas, obteniéndose un nivel parcial de homogeneidad con un solo paso de purificación mediante una columna de afinidad de IDA níquel. Como la idea de llegar a tener preparados más homogéneos para luego ser inmovilizados y utilizados in-vitro para la modificación de la ribostamicina, abordamos la optimización de la purificación.

En una primera instancia se abordó la expresión de estas enzimas partiendo de un stock de células transformadas con el plásmido el cual contiene los genes para estas enzimas donadas por el Departamento de Bioquímica de la Universidad de Cambridge, Inglaterra realizando la inducción con IPTG 100 mM y su purificación tal como se escribe en metodología 4.1 y 4.2 se obtiene el siguiente patrón de bandas.

Como se observa en la Figura 1 A y B, se puede ver la sobreexpresión de BtrG y BtrH respectivamente en los clarificados celulares. En los carriles 1 se ven representado el patrón de bandas correspondiente al clarificado celular de BtrG y BtrH respectivamente. En las imágenes queda claro la sobre-expresión de estas enzimas.

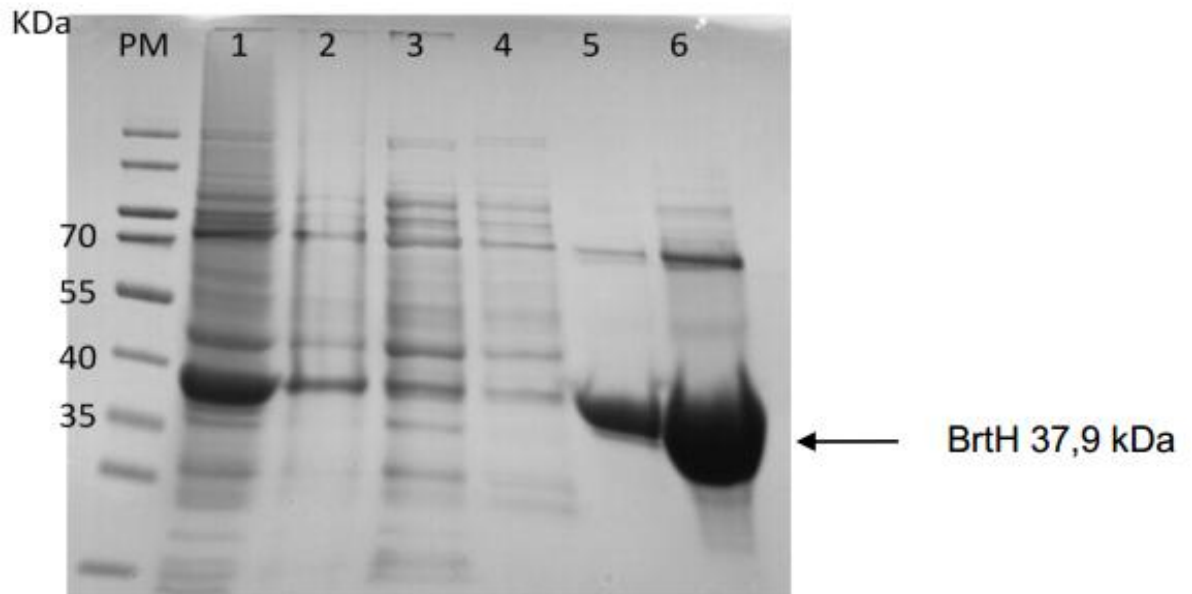


**Figura 1. A:** PM: Peso molecular; Carril 1: Clarificado celular de BtrG; **B:** PM: Peso molecular; Carril 1: Clarificado celular de BtrH.

### 5.2. Optimización de la purificación de las enzimas BtrH y BtrG.

Previamente se ha realizado la purificación de la enzima BtrH, que como se comentó anteriormente consta de un solo paso de purificación mediante un paso cromatográfico por afinidad, en el cual se obtuvo un grado de homogeneidad bajo. Como se puede

observar en la Figura 3 se muestra el patrón de bandas obtenidos con dicho protocolo en continuo.



**Figura 3.** Purificación de BtrH con metodología en continuo. Gel de poliacrilamida 10% PM: Marcador de peso molecular, Carril 1: Clarificado celular; Carril 2: Clarificado; Carril 3: Percolado; Carril 4: Lavado con 5 mM de imidazol; Carril 5: Lavado con 50 mM de imidazol; Carril 6: Elución con 250 mM de imidazol.

En el carril 1 se puede ver el clarificado celular obtenido luego la expresión e inducción con IPTG. Luego, en el carril 2 se muestra el clarificado celular, en el cual se puede ver la banda con el peso correspondiente a la enzima BtrH. En el carril 3 se observa el sobrenadante obtenido luego de utilizar la cromatografía de afinidad por metales, por otra parte, en los carriles 4 y 5 se pueden ver los lavados realizados con 5 y 50 mM de imidazol respectivamente. Por último, en el carril 6 se muestra la elución realizada con 250 mM de imidazol.

Como se puede ver, esta metodología es efectiva para la purificación de BtrH, aunque se observa con una co-purificación de un producto con mayor peso molecular, de aproximadamente 70 KDa.

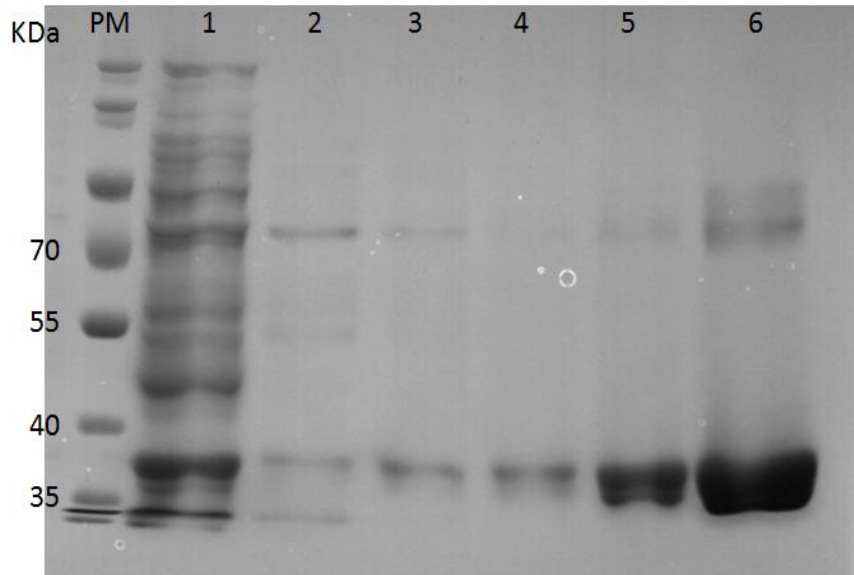
Otra observación es la concentración de imidazol utilizada para el lavado del soporte, Al observar el carril 5 de la Figura 3, podemos ver una banda correspondiente al peso de la BtrH por lo que entendemos que a esta concentración de imidazol es eluída.

