



RIDAA
Repositorio Institucional
Digital de Acceso Abierto de la
Universidad Nacional de Quilmes



Universidad
Nacional
de Quilmes

Valino, Ana Laura

Obtención de desoxinucléosidos y desoxinucleótidos mediante el uso de biocatalizadores



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:

Valino, A. L. (2017). *Obtención de desoxinucléosidos y desoxinucleótidos mediante el uso de biocatalizadores. (Tesis de doctorado). Bernal, Argentina: Universidad Nacional de Quilmes. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes*
<http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/360>

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>

Obtención de desoxinucleósidos y desoxinucleótidos mediante el uso de biocatalizadores

TESIS DOCTORAL

Ana Laura Valino

avalino@unq.edu.ar

Resumen

El objetivo general de esta Tesis Doctoral fue desarrollar metodologías de preparación de desoxinucleósidos y desoxinucleótidos a partir de sustratos económicos, como ribósidos y azúcares, utilizando biotransformaciones con células bacterianas y enzimas, mediante procesos que involucren condiciones compatibles con el medio ambiente.

El primer capítulo está enfocado a la descripción de las aplicaciones de los nucleósidos. También se presentan las ventajas que implica el uso de biotransformaciones respecto a la síntesis química tradicional y se describen las metodologías más utilizadas en la síntesis de nucleósidos.

En el segundo capítulo se presenta la definición del problema que dio origen al objetivo planteado en este trabajo. Luego se describe el objetivo particular y se plantean los caminos multienzimáticos propuestos para llevarlo a cabo mostrando reacciones modelo.

El tercer capítulo describe una estrategia de síntesis biocatalizada de uridina 5'-monofosfato. En primer lugar se realiza una introducción sobre el tema y se presenta la parte experimental con las metodologías específicas empleadas en esta parte del trabajo. En particular, para la síntesis de uridina 5'-monofosfato, se utilizaron células enteras de *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC 19350 como biocatalizador, dado que existían antecedentes sobre el empleo de varias cepas de dicho género en la síntesis de diversos nucleótidos tanto purínicos como pirimidínicos. Se evaluaron diferentes métodos de cultivo del biocatalizador, distintos materiales de partida así como diversas condiciones experimentales de la biotransformación de manera de optimizar los resultados alcanzados. Se determinó la presencia de UMP lográndose buenos resultados y las mezclas de reacción obtenidas se utilizaron para la síntesis de uridina 5'-difosfato, desarrollada en el Capítulo 5.

En el Capítulo 4 se describe la síntesis de uridina 5'-monofosfato utilizando células enteras de enterobacterias con actividad fosfatasa ácida no-específica. En primer lugar se realiza una introducción sobre el tema y luego se presenta la parte experimental. Posteriormente se describe la selección de microorganismos con actividad NSAP con las cuales se ensayó, no sólo la síntesis de UMP, sino también de timidina 5'-monofosfato, adenínarabinosido 5'-monofosfato y diversos azúcares fosfato a partir de los correspondientes nucleósidos y azúcares, con buenos resultados. Finalmente, se utilizaron dos microorganismos genéticamente modificados, desarrollados previamente en nuestro laboratorio, para la obtención biocatalizada de los productos de interés, obteniéndose resultados satisfactorios logrando reducir los tiempos de reacción de forma considerable. En particular, las mezclas de reacción obtenidas para la síntesis de UMP se utilizaron para la producción de uridina 5'-difosfato, desarrollada en el Capítulo 5.

En el Capítulo 5 y continuando con el camino multienzimático planteado en los objetivos, se propuso a modo de introducción el uso de *Saccharomyces cerevisiae* como biocatalizador. Este microorganismo es una fuente importante de nucleósido monofosfato quinasas, con lo cual su uso para la obtención de diferentes NDP, resulta de potencial utilidad. Luego de detallar

la metodología de trabajo, se desarrollaron los resultados. Los mismos muestran que se logró sintetizar UDP a partir de un extracto de levadura utilizando UMP como sustrato, mediante una metodología sencilla y en condiciones de reacción suaves, logrando buenos rendimientos. Del mismo modo, el sistema biocatalítico se aplicó a la síntesis de otros nucleósidos, desoxinucleósidos y arabinósidos 5'-difosfato con resultados positivos. Posteriormente se evaluaron las variables que podían influir sobre esta reacción al emplear las mezclas provenientes de la síntesis de UMP, desarrolladas en los Capítulos 3 y 4, a partir de sustratos más económicos y mediante reacciones multienzimáticas one-pot. Finalmente se acondicionaron las mezclas obtenidas durante el desarrollo de dichos capítulos y se ensayó la síntesis de UDP, lográndose resultados satisfactorios, equivalentes a los obtenidos al utilizar UMP comercial.

En el Capítulo 6 se realizó un screening de bacterias, particularmente del género *Escherichia*, que funcionen como biocatalizadores para la síntesis de desoxinucleótidos, en particular de 2'-desoxiuridina 5'-difosfato, mediante una ruta que incluye la enzima ribonucleósido reductasa (RNR), a partir de uridina 5'-difosfato como sustrato. No se lograron resultados positivos ya que no se pudo determinar la presencia de dUDP así como tampoco de dUMP, como subproducto de reacción. Sin embargo, en el momento de finalización de escritura de esta Tesis, mediante un análisis más fino de los cromatogramas obtenidos, se determinó la presencia de otro posible subproducto de reacción, en este caso desoxiuridina, utilizando *E. coli* ATCC 23513 como biocatalizador. Esto nos incentivó a continuar, próximamente, con un análisis más profundo de esta mezcla para poder determinar la presencia y confirmar la identidad de este compuesto.

En el Capítulo 7 se utilizó una estrategia alternativa para la síntesis de desoxirribonucleósidos respecto a la desarrollada en las secciones anteriores. Para ello, en una primera parte se describen, a modo de introducción, las enzimas involucradas en el camino multienzimático propuesto, así como la posterior exposición de la parte metodológica. Luego se presentan los resultados, describiendo la selección de microorganismos, mediante un screening sobre diversos géneros bacterianos, capaces de sintetizar dR5P por acción de la enzima 2-desoxirribosa 5-fosfato aldolasa. En particular, se identificó a *Erwinia carotovora* ATCC 33260 como un biocatalizador novedoso que generó 14.1 mM de DR5P a partir de glucosa como materia prima, sustrato cuyo valor comercial es sustancialmente menor al del D-gliceraldehído 3-fosfato, sustrato natural de la enzima. Posteriormente, se acoplaron dos enzimas, una fosfopentomutasa y una nucleósido fosforilasa para la síntesis de desoxinucleósidos pirimidínicos como timidina, 2'-desoxiuridina y 5-bromo-2'-desoxiuridina, utilizando como sustrato de partida dR5P preparada en la primera parte de este capítulo, obteniéndose resultados positivos y cumpliendo así con los objetivos propuestos.

Palabras clave: desoxinucleósidos; desoxinucleótidos; biocatalizadores.



OBTENCIÓN DE DESOXINUCLÉOSIDOS Y DESOXINUCLÉÓTIDOS MEDIANTE EL USO DE BIOCATALIZADORES

Autor: Lic. Ana Laura Valino

Director: Dra. Elizabeth Lewkowicz

Co-director: Dr. Adolfo Iribarren

Trabajo de Tesis para optar al título de Doctor de la Universidad Nacional de Quilmes

Mención en Ciencias Básicas y Aplicadas

Laboratorio de Biocatálisis y Biotransformaciones

Departamento de Ciencia y Tecnología

Universidad Nacional de Quilmes

2013

*“Intenta no volverte un hombre de éxito,
sino volverte un hombre de valor.”*

Albert Einstein

A mi abuelo Oscar, mi ángel en el cielo.

A mi mamá y mi papá.

A mis amadas hijas, Bianca y Julia.

Índice

Resumen general.....	9
-----------------------------	----------

Capítulo 1

Introducción general.....	12
1.1. Nucleósidos modificados.....	12
1.1.1 Aplicaciones.....	12
1.2. Biotransformaciones.....	17
1.2.1. Biotransformaciones con enzimas aisladas. Ventajas e inconvenientes.....	19
1.2.2. Biotransformaciones con células enteras. Ventajas y desventajas.....	21
1.3. Búsqueda de nuevos biocatalizadores.....	22
1.3.1. Selección y <i>screenings</i> consecutivos estructurados de modo jerárquico.....	24
1.4. Preparación de nucleósidos.....	25
1.4.1. Síntesis química.....	25
1.4.2. Síntesis enzimática.....	26
Bibliografía.....	30

Capítulo 2

Objetivos de la Tesis-Fundamentación.....	36
2.1. Definición del problema.....	36
2.2. Objetivos.....	37
Bibliografía.....	40

Capítulo 3

Obtención biocatalizada de uridina 5'-monofosfato (UMP).....	42
3.1. Introducción.....	42
3.1.1. Uso de <i>Corynebacterium ammoniagenes</i> como biocatalizador.....	42
3.1.1.1. Obtención de adenosina 5'-trifosfato.....	42

3.1.1.2. Síntesis de uridina 5'-monofosfato.....	45
3.1.2. Caminos metabólicos involucrados en la síntesis de uridina 5'-monofosfato a partir de ácido orótico y uracilo.....	46
3.2. Materiales y Métodos.....	51
3.2.1. Materiales.....	51
3.2.2. Metodología.....	51
3.2.2.1. Biotransformaciones a partir de ácido orótico.....	51
3.2.2.2. Biotransformaciones a partir de uracilo.....	53
3.2.2.3. Análisis cualitativo.....	54
3.2.2.4. Análisis cuantitativo.....	55
3.3. Resultados y discusión.....	58
3.3.1. Selección del biocatalizador para la obtención de UMP.....	58
3.3.2. Biotransformaciones a partir de ácido orótico.....	58
3.3.3. Biotransformaciones a partir de uracilo.....	65
3.4. Conclusiones.....	68
Bibliografía.....	70

Capítulo 4

Obtención biocatalizada de desoxirribonucleósidos, arabinonucleósidos y azúcares monofosfato.....	72
4.1. Introducción.....	72
4.1.1. Fosfohidrolasas.....	72
4.1.2. Fosfohidrolasas ácidas no-específicas (NSAPs).....	73
4.1.2.1. Fosfatasas ácidas bacterianas de clase molecular A.....	75
4.1.2.2. Fosfatasas ácidas bacterianas de clase molecular B.....	76
4.1.2.3. Fosfatasas ácidas bacterianas de clase molecular C.....	77
4.1.3. Aplicación de NSAPs bacterianas a la obtención de nucleósidos y azúcares fosfato.....	79
4.2. Materiales y Métodos.....	80
4.2.1. Materiales.....	80
4.2.2. Metodología.....	80

4.2.2.1. Cultivo y preparación de los biocatalizadores.....	80
4.2.2.2. Expresión de enzimas recombinantes y preparación de los biocatalizadores.....	80
4.2.2.3 Biotransformaciones con ribonucleósidos, desoxirribonucleósidos y arabinonucleósidos como sustrato.....	81
4.2.2.4. Biotransformaciones con diferentes azúcares como sustratos.....	81
4.2.2.5. Análisis cualitativo.....	82
4.2.2.6. Análisis cuantitativo.....	82
4.3. Resultados y discusión.....	87
4.3.1. Selección de los biocatalizadores utilizando uridina como sustrato.....	87
4.3.2. Biotransformaciones con desoxirribonucleósidos y arabinonucleósidos como sustratos.....	89
4.3.3. Biotransformaciones con diferentes azúcares como sustrato.....	91
4.3.4. Uso de biocatalizadores genéticamente modificados.....	95
4.4. Conclusiones.....	98
Bibliografía.....	100
 Capítulo 5	
Obtención de nucleósidos 5'-difosfato.....	104
5.1. Introducción.....	104
5.1.1. Nucleósido monofosfato quinasas.....	104
5.1.1.2. Uridina-5'-monofosfato quinasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	105
5.1.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y su uso como sistema de producción de ATP.....	106
5.2. Materiales y Métodos.....	108
5.2.1. Materiales.....	108
5.2.2. Metodología.....	108
5.2.2.1. Cultivo y preparación del biocatalizador.....	108
5.2.2.2. Biotransformación estándar.....	108
5.2.2.3. Reacciones biocatalizadas consecutivas.....	109
5.2.2.4. Análisis cuali-cuantitativo.....	110
5.3. Resultados y discusión.....	116

5.3.1. Preparación del biocatalizador.....	116
5.3.2. Obtención de uridina 5'-difosfato.....	116
5.3.3. Obtención de otros ribonucleósidos, 2'-desoxirribonucleósidos y arabinonucleósidos 5'- difosfato.....	118
5.3.4. Obtención de UDP a partir de reacciones biocatalizadas consecutivas.....	120
5.3.4.1. Uso de mezclas de reacción provenientes de la biotransformación con <i>Raoultella planticola</i>	120
5.3.4.2. Uso de mezclas de reacción provenientes de las biotransformaciones con <i>Corynebacterium ammoniagenes</i> y ácido orótico.....	127
5.3.4.3. Uso de mezclas de reacción provenientes de las biotransformaciones con <i>Corynebacterium ammoniagenes</i> y uracilo.....	130
5.4. Conclusiones.....	133
Bibliografía.....	134

Capítulo 6

Obtención de desoxiuridina 5'-difosfato a partir de uridina 5'-difosfato.....

6.1. Introducción.....	136
6.1.1. Ribonucleótido reductasas.....	136
6.1.1.1. Ribonucleótido reductasas de clase I.....	137
6.1.1.2. Ribonucleótido reductasas de clase II.....	138
6.1.1.3. Ribonucleótido reductasas de clase III.....	139
6.1.2. Sistema de reducción de ribonucleótidos de <i>Escherichia coli</i>	139
6.2. Materiales y Métodos.....	142
6.2.1. Materiales.....	142
6.2.2. Metodología.....	142
6.2.2.1. Medios de cultivo.....	142
6.2.2.2. Preparación de los biocatalizadores.....	143
6.2.2.3. Biotransformación estándar.....	143
6.2.2.4. Análisis e identificación de productos.....	144
6.3. Resultados y discusión.....	145
6.3.1. Preparación de los biocatalizadores.....	145

6.3.2. Obtención de 2'-desoxiuridina 5'-difosfato.....	147
6.4. Conclusiones.....	154
Bibliografía.....	155

Capítulo 7

Obtención de 2-desoxirribosa 5-fosfato mediante el uso de células enteras con actividad 2-desoxirribosa 5-fosfato aldolasa y síntesis de desoxinucleósidos.....

7.1. Introducción.....	157
7.1.1. Nucleósido fosforilasas: enzimas involucradas en las vías de recuperación de nucleósidos.....	157
7.1.2. Fosfopentomutasa.....	161
7.1.3. Aldolasas.....	162
7.1.3.1. Grupo I.....	163
7.1.3.2. Grupo II.....	164
7.1.3.3. Grupo III.....	165
7.1.3.4. Grupo IV.....	166
7.1.4. DERA: 2-desoxirribosa 5-fosfato aldolasa.....	166
7.1.4.1. Estructura.....	169
7.1.4.2. Organización génica.....	169
7.2. Materiales y Métodos.....	171
7.2.1. Materiales.....	171
7.2.2. Metodología.....	171
7.2.2.1. <i>Screening</i> de microorganismos que contienen DERA.....	171
7.2.2.1.1. <i>Screening</i> primario.....	171
7.2.2.1.2 <i>Screening</i> secundario.....	171
7.2.2.2. Preparación de los biocatalizadores.....	172
7.2.2.3. Biotransformaciones.....	173
7.2.2.3.1. Preparación de 2-desoxirribosa 5-monofosfato (dR5P) a partir de gliceraldehído 3-fosfato (MR1).....	173
7.2.2.3.2. Preparación de dR5P a partir de glucosa (MR2).....	173
7.2.2.3.3. Preparación de dR5P a partir de fructosa 1,6-difosfato (MR3).....	173

7.2.2.3.4. Preparación de DR5P a partir dihidroxiacetona fosfato (MR4).....	174
7.2.2.3.5. Biotransformaciones con detergentes.....	174
7.2.2.3.6. Síntesis de desoxinucleósidos.....	174
7.2.2.4. Métodos analíticos.....	175
7.3. Resultados y discusión.....	177
7.3.1. Búsqueda de biocatalizadores.....	177
7.3.1.1. <i>Screening</i> primario.....	178
7.3.1.2. <i>Screening</i> secundario.....	178
7.3.2. Biotransformación utilizando gliceraldehído 3-fosfato como material de partida.....	179
7.3.3. Biotransformaciones a partir de glucosa como material de partida.....	180
7.3.4. Biotransformaciones a partir de fructosa 1,6-difosfato.....	182
7.3.5. Biotransformaciones a partir de dihidroxiacetona fosfato.....	184
7.3.6. Comparación de los resultados obtenidos en las diferentes biotransformaciones.....	184
7.3.7. Biotransformaciones con detergentes.....	187
7.3.7.1. Análisis mediante HPLC de la incorporación de ATP a las células.....	189
7.3.8. Síntesis de desoxinucleósidos a partir de bases pirimidínicas y 2-desoxirribosa 5-fosfato.....	192
7.4. Conclusiones.....	196
Bibliografía.....	198
Conclusiones finales.....	203
Perspectivas.....	206
Abreviaturas.....	207
Anexo I.....	212
Agradecimientos.....	218

Resumen general

El objetivo general de esta Tesis Doctoral fue desarrollar metodologías de preparación de desoxinucleósidos y desoxinucleótidos a partir de sustratos económicos, como ribósidos y azúcares, utilizando biotransformaciones con células bacterianas y enzimas, mediante procesos que involucren condiciones compatibles con el medio ambiente.