Es por ello que se llevó a cabo la optimización de la purificación de las enzimas BtrG y BtrH, ya que el protocolo de purificación obtenido en el Laboratorio de Biotecnología previamente, tomaba al menos 2 días finalizarlo.

Para ello, se buscaron las mejores condiciones para poder purificar las proteínas, equilibrando la pureza de las mismas y los pasos de purificación utilizados.

Es por eso que se plantearon diferentes tiempos de incubación del soporte con el clarificado celular, de lavados, así como también diferentes condiciones para alcanzar la elución.

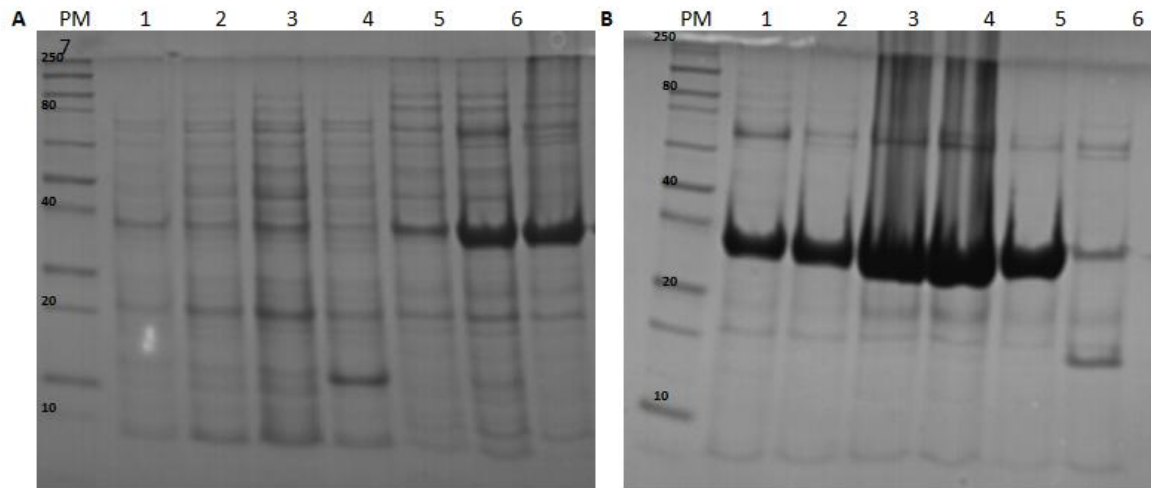
Se probaron diferentes concentraciones del competidor para evaluar la concentración óptima para la elución de la misma. En la Figura 4 se puede ver los patrones de bandas obtenidos a diferentes concentraciones de imidazol.



**Figura 4.** Purificación de BtrH. Gel de poliacrilamida 10% Carril PM: Marcador peso molecular, Carril 1: Sobrenadante de columna de agarosa IDA, Carril 2: Elución con 20mM de imidazol, Carril 3: Elución con 30 mM de imidazol, Carril 4: Elución con 40mM de imidazol, Carril 5: Elución con 60mM de imidazol, Carril 6:Elución con 250mM de imidazol.

Por otra parte, los tiempos de incubación utilizados fueron 15, 30 y 60 minutos, mientras que para los lavados se testearon 10 y 30 minutos para cada uno de ellos. Para las condiciones de lavado, además de la concentraciones de imidazol empleada, se testearon diferentes tiempos. Y por último, también se analizaron diferentes concentraciones de imidazol y diferentes tiempos para lograr la elución de BtrH.

Los resultados obtenidos en este ensayo se pueden ver en las Figuras 5 A y B.



**Figura 5. A y B:** SDS\_PAGE 12% Optimización de purificación de BtrH. **Figura A:** PM: Peso molecular; C1: Clarificado celular; C2: Incubación 15 minutos del soporte agarosa-IDA con el clarificado celular; C3: Incubación 84 minutos del soporte agarosa-IDA con el clarificado celular; C4: Lavado con 5 mM imidazol 1 minuto; C5: Lavado con 30 mM imidazol 30 minutos; C6: Lavado 40 mM imidazol 10 minutos; C7: Lavado 40 mM imidazol 30 minutos. **Figura B.** PM: Peso molecular; Carril 1: Lavado 60 mM imidazol 10 minutos; C2: Lavado 60 mM imidazol 30 minutos; C3: Elución 250 mM imidazol 10 minutos; C4: Elución 250 mM imidazol 30 minutos; C5: Elución 400 mM imidazol 10 minutos; C6: Vacío  
\*El tampón utilizado fue Tris-HCl 20 mM pH 7,9.

Tanto en la Figura 5 A como en la 5 B se puede observar las diferentes fracciones del proceso de purificación de la enzima BtrH.

En los primeros tres carriles de la Figura 5 A, se ve el clarificado y los tiempos de incubación 15 y 84 minutos. Por otra parte, en los carriles 4 al 7 y 1 al 2 de la Figura 5 B, podemos ver dos lavados realizados con 5, 30, 40 y 60 mM de imidazol en los diferentes tiempos planteados, 10 y 30 minutos.

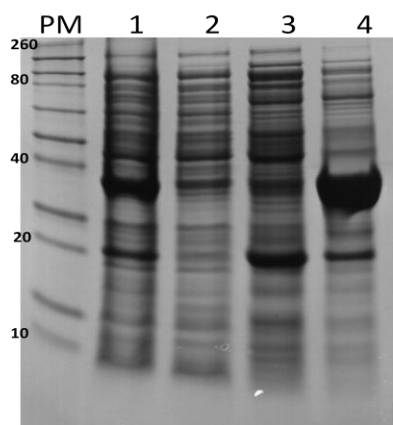
Por último, en los carriles 3 al 6 de la Figura 5 B, se muestran los lavados realizados para obtener la elución de la proteína BtrH, realizados con 250 y 400 mM de imidazol por 10 y 30 minutos respectivamente.

Como una primera observación de estos resultados, se puede decir, que el tiempo de incubación del soporte con el clarificado celular puede que no haya sido el suficiente como para llevar a cabo la unión entre el soporte y la enzima en estudio, ya que aún a los 84 minutos se observa la aciltransferasa BtrH (37 kDa), esto se puede visualizar en el carril 3 de la Figura 5 A. También, se podría mencionar que la capacidad de carga de la agarosa-IDA se haya visto superada.

En una segunda instancia, evaluando los resultados obtenidos para los lavados, podemos decir que una concentración igual o mayor a 40 mM de imidazol la proteína BtrH eluía a juzgar por las bandas obtenidas en las Figuras 4 y 5. Si observamos la Figura 4, podemos determinar que la concentración óptima para lograr un lavado del soporte sin eluir a BtrH, es de 30 mM ya que con dicha concentración no se observa banda significativa correspondiente a la proteína en estudio. Por otra parte, dado los tiempos empleados, como se puede ver en la Figura 5, no se ve una diferencia significativa entre los 10 y 30 minutos, ya que dejando 30 minutos, no vemos que haya una mayor elución de proteínas interferentes.

Con respecto a las condiciones de elución, tal como podemos observar en los carriles 4-7 de la Figura 5 B con la concentración de imidazol utilizadas (250 y 400 mM) se recuperamos la proteína en estudio, BtrH. Sin embargo, aún a la concentración de 400 mM de imidazol, se observa la presencia de la misma como se ve en el carril 5 de la Figura 5 B, por lo que si se eluyera con 250 mM estaríamos perdiendo BtrH. De todas maneras, lo que se planteó fue realizar la elución con un volumen mayor del tampón con 250 mM de imidazol lo cual resultó efectivo y de esta manera no se aumentó la cantidad del competidor.

En la Figura 6 se observa la purificación mediante la cromatografía IMAC de la proteína BtrH con el protocolo optimizado anteriormente. En esta oportunidad se optó por utilizar como tampón fosfato de sodio 25 mM pH 8,0, ya que por bibliografía el Tris interacciona con el soporte DEAE. Es por eso que el protocolo de purificación que se siguió de aquí en adelante es el mismo, solo sustituyendo el Tris-HCl 20 mM por fosfato de sodio (Na-P) 25 mM pH 8,0.



**Figura 6.** Gel SDS PAGE 12%. Purificación optimizada de BtrH.: PM: Peso molecular; Carril 1: Clarificado celular; C2: Incubación clarificado celular con el soporte agarosa IDA 30 minutos; C3: Lavado con 30 mM de imidazol por 10 minutos; C4: Elución con 250 mM de imidazol por 30 minutos  
\*El tampón utilizado fue fosfato de sodio 25 mM pH 7,9.

En los carriles 1 al 4 de esta misma Figura, se muestra la purificación mediante la agarosa IDA mencionada con anterioridad. En el carril 1 se puede ver el clarificado celular obtenido a partir de la purificación de 3 litros de cultivo. En el carril 2, se ve el sobrenadante de la incubación de dicho detrito con el soporte IDA por 30 minutos. En el carril 3 y 4, se muestran tanto el lavado con fosfato de sodio con 30 mM de imidazol como la elución con 250 mM de imidazol, por 10 y 30 minutos respectivamente.

La primera observación que se puede destacar de este resultado, es que el protocolo propuesto para el primero paso de purificación como lo es la IMAC, es un buen paso para la obtención de la aciltransferasa BtrH. Los parámetros tanto de incubación con el soporte IDA como los lavados y la elución se han visto optimizados, pudiéndose observar en comparación de la Figura 6 y 5. Se puede afirmar que la incubación por

30 minutos del clarificado celular con el IDA es propicia para la adhesión de la proteína al soporte. Por otro lado, el lavado por 10 minutos con 30 mM de imidazol es un buen paso para poder desplazar interacciones inespecíficas con el soporte mencionado anteriormente.

Por último, vemos que la elución es alcanzada con una concentración de 250 mM de imidazol por 30 minutos.

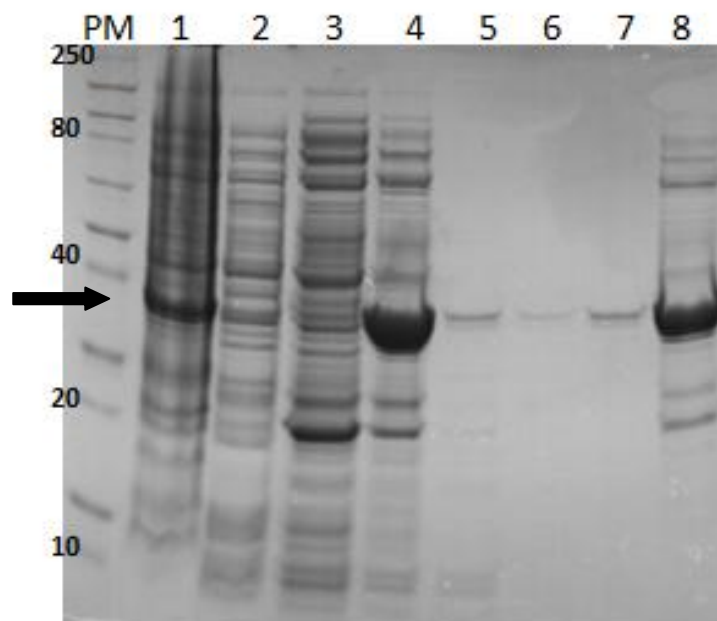
Debido a que la remoción del imidazol de la fracción eluída de BtrH con 250 mM de imidazol mediante un concentrador de proteínas requería al menos 48 horas, se decidió realizar una cromatografía de intercambio aniónico para poder remover dicho compuesto orgánico más rápidamente.

Para ello se testearon diferentes tiempos de incubación del eluido de la IMAC con el soporte DEAE para obtener la mayor adhesión de la proteína al soporte.

Los resultados obtenidos de este ensayo se muestran en la Tabla 1. Se puede decir que a la hora de incubación ya no se observa proteína en el sobrenadante, por lo que este tiempo es adecuado para que toda la proteína interactúe con el soporte. Luego los lavados y elución de la proteína se pueden observar en la Tabla 2.

**Tabla 2 Tiempos de incubación con DEAE**

	<b>Elución con 250 mM imidazol</b>	<b>DEAE 1 hora</b>	<b>DEAE 2 horas</b>	<b>DEAE ON</b>
<b>mg/mL</b>	<b>0,157</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0,021</b>
<b>Volúmenes (mL)</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>
<b>mg totales</b>	<b>3,14</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0,42</b>



**Figura 7.** Gel SDS PAGE 12%. Purificación completa, con intercambio aniónico con DEAE para BtrH.: PM: Peso molecular; Carril 1: Clarificado celular ; C2: Incubación clarificado celular con el soporte agarosa IDA 30 minutos; C3: Lavado con 30 mM de imidazol por 10 minutos; C4: Elución con 250 mM de imidazol por 30 minutos; C5: Incubación del eluido de la IMAC con el DEAE 16 horas; C6: Lavado con fosfato de sodio 25 mM pH 8,0 por 1 minuto; C7: Lavado con 50 mM de NaCl por 10 minutos ; C8: Elución con 300 mM de NaCl por 1 hora.

\*El tampón utilizado fue fosfato de sodio 25 mM pH 7,9.