El primer capítulo está enfocado a la descripción de las aplicaciones de los nucleósidos. También se presentan las ventajas que implica el uso de biotransformaciones respecto a la síntesis química tradicional y se describen las metodologías más utilizadas en la síntesis de nucleósidos.

En el segundo capítulo se presenta la definición del problema que dio origen al objetivo planteado en este trabajo. Luego se describe el objetivo particular y se plantean los caminos multienzimáticos propuestos para llevarlo a cabo mostrando reacciones modelo.

El tercer capítulo describe una estrategia de síntesis biocatalizada de uridina 5'-monofosfato. En primer lugar se realiza una introducción sobre el tema y se presenta la parte experimental con las metodologías específicas empleadas en esta parte del trabajo. En particular, para la síntesis de uridina 5'-monofosfato, se utilizaron células enteras de *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC 19350 como biocatalizador, dado que existían antecedentes sobre el empleo de varias cepas de dicho género en la síntesis de diversos nucleótidos tanto purínicos como pirimidínicos. Se evaluaron diferentes métodos de cultivo del biocatalizador, distintos materiales de partida así como diversas condiciones experimentales de la biotransformación de manera de optimizar los resultados alcanzados. Se determinó la presencia de UMP lográndose buenos resultados y las mezclas de reacción obtenidas se utilizaron para la síntesis de uridina 5'-difosfato, desarrollada en el Capítulo 5.

En el Capítulo 4 se describe la síntesis de uridina 5'-monofosfato utilizando células enteras de enterobacterias con actividad fosfatasa ácida no-específica. En primer lugar se realiza una introducción sobre el tema y luego se presenta la parte experimental. Posteriormente se describe la selección de microorganismos con actividad NSAP con las

cuales se ensayó, no sólo la síntesis de UMP, sino también de timidina 5'-monofosfato, adenínarabinosido 5'-monofosfato y diversos azúcares fosfato a partir de los correspondientes nucleósidos y azúcares, con buenos resultados. Finalmente, se utilizaron dos microorganismos genéticamente modificados, desarrollados previamente en nuestro laboratorio, para la obtención biocatalizada de los productos de interés, obteniéndose resultados satisfactorios logrando reducir los tiempos de reacción de forma considerable. En particular, las mezclas de reacción obtenidas para la síntesis de UMP se utilizaron para la producción de uridina 5'-difosfato, desarrollada en el Capítulo 5.

En el Capítulo 5 y continuando con el camino multienzimático planteado en los objetivos, se propuso a modo de introducción el uso de *Saccharomyces cerevisiae* como biocatalizador. Este microorganismo es una fuente importante de nucleósido monofosfato quinasas, con lo cual su uso para la obtención de diferentes NDP, resulta de potencial utilidad. Luego de detallar la metodología de trabajo, se desarrollaron los resultados. Los mismos muestran que se logró sintetizar UDP a partir de un extracto de levadura utilizando UMP como sustrato, mediante una metodología sencilla y en condiciones de reacción suaves, logrando buenos rendimientos. Del mismo modo, el sistema biocatalítico se aplicó a la síntesis de otros nucleósidos, desoxinucleósidos y arabinósidos 5'-difosfato con resultados positivos. Posteriormente se evaluaron las variables que podían influir sobre esta reacción al emplear las mezclas provenientes de la síntesis de UMP, desarrolladas en los Capítulos 3 y 4, a partir de sustratos más económicos y mediante reacciones multienzimáticas *one-pot*. Finalmente se acondicionaron las mezclas obtenidas durante el desarrollo de dichos capítulos y se ensayó la síntesis de UDP, lográndose resultados satisfactorios, equivalentes a los obtenidos al utilizar UMP comercial.

En el Capítulo 6 se realizó un *screening* de bacterias, particularmente del género *Escherichia*, que funcionen como biocatalizadores para la síntesis de desoxinucleótidos, en particular de 2'-desoxiuridina 5'-difosfato, mediante una ruta que incluye la enzima ribonucleósido reductasa (RNR), a partir de uridina 5'-difosfato como sustrato. No se lograron resultados positivos ya que no se pudo determinar la presencia de dUDP así como tampoco de dUMP, como subproducto de reacción. Sin embargo, en el momento de

finalización de escritura de esta Tesis, mediante un análisis más fino de los cromatogramas obtenidos, se determinó la presencia de otro posible subproducto de reacción, en este caso desoxiuridina, utilizando *E. coli* ATCC 23513 como biocatalizador. Esto nos incentivó a continuar, próximamente, con un análisis más profundo de esta mezcla para poder determinar la presencia y confirmar la identidad de este compuesto.

En el Capítulo 7 se utilizó una estrategia alternativa para la síntesis de desoxirribonucleósidos respecto a la desarrollada en las secciones anteriores. Para ello, en una primera parte se describen, a modo de introducción, las enzimas involucradas en el camino multienzimático propuesto, así como la posterior exposición de la parte metodológica. Luego se presentan los resultados, describiendo la selección de microorganismos, mediante un *screening* sobre diversos géneros bacterianos, capaces de sintetizar dR5P por acción de la enzima 2-desoxirribosa 5-fosfato aldolasa. En particular, se identificó a *Erwinia carotovora* ATCC 33260 como un biocatalizador novedoso que generó 14.1 mM de DR5P a partir de glucosa como materia prima, sustrato cuyo valor comercial es sustancialmente menor al del *D*-gliceraldehído 3-fosfato, sustrato natural de la enzima. Posteriormente, se acoplaron dos enzimas, una fosfopentomutasa y una nucleósido fosforilasa para la síntesis de desoxinucleósidos pirimidínicos como timidina, 2'-desoxiuridina y 5-bromo-2'-desoxiuridina, utilizando como sustrato de partida dR5P preparada en la primera parte de este capítulo, obteniéndose resultados positivos y cumpliendo así con los objetivos propuestos.

Capítulo 1

Introducción general

1.1. Nucleósidos modificados

1.1.1. Aplicaciones

La importancia de los nucleósidos, nucleótidos y sus análogos radica en la gran cantidad de aplicaciones tanto terapéuticas como diagnósticas. Un ejemplo particular es el uso de dNTPs naturales como sustratos en la técnica de PCR (del inglés, *Polimerase Chain Reaction*), utilizada en biología molecular y diagnóstico.

En el ámbito farmacéutico, los nucleósidos y sus análogos se han utilizado ampliamente en tratamientos contra el cáncer y en terapias antivirales [1, 2]. Estos compuestos pueden ser administrados tanto en forma individual como conjunta, o bien formar parte de oligonucleótidos terapéuticos [3-5].

Los nucleósidos que actúan como agentes antivirales generan la inhibición de la replicación del genoma viral, mientras que aquellos que impiden la replicación y la reparación del ADN de las células cancerígenas funcionan como compuestos anticancerígenos [6]. Estos nucleósidos son fosforilados intracelularmente a sus correspondientes mono, di y trifosfato actuando como inhibidores de polimerasas o como terminadores de cadena en la síntesis de ADN o ARN [7]. En los últimos años se proyectaron una variedad de estrategias para el diseño de drogas efectivas, selectivas y no tóxicas. Las mismas involucran modificaciones de nucleósidos naturales, tanto en la estructura del azúcar [8] como de la base [9, 10].

Los primeros agentes antivirales fueron desarrollados 40 años atrás. Sin embargo, desde que en 1985 se descubrió la actividad anti-VIH (virus de la inmunodeficiencia

humana) del AZT (3'-azido-3'-desoxitimidina) [11], se diseñaron muchos análogos de nucleósidos como drogas antivirales contra herpes, hepatitis, VIH, y citomegalovirus [12-15]. Nucleósidos purínicos como 2',3'-didesoxiinosina (didanosina) [16], 2',3'-didesoxicitidina (zalcitabina), 3'-desoxi-2'-tiacitidina (lamivudina), carbociclo 6-ciclopropilamino-2',3'-dideshidro-2',3'-didesoxiguanosina (abacavir), y pirimidínicos como 3'-azido-3'-desoxitimidina (zidovudina, AZT), 2',3'-dideshidro-3'-desoxitimidina (stavudina) son empleados en tratamientos antivirales [17] (Figura 1).

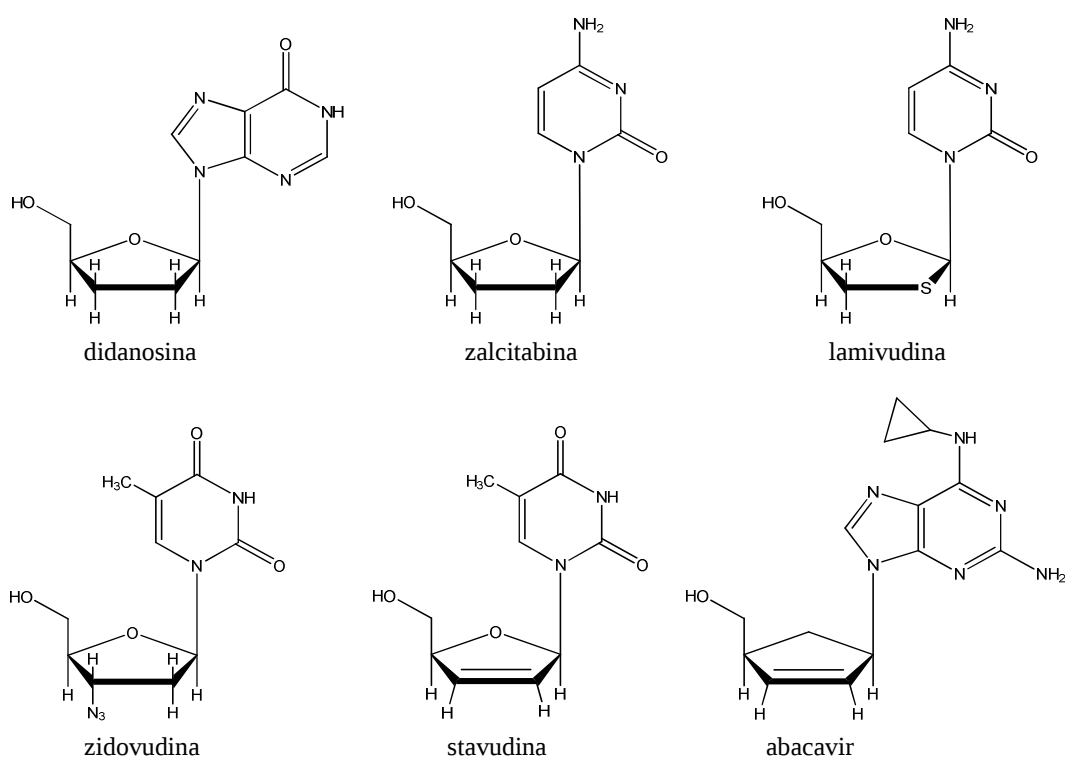


Figura 1: Análogos de nucleósidos utilizados en terapias antivirales.

Las estructuras de los análogos de nucleósidos más importantes utilizados como anticancerígenos, entre los cuales se hallan 2-cloro-2'-desoxiadenosina (cladribina), 2-

fluor-9- β -D-arabinofuranosiladenina (fludarabina), 1- β -D-arabinofuranosilcitosina (citarabina) y 2',2'-difluorodesoxicitidina (gemcitabina), se muestran en la Figura 2.

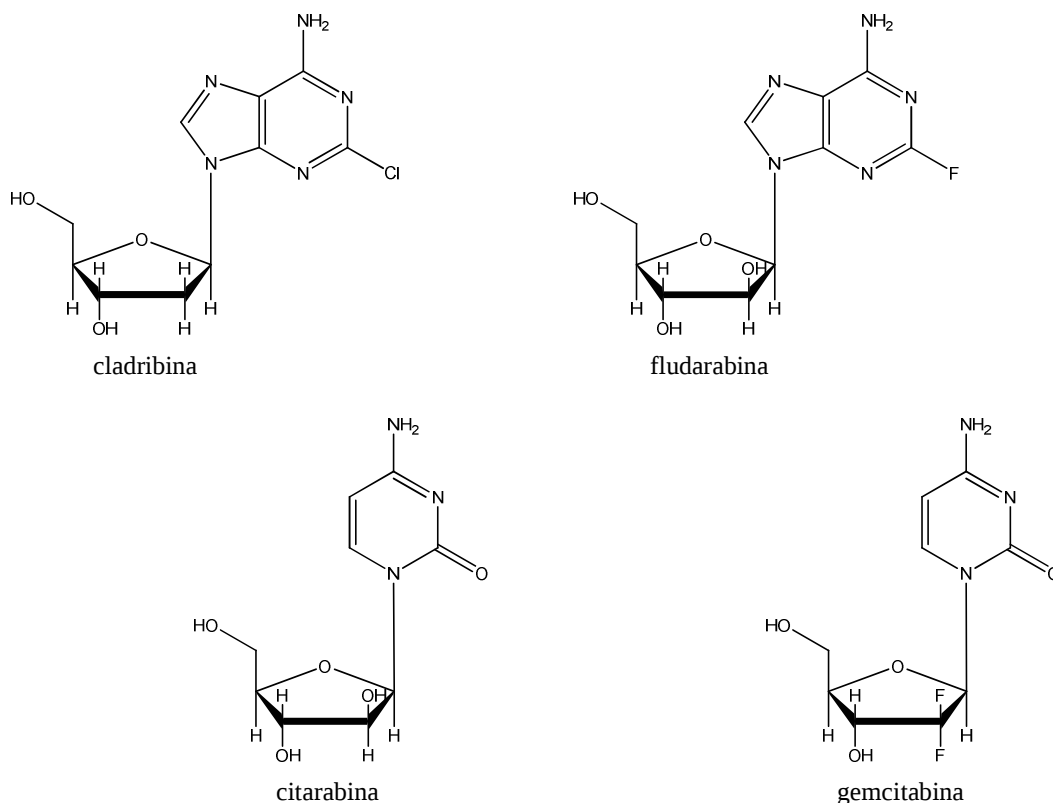


Figura 2: Análogos de nucleósidos utilizados como anticancerígenos más importantes.

La importancia de contar con este tipo y variedad de drogas queda en evidencia para el avance del VIH. Desde que el SIDA fue reconocido en 1981 como epidemia y hasta el año 1999, 34 millones de personas, incluyendo 2,6 millones de niños, han sido infectados, estimándose que 5 millones de adultos y 1,5 millones de niños han muerto [18]. Sin embargo durante la última década los índices mundiales de muerte causada por la enfermedad han disminuido un 24% debido al uso de terapias con agentes antirretrovirales que incluyen derivados de nucleósidos [19]. Sin embargo, una de las principales

desventajas de las terapias que incluyen análogos de nucleósidos son la adquisición de resistencia y los efectos colaterales, como la citotoxicidad no específica [20]. En este marco, existe una constante necesidad de creación de nuevos compuestos que superen en calidad o resuelvan resistencias. Esto puede lograrse mediante modificaciones estructurales de drogas ya conocidas que produzcan un aumento de la eficiencia, de la selectividad, de la biodisponibilidad y/o de la reducción de la toxicidad [21]. En la Tabla 1 se muestran compuestos nucleosídicos de interés farmacológico desarrollados en la última década.

Nucleósido	Bioactividad	Referencia
2,6-diaminopurina dioxolano (amdoxovir)	antiviral (VIH-1)	[22]
viramidina	antiviral	[23]
ribósido de nicotinamida	antitumoral	[24]
3'-C-triflourometil-2',3'-didesoxiadenosina	antiviral (VBH)	[25]
3'-C-etiniluridina	antitumoral	[25]
2'-desoxi-2'-fluorocitidina	antiviral (VCH)	[27]
nucleósidos imidazo(1,2-c-) pirimidina con base modificada	anticitomegalovirus, antileucémico	[28]
azanucleósidos	antiviral	[29, 30]
4'-etinil nucleósidos	antiviral (VIH-1)	[31]

Tabla 1: Nucleósidos desarrollados recientemente aplicados en terapias antivirales y antitumorales.

Los nucleósidos pueden también utilizarse para la síntesis de oligonucleótidos modificados. Un oligonucleótido es una cadena simple de ARN o ADN, que consiste en un reducido número de nucleósidos unidos por puentes fosfodiéster, formados entre grupos 3'-OH de un nucleósido y grupos 5'-OH de otro, al igual que en los ácidos nucleicos naturales. Los avances alcanzados en síntesis de oligonucleótidos han posibilitado el desarrollo de nuevas áreas de investigación en biología molecular y en biología estructural, así como también, la búsqueda de nuevos principios terapéuticos. Sin embargo, el espectro de aplicaciones de los oligonucleótidos puede ser extendido aún más mediante la

introducción de modificaciones químicas en su estructura ya sea a través de moléculas acopladas así como modificaciones en los mismos nucleótidos.

El área en la cual el uso de oligonucleótidos modificados ha sido más prolífico es la estrategia antisentido, en la cual se busca que las modificaciones químicas confieran características apropiadas tales como hibridización, resistencia a nucleasas, penetración a las células, selectividad y adecuadas propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas. En 1978, *Zamenick & Stephenson* [32] ilustraron por primera vez la idea de esta estrategia. El principio involucrado en el enfoque antisentido es simple (Figura 3). El objetivo es sintetizar oligonucleótidos con una secuencia de bases complementaria a un segmento del ARNm que da origen a la proteína cuya producción se quiere inhibir. Este fragmento sintético reconoce y se aparea con esa secuencia blanco y produce la inhibición de la expresión génica.

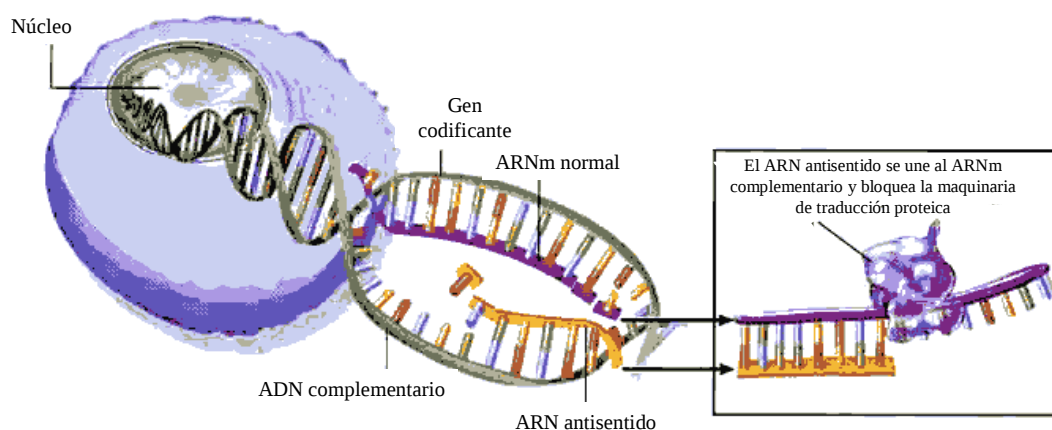


Figura 3: Funcionamiento de las moléculas antisentido.

Si la proteína inhibida es una proteína esencial para el desarrollo de un proceso patológico, entonces los oligonucleótidos se convierten en fármacos altamente específicos.

Este efecto, es decir, el ataque de una enfermedad a nivel genético, es la base de la terapia génica.

Otro tipo de estrategia antisentido es el uso de ribozimas. Éstas son moléculas de ARN con actividad catalítica. Su descubrimiento, a principios de los años ochenta, propició la identificación de las primeras moléculas de naturaleza no proteica capaces de catalizar reacciones en el interior celular. Desde ese momento se han identificado numerosos motivos de ARN con actividad catalítica que participan en distintos procesos biológicos. La gran mayoría de las ribozimas naturales identificadas hasta la fecha catalizan el corte y/o ligación del esqueleto fosfodiéster de otras moléculas de ARN. Sin embargo, a diferencia del resto de las ribonucleasas conocidas y de naturaleza proteica, las ribozimas muestran una gran especificidad de secuencia, determinada por interacciones ARN-ARN (tipo Watson-Crick) entre la ribozima y su sustrato. De esta manera, las ribozimas se pueden considerar como un tipo especial de ARN antisentido y, al igual que para éstos, se ha pensado en la posibilidad de alterar la especificidad de las mismas mediante la introducción de simples cambios de secuencia en su dominio de reconocimiento del ARN sustrato y en consecuencia, dirigir las frente a distintos ARNs como inactivadores específicos de la expresión génica [33].

De esta forma, se considera que los ARNs antisentido en general y las ribozimas en particular, son buenos candidatos para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas, útiles para el tratamiento de enfermedades contra las cuales, hoy en día, no se cuenta con una terapia eficaz, incluyendo enfermedades tanto de origen viral como genético.

Si bien los progresos en esta área son evidentes, queda un largo camino en investigación en cuanto a vectores de administración, desarrollo de nuevos análogos, respuesta inmune, farmacodinámica de los oligonucleótidos y sobre el modo de aplicación de los modelos de laboratorio a estudios clínicos.

1.2. Biotransformaciones

Durante los últimos años se han tratado de aplicar procesos alternativos a la síntesis química tradicional que implican el uso de catalizadores biológicos, que pueden ser enzimas o células enteras, libres o inmovilizadas. Estos biocatalizadores presentan ventajas en cuanto a su alta eficiencia, altos rendimientos y pocos subproductos generados, especialmente a causa de su alta estereo, regio y quimioselectividad [34]. Adicionalmente, el uso de biocatalizadores implica reacciones “limpias” que contribuyen a la baja contaminación ambiental, ya que se utilizan condiciones suaves, no corrosivas y no tóxicas, permitiendo la utilización de reactores simples y respetando los principios de la “química verde” y del “desarrollo sustentable”, lo que ha facilitado su aceptación mundial como actividad industrial [35].

Las transformaciones biotecnológicas incluyen un amplio rango de procesos, los cuales pueden ordenarse de acuerdo al número de etapas que poseen y a la complejidad de los sustratos que emplean. De esta forma, pueden reconocerse distintas áreas, como las fermentaciones, las biotransformaciones y la catálisis enzimática (Tabla 2). Los límites entre las mismas no se hallan claramente definidos. Por ello, tanto las biotransformaciones como la catálisis enzimática frecuentemente son referidas bajo el término “biocatálisis”. En consecuencia, puede entenderse como proceso biocatalizado o biotransformación al conjunto de etapas en las cuales se emplean sistemas biológicos para llevar a cabo cambios químicos sobre sustratos naturales o no naturales [35].

Las biotransformaciones representan una alternativa a los problemas encontrados en la síntesis química [36]. Las mismas se conocen desde los tiempos de Pasteur, pero la primera transformación microbiana de importancia industrial se realizó en la década del ‘50 para la obtención de esteroides modificados. Desde esa época, se han logrado importantes avances tecnológicos para reemplazar procesos químicos clásicos por transformaciones biocatalizadas.

Área	Tipo de sustrato	Tipo de biocatalizador	Tipo de producto/s
Fermentaciones	materiales crudos	células enteras en crecimiento	múltiples productos
	precursores definidos	células enteras en crecimiento	productos complejos
Biotransformaciones	precursores definidos	células enteras en reposo o enzimas aisladas	productos definidos
Catálisis enzimática	sustrato definido	extractos enzimáticos crudos o parcialmente purificados	productos definidos
	sustrato definido	enzimas puras	productos definidos

Tabla 2: Características de las distintas áreas dentro de las transformaciones biotecnológicas.

En un proceso sintético catalizado por enzimas pueden emplearse tanto células enteras como enzimas aisladas. La síntesis catalizada por enzimas suele ser mucho más simple y más rápida que la llevada a cabo por métodos químicos y tiene la ventaja de transcurrir con alta regio y estereoselectividad, lo cual simplifica los procesos de separación de los productos de reacción. En consecuencia, se favorece la rentabilidad del proceso de producción disminuyendo drásticamente el impacto ambiental.

A diferencia de lo que ocurre con las fermentaciones, las biotransformaciones no dependen del estado metabólico de las células. De hecho, es frecuente utilizarlas en estado de reposo o *resting*. Además, las reacciones son sencillas y se llevan a cabo en un período corto de tiempo. Si bien los sustratos que se emplean en las biotransformaciones pueden ser costosos, el aislamiento del producto es simple y su concentración al finalizar el proceso es alta. En las fermentaciones ocurre todo lo contrario.

1.2.1. Biotransformaciones con enzimas aisladas. Ventajas e inconvenientes

Las enzimas son ampliamente utilizadas en biotransformaciones, no sólo en pequeña escala sino también a nivel industrial ya que muchas son capaces de aceptar sustratos muy distintos de los naturales, condición conocida como “promiscuidad enzimática” [37].

El uso de enzimas aisladas tiene como ventaja que pueden desarrollarse procesos altamente eficientes y selectivos, así como eliminar reacciones competitivas catalizadas por otras enzimas de sistemas multienzimáticos. Por otra parte el aislamiento de los productos de biotransformación suele ser sencillo, en particular si se trabaja con enzimas inmovilizadas. Además pueden emplearse en reactores más pequeños que los utilizados en fermentaciones y la posibilidad de reutilizar el biocatalizador permite diseñar procesos continuos con una mejora de su productividad y eficiencia.

Las desventajas más significativas del uso de enzimas aisladas son la necesidad que existe, en ciertos casos, de incorporar cofactores al sistema y regenerarlos, así como el elevado costo de las enzimas y de los cofactores. Asimismo, ocasionalmente los parámetros operacionales estrechos de las enzimas suelen resultar perjudiciales, ya que un pequeño desvío de las condiciones óptimas de reacción podría conducir a la desnaturalización y desactivación de estos biocatalizadores debido a la ausencia del “entorno celular protector”. Además, debido a que un proceso enzimático se encuentra directamente relacionado con los pasos de producción y purificación de la enzima activa, los mismos deben diseñarse de manera tal que permitan obtener enzimas estables, con alto grado de pureza pudiendo reducir los costos de producción lo cual, generalmente, no resulta una tarea sencilla. Por último, deben considerarse los inconvenientes que pueden surgir al utilizar enzimas que requieren cofactores o coenzimas [38].

En los últimos 20 años, la tecnología del ADN recombinante ha contribuido a incrementar la eficiencia de producción de las enzimas, a aumentar su pureza y a disminuir su costo. En consecuencia, el número de enzimas disponibles comercialmente se encuentra en constante aumento [39]. Además, la introducción de mutaciones dirigidas o al azar sobre enzimas ha dado lugar a novedosos biocatalizadores [35].

1.2.2. Biotransformaciones con células enteras. Ventajas y desventajas.

El hombre ha utilizado células de microorganismos para obtener bienes y generar servicios desde hace más de 8000 años, cuando se emplearon levaduras para la fabricación de bebidas alcohólicas [40], dando origen a la Biotecnología. El empleo de microorganismos en la síntesis de compuestos orgánicos se remonta a más de 100 años atrás [41, 42] y continúa en constante crecimiento.

El uso de células enteras puede resultar ventajoso tanto cuando la disponibilidad y el costo de las enzimas comerciales representan un obstáculo como cuando el aislamiento de las mismas, a partir de sus fuentes naturales, es complicado e ineficiente. A su vez, las células constituyen una fuente inagotable de cofactores y coenzimas, confiriéndoles a las enzimas el entorno más adecuado para preservar su estabilidad y su actividad, además de presentarse como una forma económicamente rentable de llevar a cabo procesos multienzimáticos. Las virtudes de las células enteras permiten comprender por qué constituyen un tipo de biocatalizador interesante en biotransformaciones desarrolladas para la síntesis de compuestos químicos de alto valor agregado [43].

Los problemas más frecuentes asociados al uso de células enteras como biocatalizadores son las restricciones difusionales del medio y de las barreras estructurales de la célula, la autólisis provocada por sustratos o productos tóxicos y la aparición de subproductos debido a reacciones secundarias.

En la Tabla 3 se señalan las principales ventajas y desventajas del empleo de enzimas aisladas y de células enteras. Cabe destacar que la decisión final a la hora de optar por utilizar células enteras o enzimas aisladas como biocatalizadores, dependerá de varios factores [38]. Entre ellos se destacan el tipo de transformación que se desee llevar a cabo, la necesidad o no de reciclar cofactores y la escala (mg , g ó kg) a la que se desarrollará el proceso.

Biocatalizador	Forma	Ventajas	Desventajas
enzima aislada	cualquiera	equipamiento simple, mejor productividad debido a la tolerancia a concentraciones altas de sustratos	se necesita regenerar cofactores
	disuelta en agua	actividad enzimática alta	posibles reacciones secundarias, insolubilidad de sustratos lipofílicos
	suspendida en solventes orgánicos	fácil de realizar, solubilidad de sustratos lipofílicos, recuperación sencilla de la enzima	actividad enzimática baja
células enteras	cualquiera	no se necesita regenerar cofactores	equipamiento costoso, mayor volumen de reacción, baja productividad, baja tolerancia a solventes orgánicos, reacciones secundarias
	en crecimiento	actividades elevadas	elevada biomasa, mayor cantidad de productos secundarios, proceso difícil de controlar
	en reposo	trabajo sencillo, menor cantidad de productos secundarios	actividades menores

Tabla 3: Ventajas y desventajas del empleo de enzimas aisladas y células enteras como biocatalizadores.

1.3. Búsqueda de nuevos biocatalizadores

Si bien los orígenes de los biocatalizadores son muy diversos, los microorganismos constituyen una fuente muy rica y, ya sea en su uso como células enteras así como enzimas aisladas, son los más citados en bibliografía. Las enzimas microbianas reemplazaron a las de otros orígenes desde los '60 y representan prácticamente el 90% del mercado en Sudamérica [44]. Entre los microorganismos de mayor importancia industrial se hallan bacterias de los géneros *Bacillus*, *Lactobacillus* y *Pseudomonas*, levaduras como *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* y *Candida* y hongos de las clases *Ascomycota* y *Zygomycota*. Estas especies han sido clasificadas como GRAS¹ (del inglés, *Generally Recognized as Safe*) de tipo I o II en la escala de bioseguridad y, debido a que se las consideran inocuas, su manipulación no requiere instrumentación especial.

¹ <<http://www.accessdata.fda.gov/script/fcn/fcnNavigation.cfm?rpt=grasListing>>

En los últimos años, el uso industrial de enzimas se ha extendido rápidamente [45]; sin embargo, dado que muchas veces los sustratos utilizados no son productos naturales, las enzimas adecuadas para llevar a cabo procesos que involucran dichos compuestos, aún no se conocen. Por lo tanto, uno de los mayores desafíos al momento de comenzar con un desarrollo comercial biocatalizado es contar con el biocatalizador apropiado. alguna de las cuestiones que pueden conducir a la necesidad de contar con nuevos biocatalizadores es, por ejemplo, la inestabilidad de las células o de las enzimas en presencia de solventes orgánicos o bien la diferencia en especificidad del biocatalizador por dos sustratos estructuralmente muy similares. Este hecho fue mostrado por *Medici et al.* [46], donde se obtuvo el 2,6-diaminopurín ribósido, con excelentes rendimientos, mediante una reacción de transglicosidación microbiana catalizada por nucleósido fosforilasas de *Aeromonas hydrophila*, a partir de uridina y 2,6-diaminopurina. Sin embargo, la misma reacción llevada cabo con adenina (6-aminopurina) no produce adenosina, supuesto sustrato natural de la enzima [47]. De hecho, estos obstáculos pueden ser lo suficientemente significantes como para convertir a un proceso muy atractivo en poco rentable e impedir su escalado.

Pueden encontrarse una amplia variedad de técnicas que permiten obtener nuevas actividades. Entre ellas se destacan (i) la búsqueda o *screening*, de nuevas actividades en diferentes ambientes como suelos, áreas contaminadas, etc. [48]; (ii) la utilización de condiciones de reacción no convencionales y la alteración del medio de reacción por inclusión de efectores, tales como iones metálicos [49, 50]; (iii) la aplicación de técnicas de ingeniería genética, como la ingeniería de proteínas y la evolución dirigida² [51, 52].

En general, los microorganismos ofrecen una solución práctica al desafío de buscar nuevas actividades, dado que su crecimiento es muy rápido y su mantenimiento es sencillo. Si bien las técnicas desarrolladas por la Ingeniería Genética permiten incrementar la estabilidad de una enzima determinada y ajustar su actividad a las necesidades que

² Entiéndase por evolución dirigida o evolución *in vitro* de proteínas al proceso por el cual se acelera la evolución natural en condiciones de laboratorio para seleccionar la proteína con la actividad de interés. Para ello, se genera diversidad de la secuencia de ADN que codifica la proteína en cuestión a través de una etapa de mutagénesis y luego la misma se clona y se expresa en células huésped. A continuación, se seleccionan los organismos que poseen la secuencia codificante de la enzima funcional. Por último, dichas secuencias son amplificadas y los ciclos de mutagénesis, selección y amplificación se repiten hasta que la proteína que posea la propiedad o función deseada sea encontrada.

demanda el proceso de transformación, la principal herramienta de búsqueda de nuevas actividades continua siendo el tradicional *screening* [35].

1.3.1. Selección y *screenings* consecutivos estructurados de modo jerárquico

Cuando se desea evaluar un número elevado de muestras con el objetivo de encontrar un biocatalizador adecuado para una determinada biotransformación, una de las primeras decisiones que debe tomarse es si se utilizará una selección o un *screening*.

Los métodos de selección consisten en favorecer el crecimiento de células que contengan una actividad particular [53, 54]. Los criterios de selección, como temperatura y pH, varían de acuerdo a las propiedades de la enzima. Los métodos involucrados son cualitativos y rápidos y deben permitir el análisis simultáneo de gran cantidad de muestras. Una selección eficiente puede resultar en un primer paso de un posterior *screening* [52]. La selección inicial permite seleccionar un grupo de microorganismos positivos, cuya evaluación continúa en la siguiente etapa. En la actualidad, el establecimiento previo de bibliotecas de microorganismos puede facilitar significativamente el proceso de *screening*. De esta forma, puede evaluarse en forma simple la capacidad de los microorganismos de producir un compuesto de interés a partir de los sustratos adecuados.