**Tabla 3 Cuantificación proteica de la purificación de BtrH**

	Clarificado celular	Sobrenadante de la incubación Clarificado-IDA por 30 minutos	Lavado con 30 mM imidazol por 30 minutos	Elución con 250mM imidazol por 30 minutos	Sobrenadante de la incubación del eluido 250 mM imidazol con el DEAE durante 1 hora	Lavado con Na-P 25mM 15 minutos	Lavado con Na-P con 50mM NaCl	Elución 250mM NaCl 1 hora
mg/mL	7,267	5,0	3,38	1,195	0,156	0,099	0,038	1,097
volúmenes	110	110	35	35	28	28	28	28
mg totales	799,3	550	118,3	33,5	4,4	2,8	1,1	30,7

Por último, se realizó un desalado para remover el cloruro de sodio utilizado para la elución de la proteína. Los resultados obtenidos se pueden observar en la Tabla 3.

**Tabla 4 Cuantificación proteica de BtrH luego del desalado**

	Eluído concentrado	Sobrenadante GF	Gel filtrado
<b>mg/mL</b>	0,840	0,047	2,993
<b>Volumen (ml)</b>	22	2,5	3,5
<b>mg totales</b>	18,48	0,117	10,48

Por otra parte, para BtrG se realizó también la optimización de su protocolo de purificación.

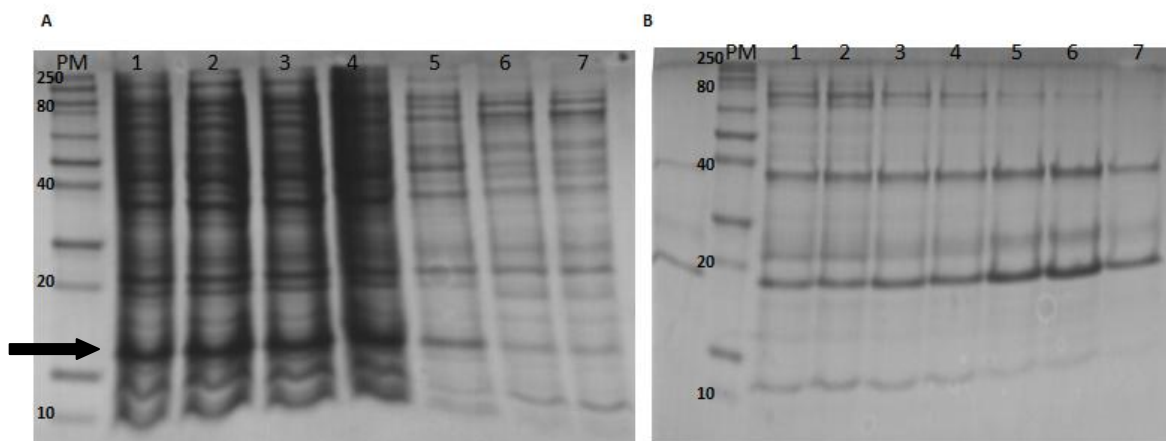
Para ello, se testearon diferentes tiempos tanto de incubación con el soporte, como de lavado y de elución como también diferentes concentraciones de imidazol para lograr un preparado homogéneo de esta proteína para poder realizar ensayos *in-vitro*.

El tiempo de incubación con el soporte, como se ve en la Figura 9 A en los carriles 2, 3 y 4 no tiene una diferencia significativa entre 15, 30 y 60. Es decir que no sería necesario una incubación por más de 15 minutos con el soporte agarosa IDA ya que esto no promueve una mayor adhesión con el soporte. Por otra parte, para remover interacciones no específicas con el soporte, se propusieron lavados con diferentes concentraciones de imidazol. Como se observa en la Figura 8 A carriles 5 al 7 y 6 B 1 al 4, concentraciones mayores a 30 mM de imidazol, desplazan la proteína y provocan la elución de la misma.

Con respecto a las concentraciones de imidazol las cuales se testearon para la elución de BtrG, como se observa en los carriles 5-7 de la Figura 8 A y 1-7 de la Figura 8 B, si bien desde la concentración de 40 mM de comienza a ver una banda correspondiente al peso de BtrG, la concentración de 250 mM de imidazol, es cuando se observa la mayor cantidad de proteína recuperada.

Es por eso que se puede concluir que en base a las concentraciones empleadas, lo más adecuado y productivo sería realizar un lavado con 30 mM de imidazol por 10 minutos para poder desplazar toda interacción débil con el soporte y eluir la proteína con una concentración de imidazol de 250 mM por 10 minutos, ya que este tiempo es suficiente para recuperar la mayor parte de BtrG, como se puede ver en los carriles 5 y 6 de la Figura 8 B.

A su vez, se puede ver la tabla de purificación (Tabla 3) de las diferentes fracciones que argumentan la discusión realizada anteriormente

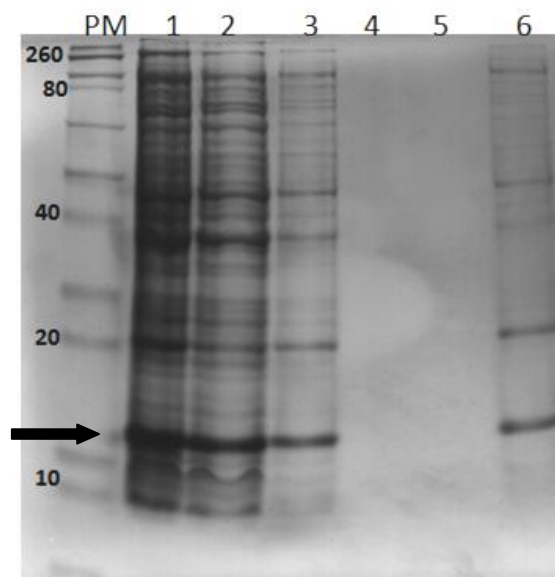


**Figura 8. A y B.** Gel SDS\_PAGE 15% Optimización de purificación de BtrG.: **Figura A:** PM: Peso molecular; Carril 1: Clarificado celular; C2: Incubación 15 minutos; C3: Incubación 30 minutos; C4: Incubación 60 minutos; C5: Lavado 5 mM imidazol 1 minuto; C6: Lavado 30 mM imidazol 10 minutos; C7: Lavado 30 mM imidazol 30 minutos. **Figura B.** PM: Peso molecular; C1: Lavado 40 mM imidazol 10 minutos; C2: Lavado 40 mM imidazol 30 minutos; C3: Lavado 60 mM imidazol 10 minutos; C4: Lavado 60 mM imidazol 30 minutos; C5: Elución 250 mM imidazol 10 minutos; C6: Elución 250 mM imidazol 30 minutos; C7: Elución 400 mM imidazol 10 minutos; C8: Elución 400 mM imidazol 30 minutos.  
\*El tampón utilizado fue Tris-HCl 20 mM pH 7,9

**Tabla 5 Cuantificación proteica de la purificación de BtrG.**

	mg totales de BtrG
Clarificado celular	269.5
Sobrenadante de la incubación por 15 minutos del soporte con el clarificado celular	185.25
Sobrenadante de la incubación por 30 minutos del soporte con el clarificado celular	185.05
Sobrenadante de la incubación por 60 minutos del soporte con el clarificado celular	185.85
Lavado del soporte con 10 mM imidazol por 10 minutos	6.1
Lavado del soporte con 10 mM imidazol por 30 minutos	5.7
Lavado del soporte con 15 mM imidazol por 10 minutos	5
Lavado del soporte con 15 mM imidazol por 30 minutos	4.7
Lavado del soporte con 20 mM imidazol por 10 minutos	3.6
Lavado del soporte con 20 mM imidazol por 30 minutos	4.4
Lavado del soporte con 30 mM imidazol por 10 minutos	3
Lavado del soporte con 30 mM imidazol por 30 minutos	2
Lavado del soporte con 250 mM imidazol por 10 minutos	11.7
Lavado del soporte con 250 mM imidazol por 30 minutos	11.7
Lavado del soporte con 400 mM imidazol por 10 minutos	4.3
Lavado del soporte con 400 mM imidazol por 30 minutos	3.65

En la Figura 9 se puede ver la purificación completa de BtrG obtenido realizado el protocolo descrito anteriormente. Si bien vemos que el patrón de bandas obtenidos muestra la purificación de BtrG, se puede observar que BtrG es co-purificada con una proteína de menor peso de aproximadamente 15 KDa.



**Figura 9.** Purificación completa de BtrG. Carril 1: Pellet celular; Carril 2: Clarificado celular; Carril 3: Sobrenadante de la incubación del clarificado celular con el IDA por 10 minutos; Carril 4: Lavado con 30 mM de imidazol por 10 minutos; Carril 5: Vacío; Carril 6: Eluido con 250 mM de imidazol por 10 minutos.

### 5.3. Estudios preliminares de algunas propiedades bioquímicas de la aciltransferasa BtrH.

#### 5.3.1 Actividad recuperada

Una vez obtenida una fracción de BtrH con alto grado de pureza, se procedió a evaluar su actividad.

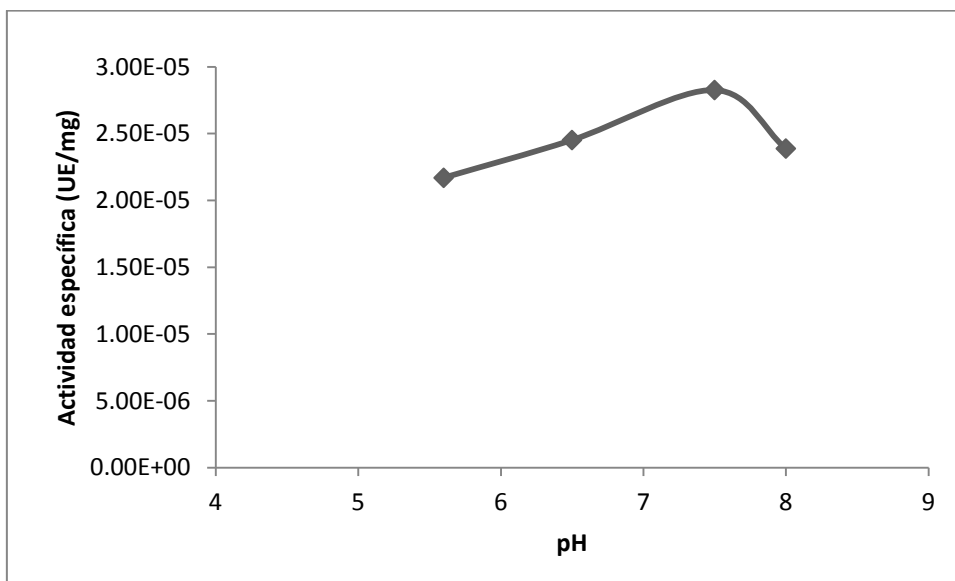
Para ello, se utilizó el método mencionado en la sección 4.5, en el cual se utiliza la liberación de tioles libres. En este caso, si la BtrH es capaz de donar un grupo acilo desde el  $\gamma$ -L-Glu- ABHA SNAC hacia la ribostamicina, el grupo SNAC es liberado reaccionando así con el DTNB. Este último compuesto, da dos productos diferentes, SNAC-TNB y TNB<sup>-</sup>, este último puede ser en solución pasa a ser TNB<sup>2-</sup> el cual puede ser detectado espectrofotométricamente a 405 nm.

Acorde a los resultados obtenidos luego de los pasos de purificación descritos previamente para BtrH, se obtuvo  $5,9 \times 10^{-6}$  unidades enzimáticas (UI).

En el caso de BtrG, como se comentó anteriormente, la misma presenta un desafío ya que no se posee un análisis colorimétrico para poder estudiarla más allá de la espectrometría de masas.

### 5.3.2. pH óptimo

Parte de la caracterización parcial de la enzima soluble aciltransferasa BtrH, consistió en evaluar el pH al cual la misma presenta su mayor actividad dado que esto no se encuentra reportado en bibliografía. Es por ello que los pH testados fueron diversos.

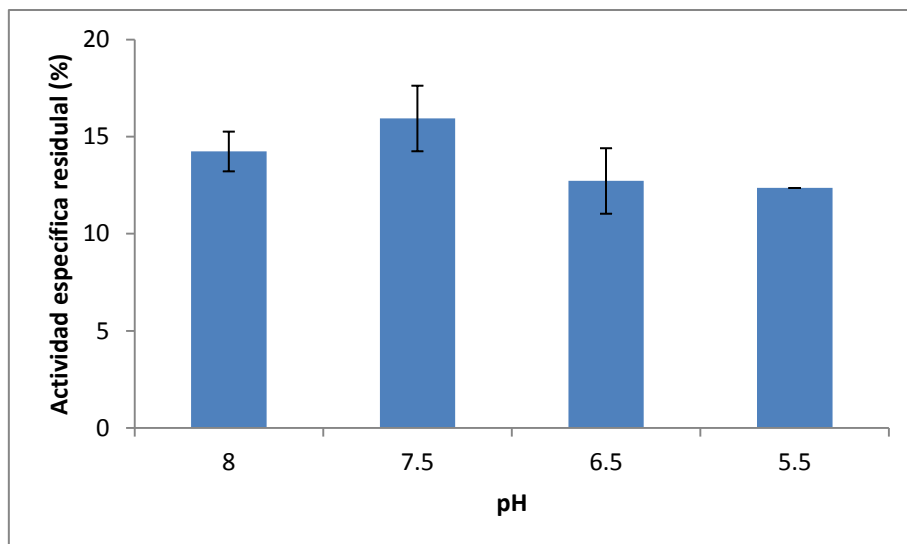


**Figura 10:** Actividad específica frente a los diferentes pH testados. Los tampones utilizados se encuentran descritos en la sección 4.11.