Por su parte, el *screening* requiere que cada muestra se analice por separado conduciendo a resultados cuantitativos. Los ensayos generalmente se realizan en microplacas con reacciones de detección rápidas basadas en sustratos cromogénicos o fluorogénicos, o emplear métodos cromatográficos para su separación y detección como cromatografía gaseosa (CG) o cromatografía líquida de alta performance (CLAP o en inglés, *HPLC*), los cuales pueden realizarse en forma automatizada. Los ensayos más lentos, costosos o complicados se llevan a cabo en la etapa final del proceso global de búsqueda para reducir la duración y el número de pruebas.

Los *screenings* consecutivos estructurados de modo jerárquico son rápidos, útiles y muy efectivos. En un proceso modelo de tres fases, el *screening* primario o general permite

eliminar un gran número de candidatos negativos mediante ensayos rápidos y simples, lo que se traduce en una drástica reducción del tamaño de la población a estudiar. Resulta importante destacar que en esta etapa se utilizan sustratos análogos económicos que reemplacen compuestos específicos pero costosos, lo cual puede eliminar potenciales individuos positivos. Esta primera fase puede sustituirse por un paso de selección. Luego, a través del *screening* secundario o intermedio, se seleccionan candidatos más adecuados empleando sustratos más específicos permitiendo un análisis semicuantitativo. Finalmente, una vez que la población de individuos se ha reducido a unos pocos candidatos, el *screening* terciario o específico permite identificar los biocatalizadores más apropiados mediante el uso del mayor número posible de sustratos específicos. Esta es una etapa más cuidadosa y cuantitativa que involucra generalmente métodos cromatográficos o espectrofotométricos.

Por lo tanto, para que un *screening* resulte satisfactorio, los biocatalizadores microbianos deben cumplir con una serie de requerimientos:

- a. deben producir la enzima deseada con un rendimiento aceptable y en un período de tiempo razonable.
- b. deben producir la enzima a partir de nutrientes económicos y accesibles.
- c. Deben ser fácilmente separable del medio de crecimiento, especialmente en el caso que se busque aislar la enzima responsable de su actividad.
- d. deben ser no patógenos, genéticamente estables y no deben producir compuestos indeseables ni tóxicos.

1.4. Preparación de nucleósidos

1.4.1. Síntesis química

Tradicionalmente, los nucleósidos y sus derivados se preparan por métodos químicos los cuales, en general, involucran procesos largos, dificultosos e ineficientes [55-58]. Estos métodos utilizan reactivos tóxicos y reacciones de protección de la base o del

azúcar, obteniéndose una variedad de subproductos difíciles de separar. De este modo se generan además graves problemas ambientales [59].

La ruta de síntesis más frecuente implica el acoplamiento de la nucleobase, o sus derivados, a la estructura del carbohidrato. Usualmente se requiere tanto la activación del grupo glicosídico y la presencia de grupos protectores en la base heterocíclica, así como el control de la configuración anomérica, especialmente cuando se desean preparar desoxirribósidos y arabinósidos. Además, se debe verificar la formación regioselectiva de la unión glicosídica cuando otros grupos nucleofílicos se hallan presentes en las bases heterocíclicas [60]. Estas dificultades inciden drásticamente en el costo de producción, lo que se traduce en un alto precio de venta.

1.4.2. Síntesis enzimática

En las últimas décadas la síntesis enzimática de nucleósidos y nucleótidos, tanto naturales como modificados, se ha presentado como una alternativa interesante debido a que las reacciones ocurren con elevada regio y estereoselectividad [61].

Un grupo de enzimas ampliamente utilizado en la obtención biocatalizada de nucleósidos son las nucleósido fosforilasas (NPs, del inglés *nucleoside phosphorylases*), las cuales catalizan una reacción de fosforólisis sobre nucleósidos [62]. Las NPs son transferasas que catalizan la ruptura del enlace *N*-glicosídico de ribo y desoxirribonucleósidos, en presencia de fosfato inorgánico, para generar ribosa 1-fosfato o desoxirribosa 1-fosfato, respectivamente. El uso combinado de dos tipos de NPs, las pirimidín nucleósido fosforilasas (PyNPs) y las purín nucleósido fosforilasas (PNPs), es un proceso que se conoce como transglicosidación enzimática, el cual se detallará en el Capítulo 7 de este trabajo, y permite obtener nucleósidos purínicos a partir de pirimidínicos de forma eficiente (Figura 4). El uso de microorganismos que contengan estas enzimas, metodología ampliamente utilizada en nuestro grupo de investigación [10, 46, 47], se presenta como una importante ventaja dado que las mismas no deben ser purificadas.

Asimismo, el uso de estas enzimas de forma inmovilizada genera biocatalizadores eficientes, con alta actividad específica y estabilidad térmica permitiendo un alto número de ciclos de reusos [63].

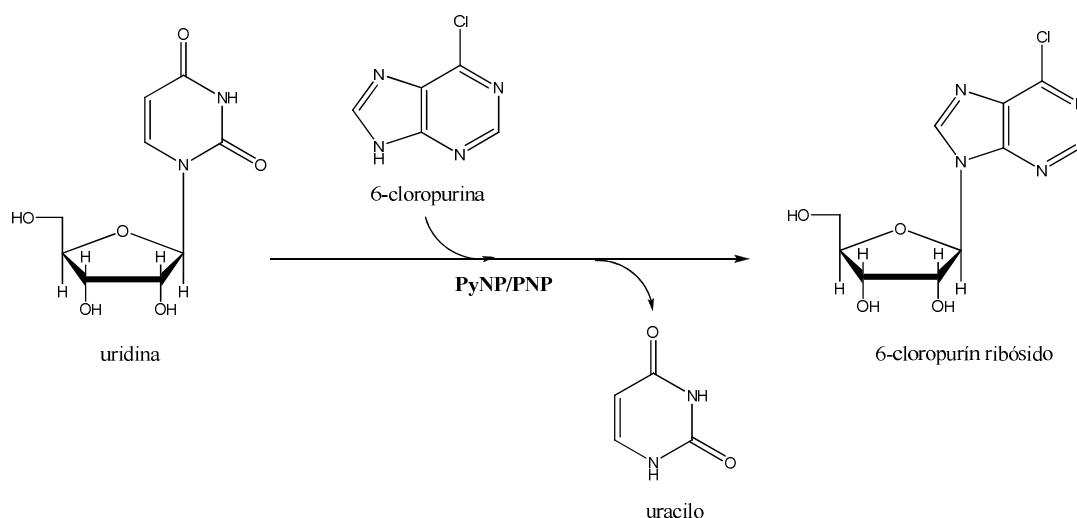


Figura 4: Síntesis de nucleósidos purínicos a partir de nucleósidos pirimidínicos (transglicosidación). En el esquema se ejemplifica utilizando uridina y 6-cloropurina como sustratos para la obtención del correspondiente nucleósido, utilizando células enteras que contienen NPs [10].

Otra metodología que permite obtener nucleósidos implica el uso de otro tipo de enzimas, las isomerasas. Empleando una fosfopentomutasa (PPM), conjuntamente con una NP, a partir de un azúcar, como la desoxirribosa 5-fosfato, puede obtenerse su isómero 1-fosfato, sustrato de las NPs (Figura 5). Así, mediante el agregado de una base purínica (o pirimidínica) y la NP adecuada se obtiene el nucleósido de interés [64].

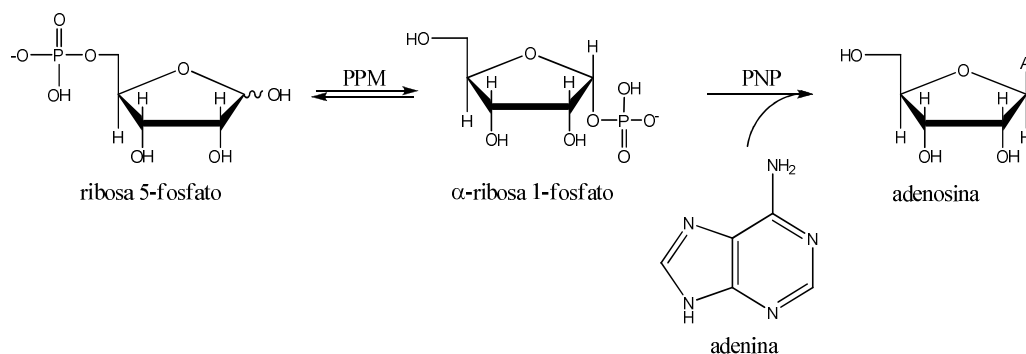


Figura 5: Síntesis de adenosina mediante el uso conjunto de PPM y PNP [64].

PNP: purín nucleosido fosforilasa; PPM: fosfopentomutasa; A: adenina..

Por otra parte, los nucleótidos suelen obtenerse por fosforilación de los correspondientes nucleósidos mediante el uso de quinasas, las cuales son específicas para la síntesis de los nucleósido 5'-monofosfato [65] e inespecíficas para la obtención de nucleósidos 5'-difosfato (Figura 6). Estas enzimas requieren ATP como dador de fosfato, lo cual genera procesos de alto costo. Sin embargo en los últimos años se ha implementado el uso de levaduras, tales como *Saccharomyces cerevisiae*, para la síntesis de ATP lo cual podría generar procesos más rentables [66].

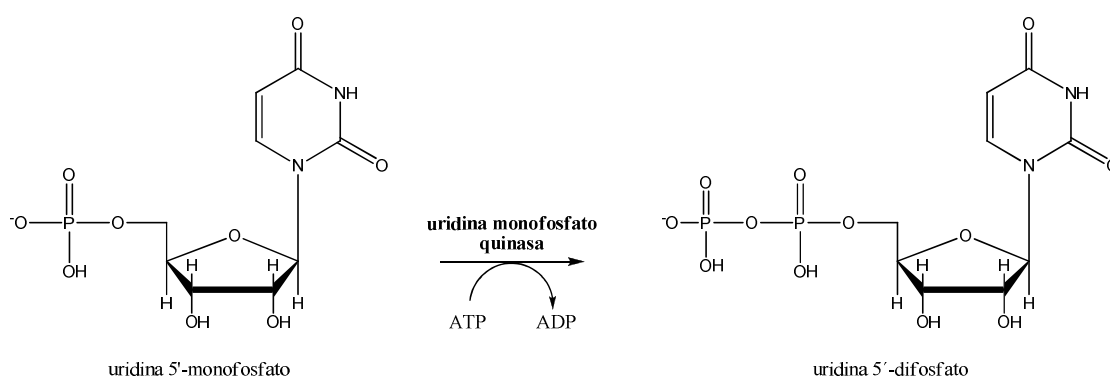


Figura 6: Síntesis de uridina 5'-difosfato a partir del correspondiente monofosfato, utilizando la enzima uridina monofosfato quinasa [67].

Estas y otras metodologías, que utilizan células enteras así como enzimas aisladas, fueron utilizadas para alcanzar los objetivos propuestos en esta Tesis Doctoral.

Bibliografía

- [1] Balfour, H. H. Jr. (1999). Antiviral drugs. *N. Engl. J. Med.*, **340**, 1255-1268.
- [2] Perigaud, C.; Gosselin, G.; Imbach, J. L. (1992). Nucleosides Analogues as chemotherapeutic Agents: A Review. *Nucleosides Nucleotides*, **11**, 903-945.
- [3] Kagiya, S.; Kagiya, T.; Phillips, M. I. (2001). Antisense oligonucleotides strategy in the treatment of hypertension. *Curr. Opin. Mol. Ther.*, 2001, **3**, 258-264.
- [4] Iribarren, A. M.; Sproat, B. S.; Neuner, P.; Sulston, I.; Ryder, U.; Lamond, A. I. (1990). 2'-O-alkyl oligoribonucleotides as antisense probes. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1990, **87**, 7747-7751.
- [5] Rosenbohm, C.; Pederson, D. S.; Frieden, M.; Jensen, F. R.; Arent, S.; Larsen, S.; Koch, T. (2004). LNA guanine and 2,6-diaminopurine. Synthesis, characterization and hybridization properties of LNA 2,6-diaminopurine containing oligonucleotides. *Bioorg. Med. Chem.*, 2004, **12**, 2385-2396.
- [6] Van Rompay, A. R.; Johansson, M.; Karlsson, A. (2003). Substrate specificity and phosphorylation of antiviral and anticancer nucleoside analogues by human deoxyribonucleoside kinases and ribonucleoside kinases. *Pharmacol. Ther.*, **100**, 119-139.
- [7] Holy, A. (2001). Antiviral agents in 2000-and then what next? *Cas. Lek. Cesk.*, **140**, 583-591.
- [8] De Clercq, E. (2002). Highlights in the development of new antiviral agents. *Mini. Rev. Med. Chem.*, 2, 163-175.
- [9] Hori, N.; Uehara, K.; Mikami, Y. (1992). Enzymatic synthesis of 5-methyluridine from adenosine and thymine with high efficiency. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 580-582.
- [10] Trelles, J. A.; Valino, A. L.; Runza, V.; Lewkowicz, E. S.; Iribarren, A. M. (2005). Screening of catalytically active microorganisms for the synthesis of 6-modified purine nucleosides. *Biotechnol. Lett.*, **27**, 759-763.
- [11] Herdewijn, P.; De Clercq, E. (1990). Design of Anti-AIDS Drugs. In: De Clercq, E. (ed). *Pharmacochemistry Library*, Elsevier, **14**, 141-174.
- [12] Zoulim, F. (2004). Mechanism of viral persistence and resistance to nucleoside and nucleotide analogs in chronic Hepatitis B virus infection. *Antiviral Res.*, **64**, 1-15.
- [13] Brady, R. C.; Bernstein, D. I. (2004). Treatment of herpes simplex virus infections. *Antiviral Res.*, **61**, 73-81.
- [14] Tan, S.-L.; He, Y.; Huan, Y. and Gale, M. Jr. (2004). Strategies for hepatitis C therapeutic intervention: now and next. *Current. Opin. Pharmacol.*, **4**, 465-470.

- [15] Tan, X. L.; Chu, C. K.; Boudinot, F. D. (1999). Development and optimization of anti-HIV nucleoside analogs and prodrugs: A review of their cellular pharmacology, structureactivity relationships and pharmacokinetics. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **39**, 117-151.
- [16] Shirae, H.; Kobayashi, K.; Shiragami, H.; Irie, Y.; Yokozeki, K. (1989). Production of 2',3'-dideoxyadenosine and 2',3'-dideoxyinosine from 2',3'-dideoxyuridine and the corresponding purine bases by resting cells of *Escherichia coli* AJ 2595. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 419-424.
- [17] De Clerq, E. (2002). Highlights in the development of new antiviral agents. *Mini Rev. Med. Chem.*, **2**, 163-175.
- [18] OMS, UNAIDS, Report on the global HIV/AIDS epidemic-1999. (www.who.int).
- [19] ONUSIDA, Global Report, UNAIDS Report on the global AIDS epidemic-2012. (http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2012/gr2012/2012_1120_UNAIDS_Global_Report_2012_en.pdf)
- [20] Balint, G. A. (2001). Antiretroviral therapeutic possibilities for human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome. *Pharmacol. Ther.*, **89**, 17-27.
- [21] De Clerq, E. (2002). New developments in anti-HIV chemotherapy. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1587**, 258-275.
- [22] Margolis, D. M.; Mukherjee, A. L.; Fletcher, C. V.; Hogg, E.; Ogata-Arakaki, D.; Petersen, T.; Rusin, D.; Martinez, A.; Mellors, J. W. (2007). The use of beta-d-2,6-diaminopurine dioxolane with or without mycophenolate mofetil in drug-resistant HIV infection. *AIDS*, **21**, 2025-2032.
- [23] Wu, J. Z.; Larson, G. and Hong, Z. (2004). Dual-action mechanism of viramidine functioning as a prodrug and as a catabolic inhibitor for ribavirin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **48**, 4006-4008.
- [24] Franchetti, P.; Pasqualini, M.; Petrelli, R.; Ricciutelli, M.; Vita, P.; Cappellacci, L. (2004). Stereoselective synthesis of nicotinamide beta-ribose and nucleoside analogs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **14**, 4655-4658.
- [25] Jeannot, F.; Gosselin, G.; Standring, D.; Bryant, M.; Sommadossi, J-P.; Loi, A. G.; La Colla, P.; Mathé, C. (2002). Synthesis and studies of 3'-C-trifluoromethyl nucleoside analogues bearing adenine or cytosine as the base. *Bioorg. Med. Chem.*, **10**, 3153-3161.
- [26] Hrdlicka, P. J.; Andersen, N. K.; Jepsen, J. S.; Hansen, F. G.; Haselmann, K. F.; Nielsen, C.; Wengel, J. (2005). Synthesis and biological evaluation of branched and conformationally restricted analogs of the anticancer compounds 3'-C-ethynyluridine (EUrd) and 3'-C-ethynylcytidine (ECyd). *Bioorg. Med. Chem.*, **13**, 2597-2621.