Observando la Figura 10, podemos destacar que el pH al cual la enzima presenta su mayor actividad es 7,9, lo cual concuerda con lo descrito en bibliografía.<sup>1</sup>

Por otra parte, es de importancia conocer la estabilidad de esta enzima a los diferentes pH. Al no contar con estudios previos, se testeó la estabilidad de la enzima BtrH en diferentes pH.

Para ello, se incubó por 1 hora y 20 minutos la enzima con nada uno de los pH testados. Pasado dicha incubación, se realizó la medida de la actividad residual en el pH de reacción 7,9.



**Figura 11.** Actividad específica residual frente a los diferentes pH testeados para evaluar la estabilidad en los mismos. Los tampones utilizados se encuentran descritos en la sección 4.8.4.

Como se puede ver en la Figura 11, al enfrentar a la aciltransferasa BtrH a diferentes pH, la misma posee una mayor estabilidad a pH 7,5 manteniendo en un 16% la actividad inicial.

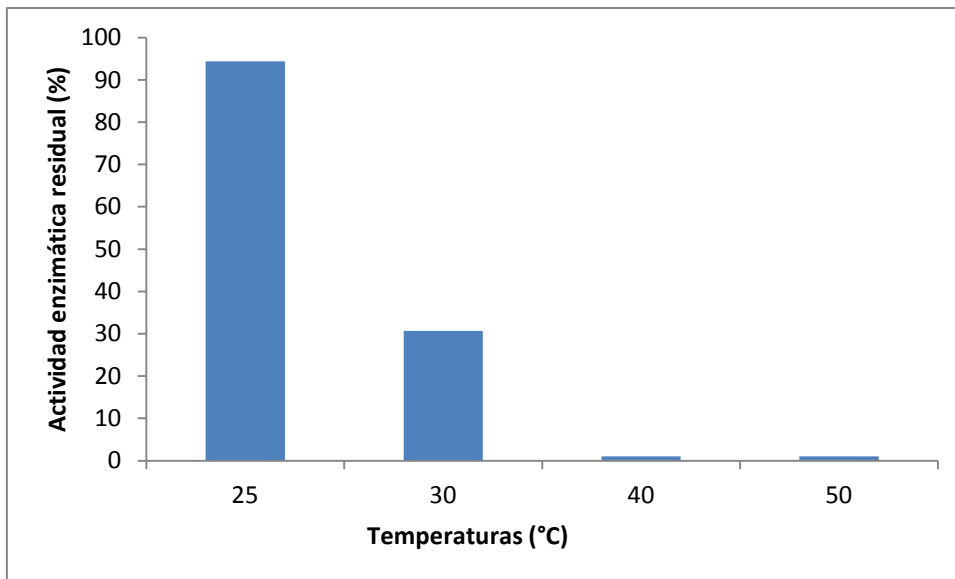
Por otra parte, se puede ver un descenso de la actividad recuperada cuando se testean pH extremos en relación al pH óptimo encontrado con anterioridad. La menor estabilidad se ve en un pH 5,5 en la cual la enzima pierde un 88% de su actividad inicial.

### 5.3.3. Estabilidad de temperatura

Por otra parte, se estudió la estabilidad de BtrH frente a diferentes temperaturas.

Para ello, lo que se llevó a cabo fue la incubación de aciltransferasa por una hora y media para luego medir la actividad residual de la misma.

En la Figura 12 se puede ver el porcentaje de actividad recuperada de la enzima BtrH soluble luego de una incubación de 1 hora y media a las diferentes temperaturas; 25, 30, 40 y 50°C.



**Figura 12:** Gráfico de actividad enzimática de BtrH en los tiempos 0 y 1 hora y media luego de ser incubadas a diferentes temperaturas.

Teniendo en cuenta los resultados de la Figura 12 se puede decir que la enzima reduce su actividad a las temperaturas superiores a 25 grados al cabo de una hora y media de incubación. En el caso de temperaturas superiores a los 40°C, la enzima se ve precipitada.

En la incubación a 25°C, la enzima pierde un 6% de su actividad frente a la inicial, mientras que cuando la misma es incubada a 30°C, la actividad se ve reducida en un 70%.

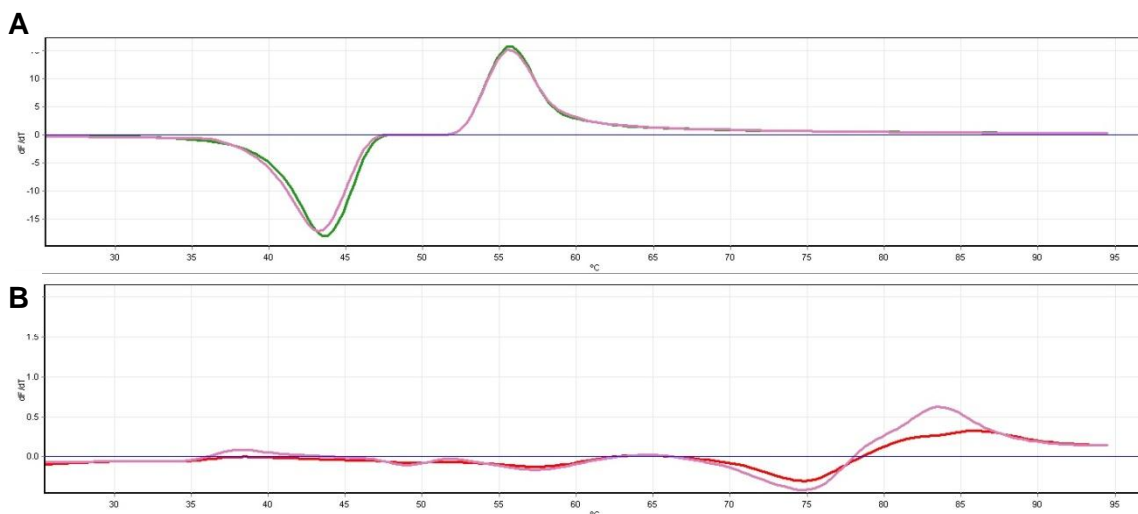
Respecto al resultado obtenido, se podría plantear modificar los tiempos de incubación para poder visualizar actividad en las temperaturas a las cuales la enzima se vio precipitada. Por otro lado, se podría testear temperaturas intermedias entre 25°C y 40°C para poder determinar la temperatura a la cual la enzima pierde gran parte de su actividad.