- [27] Shi, J.; Du, J.; Ma, T.; Pankicwicz, K. W.; Patterson, S. E.; Tharnish, P. M.; Mc Brayer, T. R.; Stuyver, L. J.; Otto, M. J.; Chu, C. K.; Schianazi, R. F.; Watanabe, K. A. (2005). Synthesis and anti-viral activity of a series of *D*- and *L*-2'-deoxy-2'-fluororibonucleosides in the subgenomic HCV replicon system. *Bioorg. Med. Chem.*, **13**, 1641-1652.
- [28] Kifli, N.; De Clercq, E.; Balzarini, J.; Simons, C. (2004). Novel imidazo[1,2-*c*]pyrimidine base-modified nucleosides: synthesis and antiviral evaluation. *Bioorg. Med. Chem.*, **12**, 4245-4252.
- [29] Qiup, X-L.; Qing, F-L. (2005). Synthesis of 2',3'-dideoxy-2'-monofluoromethyl azanucleosides. *Bioorg. Med. Chem.*, **13**, 277-283.
- [30] Koszytkowska-Stawińska, M.; De Clercq, E.; Balzarini, J. (2009). Synthesis and antiviral activity evaluation of acyclic 2'-azanucleosides bearing a phosphonomethoxy function in the side chain. *Bioorg. Med. Chem.*, **17**, 3756-3762.
- [31] Summerer, D.; Marx, A. (2005). 4'-C-ethynyl-thymidine acts as a chain terminator during DNA-synthesis catalyzed by HIV-1 reverse transcriptase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **15**, 869-871.
- [32] Zamenick, P. C.; Stephenson, M. L. (1978). Inhibition of Rous Sarcoma virus replication and transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **75**, 280-284.
- [33] Gallo, M.; Kretschmer-Kazemi Far, R.; Scazakiel, G.; Iribarren, A. M. (2005). Activity and Stability of Hammerhead Ribozymes Containing 2'-*C*-Methyluridine: a New RNA Mimic. *Chem. & Biodiv.*, **2**, 198-204.
- [34] Nature insight: Biocatalysis, Synthesis methods that exploit enzymatic activities. (2001). *Nature*, **409**, 225-260.
- [35] Brakmann, S. and Schwienhorst, A. (2004). "Evolutionary Methods in Biotechnology: Clever Tricks for Directed Evolution." Brakmann, S. and Schwienhorst, A. (Eds.). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- [36] Lewkowicz, E. (2011). "Biocatalizadores, del Laboratorio a la Industria." Lewkowicz, E. (Compiladora), Universidad Nacional de Quilmes (Ed.), Bernal, Argentina.
- [37] Khersonsky, O.; Tawfik, D. S. (2010). Enzyme promiscuity: a mechanistic and evolutionary perspective. *Annu. Rev. Biochem.*, **79**, 471-505.
- [38] Faber, K. (1997). "Biotransformations in Organic Chemistry: A Textbook." 3rd Ed., Faber, K. (Ed). Springer-Verlag Publ., Berlín, Alemania.
- [39] Baneyx, F. (1999). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **10**, 411-421.
- [40] Prentis, S. (1993). "Biotecnología, una nueva revolución industrial." Salvat (Eds. S.A). Barcelona, España.

- [41] Neidleman, S. G. (1990). The Archeology of Enzimology. In: Abramowicz, D. Biocatalysis. Van Nostrand Reinhold, New York.
- [42] Roberts, S. M.; Turner, N. J.; Willets, A. J.; Turner, M. K. (1995). Introduction to Biocatalysis using Enzymes and Microorganisms. *Cambridge University Press*, 1-33.
- [43] Straathof, A. J. J.; Panke, S.; Schmid, A. (2002). The production of fine chemicals by biotransformations. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **13**, 548-556.
- [44] Illanes, A. (2008). Enzyme Production. Enzyme Biocatalysis. *Springer Science and Business Media V.B.*, Brazil, 57-106.
- [45] Schmid, A.; Dordick, J. S.; Hauer, B.; Kiener, A.; Wubbolts, M. and Witholt, B. (2001). Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature*, **409**, 258-268.
- [46] Medici, R.; Lewkowicz, E. S.; Iribarren, A. M. (2006). Microbial síntesis of 2,6-diaminupurine nucleosides. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **39**, 40-44.
- [47] Nóbile, M.; Terrini, M.; Lewkowicz, E. S.; Iribarren, A. M. (2010). *Aeromonas hydrophila* strains as biocatalysts in the trasglycosylation reaction. *Biocatal. Biotransform.*, **28**, 395-402.
- [48] Shimizu, S.; Ogawa, J.; Kataoka, M.; Kobayashi, M. (1997). Screening of novel microbial enzymes for production of biologically an chemically useful compounds. Berlín, S. (Ed.), *New enzymes for organic synthesis*, Heidelberg, 45-87.
- [49] Vijayanthi, T. and Chadha, A. (2008). Asymmetric reduction of aryl imines using *Candida parapsilosis* ATCC 7330. *Tetrahedron: Asymmetry*, **19**, 93-96.
- [50] Kise, H. and Tomiuchi, Y. (1991). Unusual solvent effect on protease activity and effective optical resolution of amino acids by hydrolytic reactions in organic solvents. *Biotechnol. Lett.*, **13**, 317-322.
- [51] Cowan, D.; Meyer, Q.; Stafford, W.; Muyanga, S.; Cameron, R.; Wittwer, P. (2005). Metagenomic gene discovery: Past, present and future. *Trends Biotechnol.*, **23**, 321-329.
- [52] Sean, V. T.; Peter, K.; Donald, H. (2001) Investigating and engineering enzymes by genetic selection. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **40**, 3310-3335.
- [53] Chatterjee, D. K.; Kilbane, J. J.; Chakrabarty, A. M. (1982). Biodegradation of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid in soil by a pure culture of *Pseudomonas capacia*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **44**, 514-516.
- [54] Ruster, S. and Stolz, A. (2007). Isolation and characterization of a nitrile hydrolysis acidotolerant black yeast – *Exophiala oligosperma* R1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **75**, 899-908.
- [55] Townsend, L. B. (1988). "Chemistry of Nucleosides and Nucleotides. Volume 1." Townsend, L. B. (Ed.). Plenum Press, New York.

- [56] Furman, P. A.; Fyfe, J. A.; St. Clair, M. H.; Weinhold, K.; Rideout, J. L.; Freeman, G. A., *et al.* (1986). Phosphorylation of 3'-azido-3'-deoxythymidine and selective interaction of the 5'-triphosphate with human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 8333–8337.
- [57] Ichicawa, E., & Kato, K. (2001). Sugar-Modified Nucleosides in Past 10 Years, A Review. *Curr. Med. Chem.*, **8**, 385–423.
- [58] Moorman, R.; Borchardt, R. T. (1986). Synthesis of methyl 6,7-dideoxy-2,3-O-isopropylidene-*L*-talo- and -*D*-allo-alk-6-ynofuranosides, pp. 38-42. In “Nucleic Acid Chemistry: Improved and New Synthetic Procedures, Methods, and Techniques. Part 3.” Townsend, L. B. and Tipson, R. S. (Eds). John Wiley, New York.
- [59] Townsend, L. B.; Tipson, R. S. (1986). “Nucleic Acid Chemistry”, Part 3- Section 2. Townsend, L. B.; Tipson, R. S. (Eds.). Wiley, New York.
- [60] Woltermann, C. J.; Lapin, Y. A.; Kunnen, K. B.; Tueting, D. R.; Sanchez, I. H. (2004). A stereoselective synthesis of 9-(3-*O*-benzyl-5-*O*-tetrahydropyranyl- β -*D*-arabinofuranosyl)adenine, a potentially useful intermediate for ribonucleoside synthesis. *Tetrahedron*, **60**, 3445-3449.
- [61] Garcia-Junceda, E.; Garcia-Garcia, J. F.; Bastida, A.; Fernandez-Mayoralas, A. (2004). Enzymes in the synthesis of bioactive compounds: the prodigious decades. *Bioorg. Med. Chem.*, **12**, 1817-1834.
- [62] Wong, C. H.; Whitesides, G. M. (1994). “Enzymes in Synthetic Organic Chemistry”, Tetrahedron Organic Chemistry Series. Baldwin, J. E. and Magnus, P. D. (Eds.), vol. 12, 290-295, Pergamon, UK.
- [63] Tonon, G.; Capra, E.; Orsini, G.; Zuffi, G. (2004). Novel immobilized biocatalysts usable for the production of natural nucleosides and modified analogues by enzymatic transglycosylation reactions. US Patent Number 20040142438.
- [64] Taverna-Porro, M.; Bouvier, L. A.; Pereira, C. A.; Montserrat, J. M.; Iribarren, A. M. (2008). Chemoenzymatic preparation of nucleosides from furanoses. *Tetrahedron Lett.*, **49**, 2642–2645.
- [65] Briozzo, P.; Evrin, C.; Meyer, P.; Assairi, L.; Joly, N.; Barzu, Gilles, A-M. (2005). Structure of *Escherichia coli* UMP Kinase Differs from That of Other Nucleoside Monophosphate Kinases and Sheds New Light on Enzyme Regulation. *J. Biol. Chem.*, **280**, 25533-25540.
- [66] Yao, Y.; Xiong, J.; Chen, Y.; Tang, J. and Ying, H. (2011). Enhanced adenosine triphosphate production by *Saccharomyces cerevisiae* using an efficient energy regeneration system. *Korean J. Chem. Eng.*, **28**, 178-183.

[67] Jong, A.; Yeh, Y.; Ma, J. J. (1993). Characteristics, substrate analysis, and intracellular location of *Saccharomyces cerevisiae* UMP Kinase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **304**, 197-204.

Capítulo 2

Objetivos de la Tesis-Fundamentación

2.1. Definición del problema

Los 2'-desoxinucleósidos (dNs) naturales pueden obtenerse de hidrolizados de ADN mediante procesos complejos de aislamiento y purificación o bien mediante síntesis química [1]. Por ser precursores fundamentales, y de gran demanda, para terapias contra el cáncer, de agentes antivirales, de 2-desoxinucleósidos trifosfato (dNTPs) usados para PCR, se requiere de nuevos procesos sintéticos que permitan obtenerlos.

Como ejemplos de desoxinucleósidos empelados en la industria farmacéutica podemos citar a i) análogos de purinas como la cladribina (2-cloro-2'-desoxiadenosina), que es un importante agente citostático de células leucémicas [2] y el 2'-desoxinucleósido de 2,6-diaminopurina, activo contra HIV [3]; ii) análogos de pirimidinas como el AZT (3'-azido-3'-desoxitimidina), agente antitumoral y antiviral [4] (anti-HIV) y la 5-trifluorometil-2'-desoxiuridina, aprobada por la FDA como agente terapéutico contra HSV (Herpes Simplex Virus) [5]. Estos desoxinucleósidos son fosforilados intracelularmente a sus correspondientes mono, di ó trifosfato actuando, de esta manera, como inhibidores de polimerasas o como terminadores de cadena en la síntesis de ADN.

Asimismo, los 2'-desoxinucleósidos naturales se utilizan como materiales de partida para la síntesis de muchos otros nucleósidos modificados. La síntesis química de dNs se realiza a partir de los correspondientes nucleósidos [6] o mediante el acoplamiento de las bases purínicas y pirimidínicas con el desoxiazúcar [7]. En general, estas metodologías involucran procesos de más de 3 pasos, que incluyen la protección y desprotección de la base o del azúcar, y reactivos tóxicos obteniéndose una variedad de subproductos difíciles de separar. Esto conduce a la generación graves problemas ambientales [8-10].

Durante los últimos años se han tratado de aplicar procesos alternativos a la síntesis química tradicional que implican el uso de catalizadores biológicos, que pueden ser enzimas o células enteras, libres o inmovilizadas. Como ya se detalló en el Capítulo 1, estos biocatalizadores presentan ventajas en cuanto a su alta eficiencia, altos rendimientos y pocos subproductos generados, especialmente a causa de su alta estereo, regio y quimioselectividad [11]. Adicionalmente, el uso de biocatalizadores implica reacciones “limpias” que contribuyen a la baja contaminación ambiental, ya que se utilizan condiciones suaves, no corrosivas y no tóxicas, permitiendo la utilización de reactores simples.

2.2. Objetivos

El objetivo general de este trabajo fue desarrollar una metodología de preparación de desoxinucleósidos y desoxinucleótidos a partir de sustratos de amplia disponibilidad y bajo costo, como ribonucleósidos y azúcares, utilizando biotransformaciones con células bacterianas y enzimas, mediante procesos que involucren condiciones compatibles con el medio ambiente.

Para ello se propuso buscar caminos metabólicos que conduzcan a la obtención de dNXP's y dNs. En primer lugar, se encontró que una enzima, la ribonucleótido reductasa (RNR) es capaz de transformar nucleósidos 5'-difosfato en desoxinucleósidos 5'-difosfato [12]. De esta manera se planteó como modelo la síntesis de desoxiuridina 5'-difosfato (dUDP) a partir de uridina 5'-difosfato (UDP), con lo cual se propuso utilizar uridina como material de partida. Como primer paso se encontró que, utilizando células enteras de *Corynebacterium ammoniagenes*, se podía obtener uridina 5'-monofosfato (UMP), a partir de ácido orótico, compuesto de muy bajo valor comercial [13]. Otra metodología para la obtención de UMP involucra otro tipo de enzimas, las fosfatasas ácidas, que presentan actividad fosfotransferasa y se han aplicado a la síntesis de diversos nucleósidos 5'-monofosfato [14, 15]. Para el segundo paso de obtención de UDP, se propuso utilizar quinasas y el UMP sintetizado como sustrato [16]. Posteriormente, se planteó el uso de

RNRs celulares para la síntesis final de dUDP. El camino diseñado se muestra en la Figura 7.

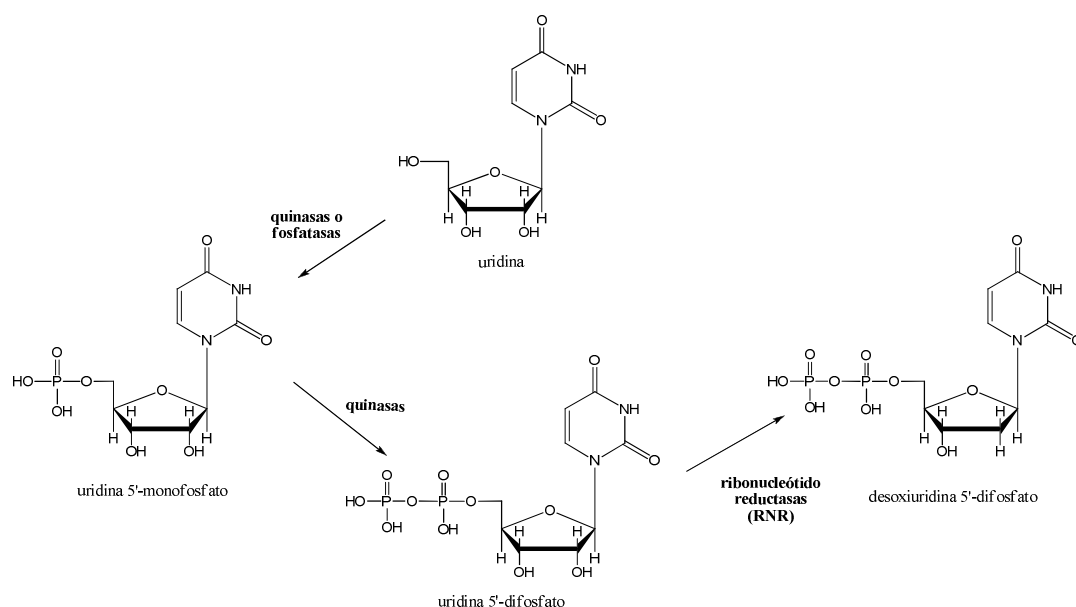


Figura 7: Camino multienzimático modelo para la obtención de desoxirribonucleótidos.

Por otra parte, y haciendo uso de las nucleósido fosforilasas (NPs), pueden formarse desoxinucleósidos a partir de 2-desoxirribosa 1-fosfato (dR1P). Este compuesto presenta alta inestabilidad con lo cual su obtención *in situ*, a partir de su isómero 2-desoxirribosa 5-fosfato (dR5P), resulta de interés. Para su síntesis se propusieron dos caminos alternativos. Uno de ellos involucra el metabolismo glucolítico de microorganismos que contengan la enzima 2-desoxirribosa 5-fosfato aldolasa (DERA) [17]. De esta manera, utilizando glucosa como material de partida se genera, *in situ*, gliceraldehído 3-fosfato (G3P), sustrato natural de DERA y, mediante el agregado de acetaldehído, se obtiene dR5P por acción de dicha enzima. Otra metodología comprende el uso de microorganismos que contengan fosfatasa ácida no específicas (NSAPs, del inglés *bacterial nonspecific acid phosphatases*) [15]. Los sustratos requeridos para la obtención de dR5P son desoxirribosa y pirofosfato de sodio, dos compuestos de bajo costo comercial. Luego, en un paso posterior, se utiliza la enzima fosfopentomutasa (PPM, del inglés *phosphopentomutase*), isomerasa que genera dR1P a

partir de dR5P, una NP y una base para obtener finalmente el desoxinucleósido de interés [18]. Estos caminos enzimáticos se muestran en la Figura 8.

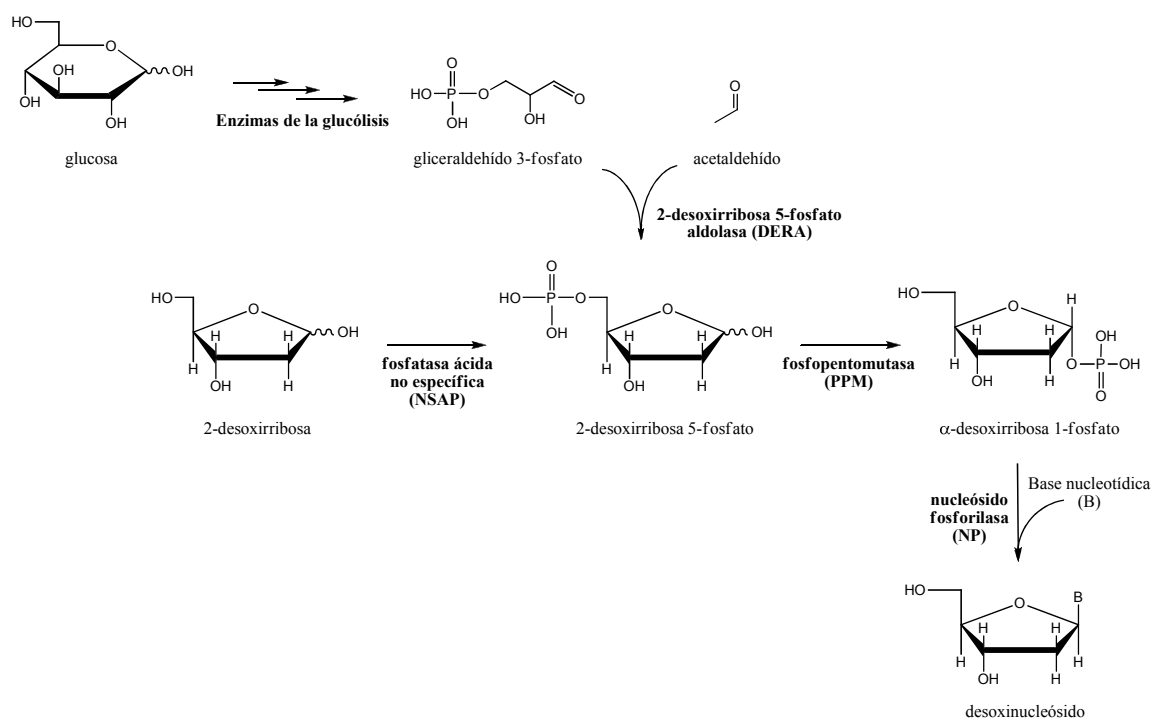


Figura 8: Caminos multienzimático propuesto para la obtención de desoxinucleósidos a través de la síntesis de dR5P.

Por lo tanto, para llevar a cabo las biotransformaciones expuestas se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1) Seleccionar microorganismos que contengan cada una de las enzimas involucradas en las biotransformaciones planteadas.

2) Acoplar las reacciones biocatalizadas con el fin de disminuir el número de reactivos y de pasos involucrados en los procesos propuestos, desarrollando caminos multienzimáticos *one pot*.

Bibliografía

- [1] Yokozeke, K.; Tsuji, T. (2000). A novel enzymatic method for the production of purine-2'-deoxyribonucleosides. *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, **10**, 207–213.
- [2] Lotfi, K.; Juliusson, G.; Albertioni, F. (2003). Pharmacological basis for cladribine resistance. *Leuk. Lymphoma*, **44**, 1705-1712.
- [3] Weckbecker, G.; Cory, J. G. (1989). Metabolic activation of 2,6-diaminopurine and 2,6-diaminopurine-2'-deoxyriboside to antitumor agents. *Adv. Enzyme. Regul.*, **28**, 125-144.
- [4] Herdewijn, P.; De Clercq, E. (1990). Design of Anti-AIDS Drugs. In: De Clercq, E. (ed). *Pharmacochemistry Library*, Elsevier, **14**, 141–174.
- [5] Shingo, Y.; Yukio, T.; Hideki, K.; Tsutomu, S.; Junichi, Y.; Norihiko, S.; Tomohiro, E.; Masakazu, F. and Tetsuji, A. (2004). Oficina Española de Patentes y Marcas., Patente ES 2 203 683 T3.
- [6] Kawashima, E.; Aoyama, Y.; Radwana, M. R.; Miyahara, M.; Sekine, T.; Kainosho, M.; Kyogoku, Y. and Ishido, Y. (1995). Highly Diastereoselective Synthesis of (2'S)-[2'-2H]-2'-Deoxyribonucleosides from the Corresponding Ribonucleosides. *Nucleosides and Nucleotides*, **14**, 333-336.
- [7] Verheyden, J. P. H.; Wagner, D. and Moffat, J. G. (1971). Synthesis of some pyrimidine 2'-amino-2'-deoxynucleosides. *J. Org. Chem.*, **36**, 250-254.
- [8] Ichicawa, E., & Kato, K. (2001). Sugar-Modified Nucleosides in Past 10 Years, A Review. *Curr. Med. Chem.*, **8**, 385–423.
- [9] Townsend, L. B.; Tipson, R. S. (1986). "Nucleic Acid Chemistry", Part 3- Section 2. Townsend, L. B.; Tipson, R. S. (Eds.). Wiley, New York.
- [10] Bao, J.; Bruque, G. A.; Ryu, D. D. Y. (2005). Biosynthesis of deoxynucleoside triphosphates, dCTP and dTTP: reaction mechanism and kinetics. *Enzyme Microb. Technol.*, **36**, 350-356.
- [11] Nature insight: Biocatalysis, Synthesis methods that exploit enzymatic activities. (2001). *Nature*, **409**, 225-260.
- [12] Jordan, A.; Reichard, P. (1998). Ribonucleotide reductases. *Ann. Rev. Biochem.*, **67**, 71-98.
- [13] Fujio, T. & Maruyama, A. (1997). Enzymatic production of pyrimidine nucleotides using *Corynebacterium ammoniagenes* cells and recombinant *Escherichia coli* cells: Enzymatic production of CDP-choline from orotic acid and choline chloride (Part I). *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**, 956-959.
- [14] Asano, Y.; Mihara, Y.; Yamada, H. (1999). A new enzymatic method of selective phosphorylation of nucleosides. *J. Mol. Catal. B Enzym.*, **6**, 271–277.

- [15] Tanaka, N.; Hasan, Z.; Hartog, A. F.; van Herk, T. & Wever, R. (2003). Phosphorylation and dephosphorylation of polyhydroxy compounds by class A bacterial acid phosphatases. *Org. Biomol. Chem.*, **1**, 2833-2839.
- [16] Jong, A.; Yeh, Y.; Ma, J. J. (1993). Characteristics, substrate analysis, and intracellular location of *Saccharomyces cerevisiae* UMP Kinase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **304**, 197-204.
- [17] Barbas, C. F., III; Wang, Y.-F.; Wong, C.-H. (1990). Deoxyribose-5-phosphate aldolase as a synthetic catalyst. *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 2013-2014.
- [18] Taverna-Porro, M.; Bouvier, L. A.; Pereira, C. A.; Montserrat, J. M.; Iribarren, A. M. (2008). Chemoenzymatic preparation of nucleosides from furanoses. *Tetrahedron Lett.*, **49**, 2642–2645.

Capítulo 3

Obtención biocatalizada de uridina 5' -monofosfato

3.1. Introducción

Los nucleósidos 5'-monofosfato (NMP) son compuestos utilizados en la industria alimentaria como potenciadores del sabor, como materiales de partida para la síntesis de oligosacáridos, como por ejemplo UDP-*N*-acetilglucosamina, y en la industria farmacéutica como intermediarios farmacológicos pudiendo citar como ejemplo la 7-hydroxyguanosina 5'-monofosfato, pro-antiviral contra el virus de sarcoma de Rous. Debido a la creciente demanda y a que los caminos sintéticos tradicionales para la obtención de estos compuestos no son sencillos, la búsqueda de estrategias alternativas para su síntesis en forma rentable y escalable mediante el uso de biocatalizadores es de gran utilidad.

3.1.1. Uso de *Corynebacterium ammoniagenes* como biocatalizador

3.1.1.1. Obtención de adenosina 5'-trifosfato

Las bacterias corinoformes han sido estudiadas en la fermentación de azúcares para la obtención de 5'-ribonucleótidos [1]. *Corynebacterium ammoniagenes*, previamente clasificada como *Brevibacterium ammoniagenes*, es una bacteria Gram-positiva, no patogénica, aislada de aceites, que posee una alta actividad para la producción de adenosina 5'-trifosfato (ATP) al administrarle suficiente cantidad de 5-fosforribosil-1-pirofosfato (PRPP) [2-4].

En particular, el ATP juega un importante papel como dador energético en muchas reacciones bioquímicas y también es utilizado como agente terapéutico (activante del

metabolismo del cerebro y vasos sanguíneos). Debido a que su consumo a nivel mundial es muy alto, el uso de biocatalizadores resulta muy útil para su producción industrial. Con el fin de utilizar estos microorganismos en la producción de ATP, *Fujio & Furuya* [5] han reportado su síntesis utilizando adenina (Ade) y glucosa (Glc) como materiales de partida y una cepa mutante de *C. ammoniagenes* ATCC 6872, denominada KY13510, como biocatalizador en forma de células enteras en estado de reposo. El camino sintético de ATP requiere de una elevada actividad de regeneración de este compuesto a partir de adenosina 5'-difosfato (ADP), así como de la activación óptima de las enzimas implicadas en reacciones de salvataje celular y de biosíntesis de PRPP. En este sentido, la glucosa es un sustrato muy importante (Figura 9).

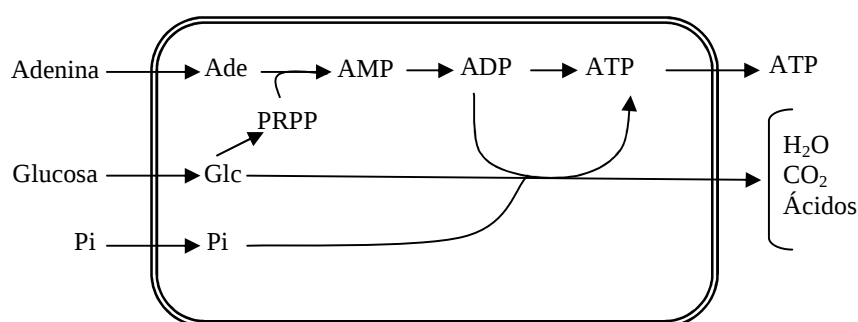


Figura 9: Producción biocatalizada de ATP utilizando adenina (Ade) y glucosa (Glc) como materiales de partida y células enteras de *C. ammoniagenes*.

Pi: fosfato inorgánico; *AMP:* adenosina 5'-monofosfato; *ADP* adenosina 5'-difosfato.

Como puede observarse en la Figura 9, las enzimas que son esenciales para este proceso biocatalizado son: las que sintetizan PRPP a partir de glucosa (vía formación de ribulosa 5-fosfato (Ribu5P), que luego ingresa en la ruta de las pentosas fosfato generando ribosa 5-fosfato (Rib5P), la cual, mediante la acción de la enzima 5-fosforribosil-1-pirofosfato sintetasa (PRPP sintetasa) y ATP (Figura 10); adenina fosforribosiltransferasa; AMP quinasa y las enzimas del sistema de regeneración de ATP a partir de ADP, en presencia de fosfato inorgánico (Pi).

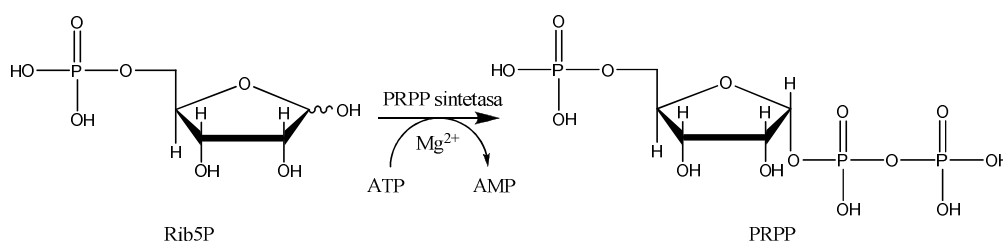


Figura 10: Transferencia de pirofosfato entre ATP y ribosa 5-fosfato (Rib5P) mediante la enzima PRPP (5-fosforribosil-1-pirofosfato) sintetasa.

Además, desde el punto de vista sintético, se ha evidenciado que las células de *C. ammoniagenes* crecidas en un medio de cultivo estrictamente limitado en el ion manganeso (Mn^{2+}) presentaron mayor capacidad de convertir adenina a ATP. De modo contrario, la adición excesiva de este ion metálico (mayor a 3 gr/100 mL) al medio de cultivo inhibe la producción de ATP. Nara *et al.* [6] estudiaron que posiblemente la limitación de Mn^{2+} produce importantes cambios morfológicos en las células lo cual resulta en la eliminación de la barrera permeable de la membrana plasmática a la excreción del ATP. Sin embargo, el estricto control en la concentración de Mn^{2+} hizo que su aplicación a los procesos industriales resultase dificultosa. Una alternativa interesante ha sido el agregado directo de surfactantes, como por ejemplo polioxietilen estearilamina (POESA) o de solventes orgánicos como xileno o tolueno, a la mezcla de reacción para permear las células al ATP [7].

Siguiendo con el estudio de la producción de ATP se conoce que el ion magnesio (Mg^{2+}) es cofactor de muchas enzimas involucradas en su obtención y que su limitada disponibilidad causa la detención de la formación de ese producto. Esta limitación podría deberse a la formación de precipitados, como por ejemplo $MgNH_4PO_4$ debido a que los medios de reacción utilizados en la metodología de producción de ATP requieren altas concentraciones de fosfato inorgánico y también de magnesio. El agregado de agentes

quelantes, como ácido fítico, mantiene al Mg^{2+} en su forma soluble logrando la disponibilidad necesaria para actuar como cofactor [7].

Una vez conocida la capacidad de las células de *C. ammoniagenes* de acumular y generar ATP, se extendió su uso a la síntesis de diversos nucleósidos fosforilados en la posición 5'.

3.1.1.2. Síntesis de uridina 5'-monofosfato

Fujio & Maruyama [2] reportaron la obtención biocatalizada de uridina 5'-monofosfato, a partir de ácido orótico, como intermediario de síntesis de citidina 5'-difosfocolina (CDP-colina) el cual es un importante precursor de la preparación de fosfolípidos como lecitina. La obtención de UMP a partir de ácido orótico ha significado un importante aporte debido a que este último es un compuesto de muy bajo costo comercial. La síntesis de UMP se ha desarrollado mediante procesos fermentativos [8], en los cuales los microorganismos son crecidos en un medio que contiene glucosa y ácido orótico; o mediante procesos biocatalíticos, en los cuales los microorganismos son crecidos en un medio salino, son centrifugados y utilizados como biocatalizador de la reacción [2].

Wang et al. [9] analizaron las variantes que afectan tanto el crecimiento de *C. ammoniagenes* ATCC 6872 como las condiciones de reacción en la obtención biocatalizada de UMP. Para el primer análisis determinaron que 15h de crecimiento (fase exponencial media) y el uso de extracto de levadura como fuente de nitrógeno brindan condiciones óptimas de crecimiento y, por lo tanto, mayores rendimientos de UMP. Para el segundo análisis, las mejores condiciones de reacción consistieron en: ácido orótico 0.6% (p/v), uso conjunto de Tritón X-100 y xileno como agentes porantes, $MgCl_2$ como fuente de Mg^{2+} en lugar de $MgSO_4$, y como fuente de fosfato KH_2PO_4 y K_2HPO_4 . La importancia de la sustitución de NH_4OH por KOH para mantener el pH de la reacción también ha sido evidenciada por este grupo de investigadores, confirmando teorías previamente formuladas

que indicaban que la formación de precipitados salinos de MgNH_4PO_4 disminuían la disponibilidad de dichos iones afectando negativamente la obtención de UMP.

Sin embargo, el uso de otros precursores para la obtención de UMP con fines sintéticos, no ha sido ampliamente estudiado. Recientemente, *Garavaglia et al.* [10] evaluaron la incidencia de compuestos implicados en las rutas de salvataje celular de pirimidinas en la generación de biofilms en células de *Escherichia coli*. Demostraron que la producción de dichos biofilms y la síntesis de UMP modulan la formación de estructuras extracelulares en respuesta a cambios fisiológicos y ambientales. Así, a partir de uracilo exógeno, PRPP y la acción de la enzima pirimidín fosforribosiltransferasa (PPRTasa) las bacterias producen UMP, el cual actúa como activador de una serie de reacciones de señalización relacionada con la formación de diferentes estructuras de anclaje. De esta manera, sus resultados confirman que ciertas drogas que actúan sobre los caminos biosintéticos y de salvataje de nucleótidos también poseen un alto potencial como agentes contra la formación de biofilms.

3.1.2. Caminos metabólicos involucrados en la síntesis de UMP a partir de ácido orótico y uracilo

Las etapas enzimáticas que conducen a la síntesis de UMP a partir de carbamil fosfato son las mismas en procariotas y eucariotas, sin embargo, la organización genética y la regulación de las enzimas involucradas varían entre los organismos [11]. Específicamente, el camino de obtención de UMP a partir de ácido orótico involucra dos enzimas: orotato fosforribosiltransferasa (OPRTasa) y orotidina 5'-monofosfato descarboxilasa (ODCasa), las cuales son las últimas enzimas que participan tanto en la síntesis *de novo* de UMP como en los caminos de salvataje de pirimidinas en general [10]. En primer lugar, la OPRTasa cataliza el desplazamiento de pirofosfato del PRPP produciendo orotidina 5'-monofosfato (OMP), haciendo esta etapa irreversible. Finalmente, el OMP es descarboxilado por la ODCasa para formar UMP (Figura 11).