Es por ello que se realizó una técnica novedosa, en la cual se incuba la enzima con una sonda la cual posee afinidad a regiones hidrofóbicas. Esta mezcla se somete a un aumento gradual de la temperatura, haciendo así que la proteína se despliegue y exponga sus regiones hidrofóbicas al medio.

Lo que se puede ver en las Figuras 13 y 14, son los gráficos obtenidos de este aumento de temperatura gradual realizado mediante el equipo RotorGene, el cual se programó para que aumente 1 °C cada 30 segundos. En este caso, se muestran la derivada de la fluorescencia respecto al tiempo para poder observar la temperatura a la cual el cambio de fluorescencia es mayor.

En el caso de BtrH, se puede observar que entre los 42 y 44 °C la enzima pierde su estructura generando así que la sonda se una a las regiones expuestas y aumentando de esta manera la fluorescencia.

En el caso de BtrG, se observa que la desnaturalización ocurre a los 75 °C, por lo que se puede decir que BtrG es más estable frente a la temperatura comparada a BtrH.

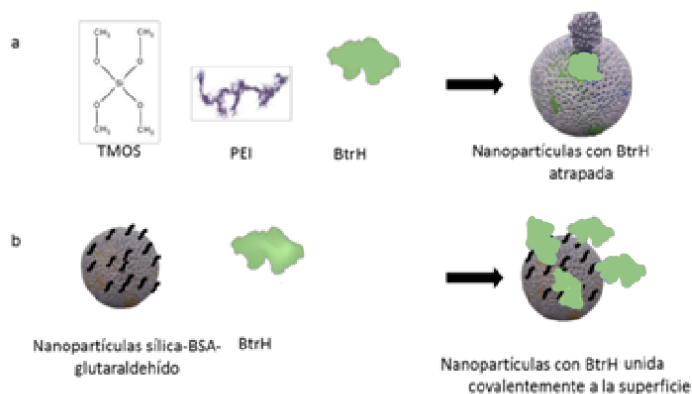


**Figura 13. A:** Estabilidad de BtrH frente a diferentes temperaturas; **B:** Estabilidad de BtrG frente a diferentes temperaturas utilizando el RotorGene.

#### 5.4. Inmovilización de la enzima BtrH.

En esta oportunidad, la inmovilización se estudió mediante dos estrategias utilizando nanopartículas de sílica biomimética. Una de ellas fue mediante inmovilización por atrapamiento dentro de las nanopartículas, y la otra mediante la unión covalente en superficie a las nanopartículas activadas previamente con glutaraldeído.

Estas dos estrategias se pueden ver en la Figura 14, en donde se representan las diferentes uniones.



**Figura 14.** Estrategias de inmovilización de BtrH (verde). (a) Inmovilización por atrapamiento. (b) Inmovilización en superficie. Tetrametilortosilicato (TMOS), polietilernimina (PEI).

Para el primer enfoque, se llevó a cabo la síntesis de las nanopartículas de sílica en presencia de la enzima BtrH y de esta manera así atrapar a la enzima dentro de la red de sílica. Esta estrategia, presentó un 76% de porcentaje de inmovilización medido mediante la actividad de la enzima tanto en el sobrenadante como del aplicado inicial. Esto se observa en la Tabla 6.

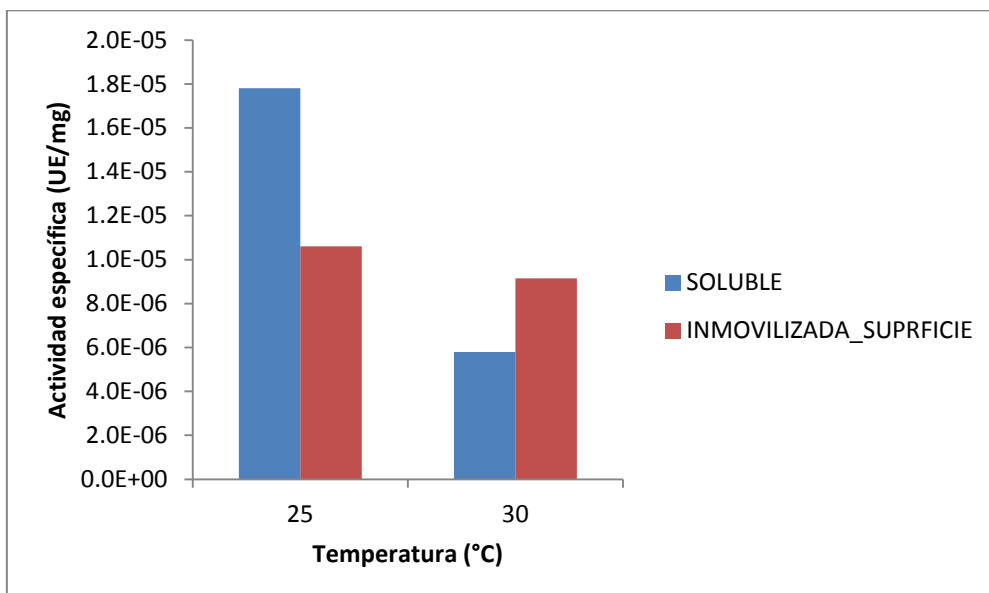
En el caso de la inmovilización en superficie, el porcentaje de inmovilización también fue medido mediante la actividad recuperada tanto en el sobrenadante como en el ofrecido, obteniéndose un 81.5%, este resultado también se aprecia en la Tabla 6.

**Tabla 6 Inmovilización de BtrH en nano-partículas de sílica biomimética por atrapamiento y por unión covalente en superficie. % I porcentaje de inmovilización.**

Estrategia de inmovilización	% I BtrH
Atrapamiento	76 %
Unión covalente en superficie con glutaraldehído	81.5%

Debido a la baja estabilidad que presenta la enzima BtrH en solución, una de las estrategias planteadas en este trabajo fue la inmovilización de la misma para poder aumentar la estabilidad.

Para ello, lo que se realizó la incubación de los preparados inmovilizados tanto por atrapamiento como en superficie, durante 1 hora y media para luego medir la actividad residual de la misma.



**Figura 15.** Gráfico de actividad enzimática residual luego de la incubación a las diferentes temperaturas. Se puede observar tanto la enzima soluble (azul), como la enzima la enzima inmovilizada en superficie (rojo).

En la Figura 15 se puede observar la actividad residual que presenta la enzima BtrH luego de ser inmovilizada en la superficie de nanopartículas de sílica biomiméticas mediante la activación con glutaraldehído.

Acorde a los resultados obtenidos, se desprende que la enzima inmovilizada, es más estable que soluble, ya que presenta una mayor actividad luego de las incubaciones a diferentes temperaturas en comparación a la enzima soluble.