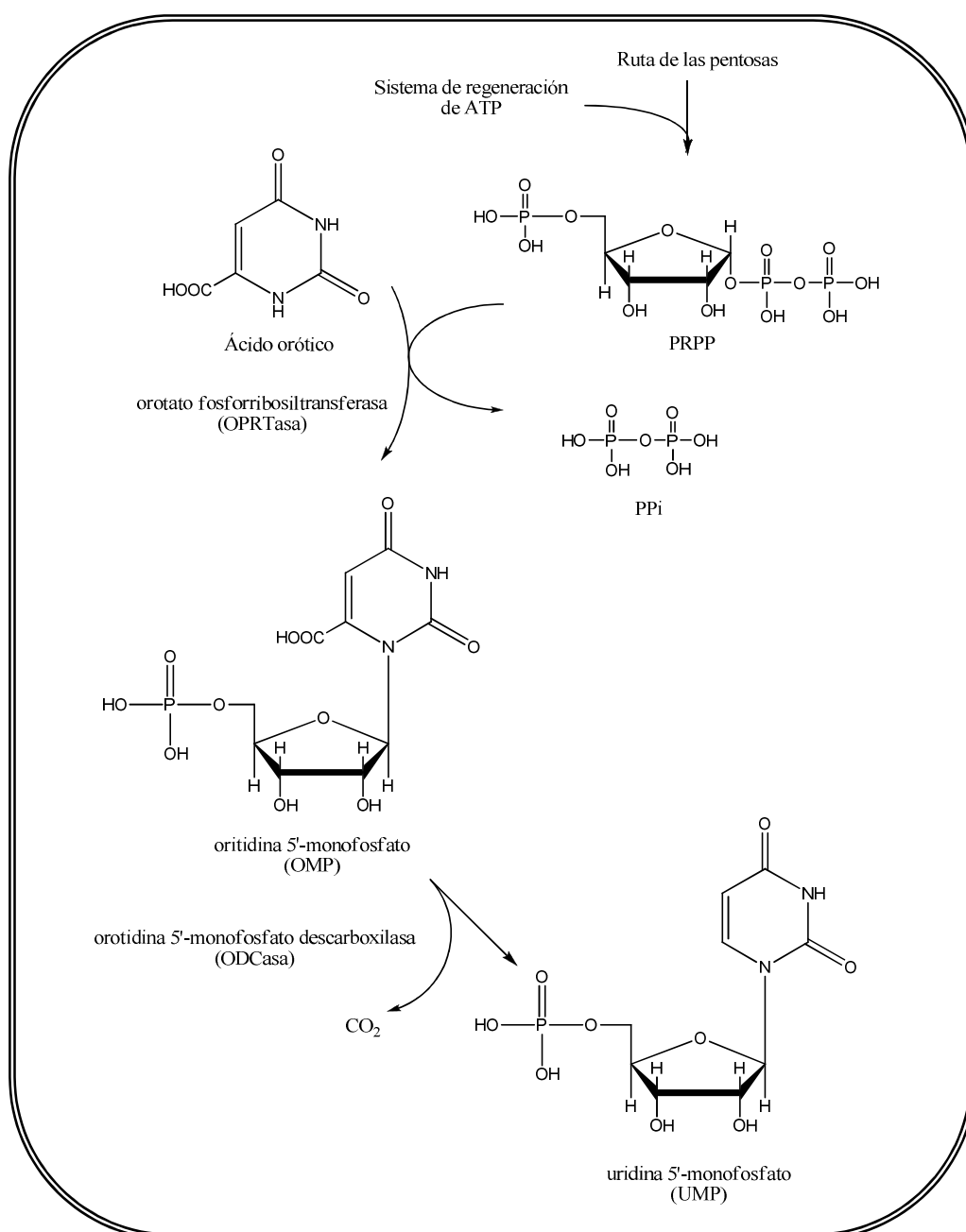


Figura 11: Esquema de biosíntesis de UMP a partir de ácido orótico como material de partida.

PPi: pirofosfato ácido.

Como se mencionó anteriormente, el PRPP es sintetizado a partir de Rib5P y ATP en una reacción catalizada por la enzima PRPP sintetasa (Figura 10). Esta enzima es una quinasa atípica en el metabolismo debido a que, en lugar de catalizar la transferencia de grupos fosfato, interviene en la transferencia de un grupo pirofosfato entre el ATP y la Rib5P. A su vez, la Rib5P proviene de la ruta de las pentosas fosfato, que puede dividirse en dos etapas, una oxidativa y otra no oxidativa. En la primera, la glucosa 6-fosfato (Glc6P) es oxidada por la enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDesh), generando nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) [4] y luego, el compuesto oxidado es descarboxilado para ser convertido en ribulosa 5-fosfato (Rib5P) por la enzima 6-fosfogluconato deshidrogenasa (Figura 12).

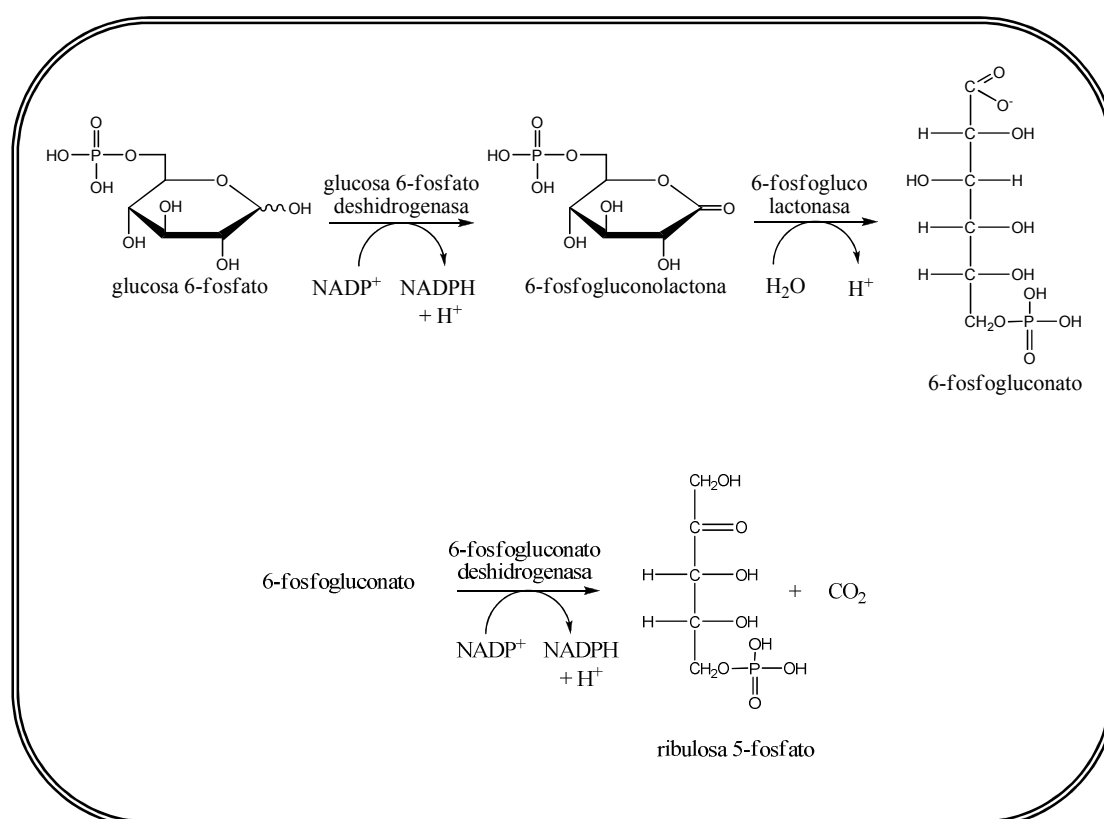


Figura 12: Etapa oxidativa de la ruta de las pentosas fosfato.

En la segunda etapa, la Rib5P es convertida en una serie de intermediarios de la ruta glucolítica. El destino de los azúcares fosfato depende de las necesidades metabólicas de la célula en la que se está produciendo la ruta. Esta etapa no oxidativa tiene 3 funciones, por una parte, proporciona azúcares de cinco carbonos, como Rib5P, para la biosíntesis de nucleótidos; por otra genera azúcares fosfato de 3, 4, 5, 6 y 7 carbonos para la producción de NADPH; y por último, posibilita la incorporación de otros azúcares, intermediarios de esta ruta, como por ejemplo gliceraldehído 3-fosfato y fructosa 6-fosfato, a la glucólisis. De este modo, para poder generar suficiente ATP, es necesario utilizar glucosa en las biotransformaciones estudiadas debido a que actúa como fuente de carbono y energía a través de su oxidación completa a CO₂ y agua [8] y además, generar su intermediario fosforilado G6P (a través de la vía glucolítica), precursor de la síntesis de Rib5P necesario para la obtención de PRPP.

Por otra parte, la síntesis de UMP a partir de uracilo (Ura) involucra la enzima uracilo fosforribosiltransferasa (PPRTasa), que solo acepta dicha base pirimidínica como sustrato [12], y para el caso de la citosina, ésta es previamente desaminada para convertirse en su sustrato natural. Esta enzima pertenece a la ruta de salvataje de pirimidinas y utiliza PRPP para la formación del correspondiente nucleósido fosforilado (Figura 13). La PPRTasa se encuentra generalmente anclada a membrana debido a que su función principal es permitir la entrada de uracilo exógeno y convertirlo en UMP de forma directa.

Cabe destacar entonces que la obtención de UMP a partir de ácido orótico, compuesto de bajo costo comercial, ha sido de particular interés dentro de la industria ya que ha reemplazado procesos químicos que incluyen varios pasos de protección y deprotección del anillo ribosídico, uso de solventes y reactivos tóxicos [13, 14], generando un proceso “ambientalmente verde” de sencilla aplicación a gran escala. Del mismo modo, el uso de uracilo como material de partida resulta atractivo considerando que es un reactivo económico, de baja toxicidad y que puede utilizarse, de igual modo, mediante metodología amigables con el medio ambiente.

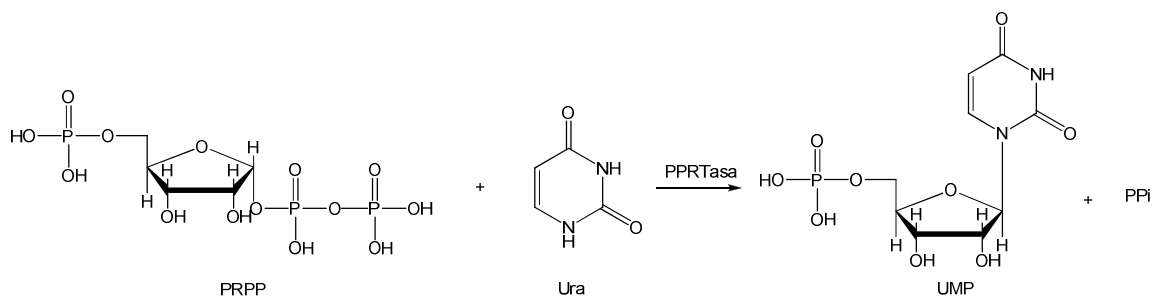


Figura 13: Esquema de biosíntesis de UMP a partir de uracilo como material de partida.

En esta parte del trabajo se proyectó obtener UMP a partir de ácido orótico y uracilo como materiales de partida, utilizando células enteras de *C. ammoniagenes* ATCC 19350 como biocatalizador. Se ensayaron diversas condiciones de cultivo del mismo así como diferentes medios de reacción de modo de optimizar las conversiones de producto. Las mezclas obtenidas se emplearon en el siguiente paso para la obtención de UDP desarrollado en el Capítulo 5 de esta Tesis.

3.2. Materiales y Métodos

3.2.1. Materiales

Todos los productos empleados fueron de calidad analítica. Los sustratos y reactivos de reacción se compraron en Sigma-Aldrich e ICN. Las drogas para los medios de cultivo fueron de Anedra, Britania y Sigma-Aldrich. Los solventes utilizados para el análisis cualitativo, el revelado y HPLC fueron de Sintorgan, Biopack y Carlo Erba. La columna de HPLC empleada fue de Eurolab S.A. Las cromatoplasmas de aluminio de silica gel 60F₂₅₄ fueron de Merck. El kit enzimático para la determinación de glucosa fue de Laboratorios Wiener.

3.2.2. Metodología

3.2.2.1. Biotransformaciones a partir de ácido orótico

Para estas biotransformaciones se emplearon dos medios de cultivo diferentes para el crecimiento de *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC 19350 así como diferentes composiciones de los medios de reacción detalladas a continuación.

1) Medios y cultivo de *C. ammoniagenes* (I)

C. ammoniagenes se cultivó, a partir de un inóculo de un stock almacenado a -80°C, en erlenmeyer de 250 mL conteniendo 100 mL de Medio A (MA) con la siguiente composición (p/v): glucosa 5%, polipeptona 1%, extracto de levadura 1%, (NH₄)₂SO₄ 0.5%, KH₂PO₄ 0.1%, K₂HPO₄ 0.3%, MgSO₄·7H₂O 0.1%, CaCl₂·2H₂O 0.01%, MnSO₄·6H₂O 0.002%, FeSO₄·7H₂O 0.001%, ZnSO₄·7H₂O 0.001%; se agregaron, en forma de solución esterilizada por filtración: urea 0.5%, treonina 0.002%, D-pantotenato de calcio 0.001%, ácido nicotínico 5 mg/L, vitamina B1·HCl 5 mg/L, biotina 30 µg/L, y bajo las condiciones siguientes pH 7.2, 30°C y 200 rpm.

Luego de 24h se tomaron 30 mL del cultivo saturado y fueron agregados a 270 mL de Medio B1 (MB1) de la siguiente composición (p/v): glucosa 10%, polipeptona 1%, extracto de carne 1%, KH_2PO_4 0.1%, K_2HPO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01%, $\text{MnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.002%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.002%, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001%, al cual se agregaron, en forma de solución esterilizada por filtración: urea 0.2%, β -alanina 0.0015%, cisteína 0.002%, treonina 0.002%, vitamina B1·HCl 5 mg/L, biotina 100 $\mu\text{g/L}$, y bajo las condiciones siguientes pH 7.2, 30°C y 200 rpm.

Una vez agotada la glucosa del medio (20h) se tomaron 30 mL y se colocaron en un erlenmeyer conteniendo 270 mL de Medio F1 (MF1) de la siguiente composición (p/v): glucosa 18%, KH_2PO_4 1%, K_2HPO_4 1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1%, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01%, $\text{MnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.002%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.002%, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001%, al cual se agregaron, en forma de solución esterilizada por filtración: urea 0.2%, glutamato de sodio 0.1%, cisteína 0.002%, β -alanina 0.0015%, treonina 0.002%, vitamina B1·HCl 5 mg/L, biotina 100 $\mu\text{g/L}$ en agua, y bajo las condiciones siguientes pH 7.2, 30°C y 200 rpm. Una vez agotada la glucosa del medio, el cultivo se centrifugó a 4°C y 5000 rpm durante 15 minutos, se descartó el sobrenadante, el pellet obtenido se lavó dos veces con solución fisiológica 0.9% (p/v) y las células húmedas enteras fueron utilizadas como biocatalizadores.

Biotransformación I

El medio y las condiciones de reacción (MRI) fueron: ácido orótico 38.5 mM, glucosa 444 mM, KH_2PO_4 73.5 mM, MgSO_4 20 mM, tritón X-100 0.4% (v/v), xileno 1.0% (v/v) y 20% (p_{húmedo}/v) de biocatalizador en 20 mL de agua, pH 7.2 (mantenido con KOH 2 N), 30°C y 200 rpm. Se tomaron alícuotas de 1.2 mL a diferentes tiempos, se calentaron en baño de agua a 100°C por un minuto y se centrifugaron a 10000 rpm por 3 minutos. Se tomaron 1.0 mL de los sobrenadantes y se almacenaron a -20°C para su posterior análisis.

2) Medios y cultivo de *C. ammoniagenes* (II)

C. ammoniagenes se cultivó, a partir de un inóculo de un stock almacenado a -80°C, en erlenmeyer de 250 mL conteniendo 100 mL de medio líquido 3C (M3C) de la siguiente composición (p/v): glucosa 2%, triptona 1%, extracto de levadura 1%, NaCl 0.3%, y bajo las condiciones siguientes pH 7.2, 30°C, 200 rpm, durante 30h.

Una vez transcurrido el tiempo de cultivo se tomaron 30 mL y se inocularon en 270 mL de Medio Básico (MBa) de la siguiente composición (p/v): glucosa 8%, extracto de levadura 1%, KH_2PO_4 1%, K_2HPO_4 1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1%, CaCl_2 0.01%, MnSO_4 0.002%, y bajo las condiciones siguientes pH 7.2, 30°C y 200 rpm. Luego de 24h, el cultivo se centrifugó a 4°C y 5000 rpm durante 15 minutos, se descartó el sobrenadante, el pellet obtenido se lavó dos veces con solución fisiológica 0.9% (p/v) y las células húmedas enteras fueron utilizadas como biocatalizadores.

Biotransformación IIA

El medio de reacción (MRIIA) consistió en: ácido orótico 38.5 mM, glucosa 333 mM, KH_2PO_4 134 mM, K_2HPO_4 134 mM, MgCl_2 20 mM, tritón X-100 0.6% (v/v) y 20% (p_{húmedo}/v) de biocatalizador en *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 7.5, 30°C y 200 rpm. Se tomaron alícuotas de 1.2 mL a diferentes tiempos, se calentaron en baño de agua a 100°C por un minuto y se centrifugaron a 10000 rpm por 3 minutos. Se tomaron 1.0 mL de los sobrenadantes y se almacenaron a -20°C para su posterior análisis.