Al observarse la actividad presentada luego de 1 hora y media de incubación a 25°C vemos que la enzima inmovilizada mantiene su actividad en un 100% frente a la enzima soluble que mantiene un 74%. Por otro lado, al realizar la incubación a 30°C, se puede observar que el inmovilizado mantiene un 84% de actividad, mientras que la enzima soluble únicamente mantiene un 24% de su actividad inicial.

## **6. Análisis económico.**

En el contexto de esta tesis, no se justifica realizar todavía una evaluación del impacto económico del producto generado.

## 7. Conclusiones.

Como conclusiones generales se puede decir que tanto la expresión como la optimización de la purificación de BtrG y BtrH se realizaron de manera exitosa.

Se logró la reducción de un 79% en el tiempo empleado para la purificación de BtrH, ganando así tiempo ya que por estudios previos en el laboratorio se sabe que la enzima es muy inestable.

La optimización de la purificación de BtrH, muestra que la metodología con la columna comercial Q posee una mayor eficiencia al poder recuperar 71% de la proteína en comparación a 43% que se recupera con el intercambiador DEAE.

En relación a la caracterización de la enzima BtrH de manera soluble, se puede observar que el pH óptimo al cual la enzima posee su mayor actividad, es de 7.5, al igual al reportado en bibliografía. Esto avala la elección realizada a la hora de la preparación de los tampones con los cuales se testearon las actividades.

De todas formas, los resultados obtenidos son preliminares, los cuales deben ser nuevamente testeados para poder tener un panorama más certero y confiable,

Por otra parte, se concluye que ambas estrategias de inmovilización planteadas, contribuyeron de manera positiva en la estabilidad frente a la temperatura de la enzima BtrH, obteniéndose mayor actividad residual en comparación a la recuperada de la enzima soluble.

Igualmente como se comentó anteriormente, los resultados obtenidos son preliminares, los cuales dan un panorama general de las características de la enzima BtrH.

## 8. Referencias bibliográficas.

1. Li TL, Liu YC, Lyu SY. Combining biocatalysis and chemoselective chemistries for glycopeptide antibiotics modification. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2012;16(1-2):170–178.
2. Gyssens IC. Quality measures of antimicrobial drug use. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2001;17(1):9–19.
3. Melorose J, Perroy R, Careas S. The Clinical Significance of Positive Blood Cultures in the 1990s: A Prospective Comprehensive Evaluation of the Microbiology, Epidemiology, and Outcome of Bacteremia and Fungemia in Adults. *Statewide Agricultural Land Use Baseline 2015*. 2015;1.
4. Byl B, Clevenbergh P, Jacobs F, Struelens MJ, Zech F, Kentos a, Thys JP. Impact of infectious diseases specialists and microbiological data on the appropriateness of antimicrobial therapy for bacteremia. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 1999;29(1):60–66; discussion 67–68.
5. Wright GD. Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2005;57(10):1451–1470.
6. Papadovasilaki M, Oberthür D, Gessmann R, Sarrou I, Betzel C, Scoulica E, Petratos K. Biophysical and enzymatic properties of aminoglycoside adenyltransferase AadA6 from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry and Biophysics Reports*. 2015;4:152–157.
7. Davies, J; Davis BD. Misreading of Ribonucleic Acid Code Words Induced by Aminoglycoside Antibiotics. *Journal of Biological Chemistry*. 1968;243(12):3312–3316.
8. Woodcock J, Moazed D, Cannon M, Davies J, Noller HF. Interaction of antibiotics with A- and P-site-specific bases in 16S ribosomal RNA. *The EMBO journal*. 1991;10(10):3099–103.
9. Kahlmeter G, Dahlager JI. Aminoglycoside toxicity - a review of clinical studies published between 1975 and 1982. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 1984;13 Suppl A:9–22.
10. Mingeot-Leclercq MP, Glupczynski Y, Tulkens PM. Aminoglycosides: Activity and resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1999;43(4):727–737.
11. Staphylococcus M, Detected M, George A, Kleinfelter LM, Schreiber NA, Mukherjee S, Sapkota A, Joseph SW. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Disease in Three Communities. 2012;120(11):1551–1558.
12. Llewellyn NM. Biosynthesis of Butirosin : Incorporation of the Unique ( S ) -4-Amino-2- hydroxybutyryl Amino Acid Side Chain This dissertation is submitted for the degree of Doctor of Philosophy. 2008;(March).
13. Lin W, Huang Y, Zhou X-D, Ma Y. In vitro toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2006;217(3):252–259.
14. Xie Y, Kocaefe D, Chen C, Kocaefe Y. Review of Research on Template Methods in Preparation of Nanomaterials. 2016;2016.
15. Heng C, Liu M, Wang P, Wang K, Zheng X, Fan D, Hui J, Zhang X, Wei Y. Preparation of silica nanoparticles based multifunctional therapeutic systems via one-step mussel inspired modification. *Chemical Engineering Journal*. 2016;296:268–276.

16. Luan PP, Jiang YJ, Zhang SP, Gao J, Su ZG, Ma GH, Zhang YF. Chitosan-mediated formation of biomimetic silica nanoparticles: An effective method for manganese peroxidase immobilization and stabilization. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2014;118(5):575–582.
17. Jackson E, Ferrari M, Cuestas-Ayllon C, Fernández-Pacheco R, Perez-Carvajal J, De La Fuente JM, Grazú V, Betancor L. Protein-templated biomimetic silica nanoparticles. *Langmuir*. 2015;31(12):3687–3695.
18. Betancor L, Hidalgo A, Fernández-Lorente G, Mateo C, Rodríguez V, Fuentes M, López-Gallego F, Fernández-Lafuente R, Guisan JM. Use of physicochemical tools to determine the choice of optimal enzyme: Stabilization of D-amino acid oxidase. *Biotechnology Progress*. 2003;19(3):784–788.
19. Sheldon RA. Enzyme immobilization: The quest for optimum performance. *Advanced Synthesis and Catalysis*. 2007;349(8-9):1289–1307.
20. Betancor L, Luckarift HR. Bioinspired enzyme encapsulation for biocatalysis. *Trends in Biotechnology*. 2008;26(10):566–572.
21. Mageswari A, Subramanian P, Chandrasekaran S, Sivashanmugam K, Babu S, Gothandam KM. Optimization and immobilization of amylase obtained from halotolerant bacteria isolated from solar salterns. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 2012;10(2):201–208.
22. Tischer W, Kasche V. Immobilized enzymes: crystals or carriers? 1999;17(August):326–335.
23. Betancor L, Berne C, Luckarift HR, Spain JC. Coimmobilization of a redox enzyme and a cofactor regeneration system. *Chemical communications (Cambridge, England)*. 2006:3640–3642.
24. Brown RE, Jarvis KL, Hyland KJ. Protein measurement using bicinchoninic acid: elimination of interfering substances. *Analytical Biochemistry*. 1989;180(1):136–139.