Biotransformación IIB

Alternativamente se utilizó un medio denominado MRIIB, similar a MRIIA, reemplazando el fosfato de potasio por sales de sodio. A esta biotransformación se la denomina Biotransformación IIB.

3.2.2.2. Biotransformaciones a partir de uracilo

Medios y cultivo de *C. ammoniagenes*

C. ammoniagenes ATCC 19350 se cultivó, a partir de un inóculo de un stock almacenado a -80°C, en erlenmeyer de 250 mL conteniendo 100 mL de medio líquido 3U (M3U) de la siguiente composición (p/v): glucosa 5%, peptona ácida de caseína 1%, extracto de levadura 1%, NaCl 0.25%, urea 0.3% (esterilizada separadamente por filtración), y bajo las condiciones siguientes pH 7.2, 30°C y 200 rpm.

Luego de 24h se realizó un inóculo de 30 ml del cultivo saturado en 270 ml de M3U fresco. Transcurridas otras 24h se tomaron 30 mL del cultivo saturado y fueron agregados a 270 mL de Medio de inducción (MF2) de la siguiente composición (p/v): glucosa 15%, KH_2PO_4 0.5%, K_2HPO_4 0.5%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5%, $\text{MnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.002%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.002%, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001%, al cual se le agregaron, en forma de solución esterilizada por filtración: urea 0.2%, glutamato de sodio 0.1%, β -alanina 0.0015%, cisteína 0.002%, treonina 0.002%, ácido nicotínico 0.005%, vitamina B1·HCl 0.005%, biotina 100 $\mu\text{g/L}$; y bajo las condiciones siguientes pH 7.2, 30°C y 200 rpm durante 24h. Luego, el cultivo se centrifugó a 4°C y 5000 revoluciones por minuto (rpm) durante 15 minutos, se descartó el sobrenadante, el pellet obtenido se lavó dos veces con solución fisiológica 0.9% (p/v) y las células húmedas enteras fueron utilizadas como biocatalizadores.

Biotransformación III

El medio de reacción (MRIII) consistió en: uracilo 20 mM, glucosa 277 mM, Na_2HPO_4 140 mM, xileno 1.5% (v/v) y 20% ($p_{\text{húmedo}}$ /v) de biocatalizador en 20 mL de agua, pH 7.2 (mantenido con NaOH 10 N), 30°C y 200 rpm. Se tomaron alícuotas de 1.2 mL a diferentes tiempos, se calentaron en baño de agua a 100°C por un minuto y se centrifugaron a 10000 rpm por 3 minutos. Se tomaron 1.0 mL de los sobrenadantes y se almacenaron a -20°C para su posterior análisis.

3.2.2.3. Análisis cualitativo

Cromatografía en capa delgada

El análisis y detección de los productos de reacción se llevó a cabo mediante cromatografía en capa delgada (CCD) utilizando placas de aluminio de silica gel 60F₂₅₄. El sistema de desarrollo consistió en n-propanol/NH₄OH/H₂O 6.6/5.0/1.0 (v/v/v).

3.2.2.4. Análisis cuantitativo

Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

El análisis y cuantificación de productos se realizó mediante HPLC utilizando un equipo Gilson con detector UV (254 nm), inyector automático y columna GraceSmart, C18 fase reversa, 150 mm x 4.6 mm, 5 µm. El sistema de desarrollo utilizado fue 15 minutos *buffer* acetato de trietilamonio (TEAA) 100 mM pH 7.0 100% (vol/vol), 2 minutos hasta TEAA/Acetonitrilo (ACN, 98/2 vol/vol), 10 minutos TEAA/ACN (98/2 vol/vol) con flujo 0.9 mL/min, a temperatura ambiente.

En la Tabla 4 se detallan los tiempos de retención (Tr) de reactivos (uracilo y ácido orótico), producto (UMP) y subproducto de reacción (uridina).

Compuesto	Tr (min)
Uracilo	3.69
Ácido orótico	No se observa señal a 254 nm
Uridina	7.5
Uridina 5'-monofosfato (UMP)	5.0

Tabla 4: Tiempos de retención de reactivos, producto y subproducto de reacción.

Cuantificación de glucosa

La determinación cuantitativa de glucosa en los medios de cultivo y en las mezclas de reacción se realizó mediante un sistema analítico enzimático [15], empleado usualmente

concentraciones 0-0.27 g/mL de KH_2PO_4 . Se preparó una solución stock 2.70 g/mL de KH_2PO_4 y se realizó una curva de calibración, efectuando inicialmente una dilución 1/10 y luego 9 diluciones seriadas, por triplicado, de las cuales se tomaron 20 μL y se agregaron a 120 μL de reactivo sobre microplacas de 96 wells. Posteriormente se midió absorbancia a 660 nm utilizando la lectora de microplacas mencionada anteriormente. Para las mezclas de reacción se procedió de igual modo, para lo cual se calcularon previamente las diluciones adecuadas de modo que las concentraciones de Pi se encontraran dentro del rango lineal del método.

3.3. Resultados y discusión

3.3.1. Selección del biocatalizador para la obtención de UMP

Con el objetivo de seleccionar el biocatalizador adecuado para la síntesis de UMP, se llevó a cabo un relevamiento de los microorganismos que conforman el cepario de nuestro laboratorio. Se determinó que *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC 19350 podría ser la elección correcta debido a que diferentes cepas de dicho microorganismo han sido reportadas para la producción de otros nucleósidos-5'-monofosfato [2, 4]. En particular, este microorganismo es un mutante derivado de la cepa ATCC 6872 [17], su crecimiento es dependiente del aminoácido treonina, motivo por el cual éste debió ser adicionado a los medios de cultivos definidos para su correcto crecimiento. Asimismo, en nuestro laboratorio se había ensayado previamente la capacidad de producción de ATP de esta cepa de *C. ammoniagenes* a partir de glucosa y adenina obteniéndose resultados positivos. Cabe aclarar que para todas las biotransformaciones ensayadas en este capítulo, pudo demostrarse mediante los controles negativos sin sustratos, la presencia basal de nucleótidos de adenina. Esto concuerda con las características reportadas sobre *C. ammoniagenes* y su uso como un importante sistema con alta actividad de regeneración de adenosina-5'-trifosfato (ATP) [2-4].

3.3.2. Biotransformaciones a partir de ácido orótico

Como se mencionó en la Introducción, la síntesis de UMP a partir de ácido orótico ha sido reportada previamente para su uso como intermediario de síntesis de CDP-colina utilizando células enteras de *C. ammoniagenes* KY13505 [2]. Posteriormente, Wang *et al.* [9] utilizaron *C. ammoniagenes* ATCC 6872 como biocatalizador para la obtención final de UMP. En esta parte del trabajo se evaluó *C. ammoniagenes* ATCC 19350 en la síntesis del producto de interés, utilizando ácido orótico como materia prima.

En primer lugar, para el crecimiento y preparación del biocatalizador, se empleó un medio de cultivo definido conformado por diferentes sales y micronutrientes (MA, MB1 y MF1). Estos medios cuentan con cantidades precisas de sus componentes tales como fuente de nitrógeno, de carbono, vitaminas, aminoácidos y sales de calcio, magnesio, potasio y sodio [6]. Sin embargo, su uso en la actualidad se ve suplantado por extractos de levadura o carne. En los mismos, las proporciones de los componentes anteriormente mencionados son indefinidas pero reemplazan eficientemente la preparación compleja de los medios definidos. Cabe destacar que en este trabajo se emplearon ambos tipos de medios de cultivos obteniéndose resultados similares en la preparación biocatalizada de UMP.

Una vez que los biocatalizadores fueron cultivados, se procedió a ensayar la Biotransformación I. El medio de reacción empleado contenía ácido orótico, glucosa, KH_2PO_4 , Mg^{2+} en forma de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Tritón-X100 y xileno. El primero es el sustrato de la biotransformación, el azúcar es el precursor para la síntesis de ATP, el tercero funciona, mediante el agregado de KOH, como *buffer* manteniendo el pH de la mezcla de reacción en 7.2 y como dador de Pi para generar ATP y para la biosíntesis de PRPP, el Mg^{2+} actúa como cofactor enzimático [18] y los últimos dos se emplean como agentes porantes para permitir la salida de UMP al medio extracelular.

Cabe destacar que la reacción se realizó en forma de mezcla heterogénea debido a que el ácido orótico posee muy baja solubilidad en soluciones acuosas (1.7 mg/mL) y en la biotransformación propuesta se lo ha utilizado en una proporción de 6 mg/mL, con lo cual, la mayor parte de este compuesto se encontró en estado sólido. A medida que el ácido orótico es convertido a orotidina-5'-monofosfato (OMP) por la enzima OPRTasa y su subsiguiente transformación a UMP por descarboxilación del anterior, el resto de ácido orótico se fue solubilizando.

Por otra parte, se verificó la necesidad de utilizar KOH para mantener el pH de la mezcla de reacción durante el transcurso de la misma; de no hacerlo, el mismo desciende por debajo de 5.0 unidades y consecuentemente no se detecta formación del producto de interés. Esta disminución del pH durante la reacción podría deberse a la formación de ácido

carbónico, el cual se produciría a partir del CO₂ generado por el segundo paso de la ruta metabólica estudiada que involucra la decarboxilación del OMP. Dicha formación no sería óptimamente soportada por el *buffer* dada su baja concentración, 73.5 mM.

La necesidad del agregado de agentes porantes se debe a que el UMP es una molécula cargada negativamente a pH fisiológico (pK_a 6.4 y 9.5) [19] con lo cual su salida del citoplasma celular sería impedida por su carga; de este modo, porar la membrana plasmática resulta propicio para obtener extracelularmente el producto de síntesis. Los datos obtenidos en estas biotransformaciones coinciden con este hecho ya que controles sin agentes porantes han arrojado resultados negativos para la obtención de UMP.

Finalmente y para completar el análisis de las variables que afectan la obtención de UMP, se determinó la incidencia del tiempo de crecimiento de *C. ammoniagenes* en medio MF1. Para ello con alícuotas de cultivo tomadas a diferentes tiempos (entre 10-24h), se llevó a cabo la biotransformación tomando, a su vez alícuotas a intervalos de 2, 4, 8, 10 y 24h. El análisis cualitativo y semicuantitativo (mediante CCD) permitió determinar que los microorganismos en fase exponencial media (aproximadamente 17h de crecimiento) presentaban los mejores resultados. Esto concuerda con el hecho de que durante este período la reproducción celular es muy activa y por lo tanto también lo es la síntesis de DNA y RNA [9]. De este modo, el ácido orótico sería utilizado directamente en la vía de síntesis *de novo* de pirimidinas llegando a la obtención de UMP. La Tabla 5 muestra los resultados obtenidos mediante HPLC, para la cinética de esta biotransformación con células de *C. ammoniagenes* obtenidas a las 17h de crecimiento. Cabe destacar que para todas las reacciones ensayadas no se detectó presencia de UMP a las 48h, por lo cual los datos informados en las tablas corresponden a tiempos iguales e inferiores a 24h.

Posteriormente y para finalizar con el análisis de la presente biotransformación, se determinaron las concentraciones de glucosa (Glc) y de fosfato inorgánico (Pi) [15, 16] presentes en cada tiempo de reacción. Dicho análisis se realizó con el objetivo de poder utilizar algunas de las mezclas para la posterior obtención de UDP que se desarrollará en el Capítulo 5 de este trabajo. Se observó que la concentración de Pi descendía a lo largo de la

reacción y que la de Glc alcanzaba la mitad de la concentración inicial a las 24h, justamente por ser uno de los impulsores involucrados en el camino metabólico estudiado.

Resultado Tiempo (h)	Concentración UMP (mM)	Porcentaje de conversión*
0	3.0	8
2	8.7	23
4	7.7	20
8	7.1	19
10	6.3	16
24	5.7	15

Tabla 5: Resultados obtenidos para la síntesis de UMP utilizando *C. ammoniagenes* ATCC 19350 en fase exponencial media de crecimiento (17h) y condiciones de Biotransformación I.

*% de conversión determinado por HPLC: concentración UMP (mM)/concentración inicial ácido orótico (38.5 mM)x100.

A continuación se procedió a evaluar una segunda alternativa variando los medios de crecimiento y de preparación del biocatalizador con el objetivo de simplificar las metodologías de cultivo respecto a las ensayadas en la Biotransformación I. Para ello se precultivó *C. ammoniagenes* en un medio de cultivo indefinido (M3C) empleando como fuente de micronutrientes extracto de levadura y triptona. Luego de 17h de crecimiento (fase exponencial media) en MBa se ensayó la Biotransformación IIA.

La mezcla de reacción contenía la misma concentración inicial de ácido orótico que en la Biotransformación I (38.5 mM), menor concentración de glucosa dado que en la biotransformación anterior se observó que permanecía remanente a las 24h, además de dos sales de fosfato K_2HPO_4 y KH_2PO_4 , Mg^{2+} en forma de $MgCl_2$ y solo tritón X-100 como agente porante, todo en *buffer* Tris-HCl 50 mM y pH 7.5.

En primer lugar, el empleo de las sales de fosfato de potasio mono y dibásicas en concentraciones equimolares de 134 mM, así como del *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 7.5, permitieron mantener de forma más eficiente el pH durante prácticamente todo el transcurso de la biotransformación. Inicialmente se evaluó su variación en intervalos de una hora y se observó una disminución del pH a 7.2, a las 4h de reacción, por lo que se agregó KOH hasta 7.5 unidades, luego se mantuvo constante durante toda la biotransformación. Esto se debe a que, a diferencia de la reacción anterior, la concentración del *buffer* conformado por las sales de potasio es prácticamente el cuádruple, con lo cual su capacidad amortiguadora es considerablemente más efectiva ante la producción de ácido carbónico. Del mismo modo, el *buffer* Tris-HCl contribuiría de la misma forma incrementando la capacidad de soportar cambios de pH. Los resultados obtenidos para la presente biotransformación se muestran en la Tabla 6.

Resultado Tiempo (h)	Concentración UMP (mM)	Porcentaje de conversión *
0	3.4	9
2	4.5	12
4	5.2	14
8	5.8	15
10	6.0	16
24	5.2	14

Tabla 6: Resultados obtenidos para la síntesis de UMP utilizando *C. ammoniagenes* ATCC 19350 en condiciones de Biotransformación IIA.

*% de conversión determinado por HPLC: concentración UMP (mM)/concentración inicial ácido orótico (38.5 mM)x100.

Puede evidenciarse un menor rendimiento de UMP en prácticamente todos los tiempos de reacción respecto a la biotransformación anterior. En primer lugar, uno de los cambios que se efectuaron en el medio de reacción es el tipo de sal de Mg^{2+} empleada

como cofactor enzimático. No obstante, se cree que el reemplazo de MgSO_4 por MgCl_2 no causaría ningún efecto negativo en la reacción ya que se ensayaron controles con ambas sales y condiciones de Biotransformación IIA y se obtuvieron similares resultados que los mostrados en la Tabla 6.

Otra de las causas podría ser el uso de un único agente porante, en este caso Tritón X-100. Es probable que este cambio genere una menor eficiencia de poración celular impidiendo la salida de UMP al medio de reacción de forma eficiente. El empleo de mayores cantidades del agente porante o bien el uso de más de uno podría permitir una mayor concentración extracelular de UMP [2, 9].

Del mismo modo que en la biotransformación anterior, se determinó la concentración de Glc y Pi en las mezclas de reacción a distintos tiempos. En esta biotransformación nuevamente se observó la disminución en la concentración de Glc desde el inicio de la reacción. Sin embargo, la glucosa llegó a agotarse lo cual se debe a que la concentración inicial de la misma en el medio es menor que en la biotransformación anterior. Por otra parte, para el caso del Pi pudo observarse que su concentración descendió, al igual que en la biotransformación anterior.

Desde un punto de vista comparativo, mediante la Biotransformación I se obtuvo 8.7 mM de UMP a las 2h de reacción, mientras que la conversión máxima obtenida en la Biotransformación IIA fue de 6.0 mM a las 10h de reacción. Sin embargo, esta última implica metodologías de cultivo y preparación de los biocatalizadores más sencillas y no requiere de un control estricto del pH durante el transcurso de la reacción. Dado que las mezclas se utilizaron posteriormente en reacciones consecutivas para la síntesis de UDP, descrita en el Capítulo 5, y deben acondicionarse de modo de alcanzar concentraciones de UMP, Pi y Glc adecuadas, las mezclas obtenidas mediante la Biotransformación IIA fueron las elegidas para tal objetivo.

Con el objetivo de emplear la mezcla de reacción en la síntesis UDP (Capítulo 5) la cual fue optimizada utilizando *buffer* fosfato de sodio, se evaluó el desarrollo de la Biotransformación IIB para la síntesis de UMP. El medio de reacción contiene los mismos

componentes de la Biotransformación IIA a excepción de las sales fosfato que en este caso son de sodio. Dado que hasta el momento no se ha reportado el uso de sales de sodio en medios que contienen ácido orótico como sustrato, esta alternativa resulta interesante. Sin embargo los resultados obtenidos para la síntesis de UMP muestran menores conversiones que las alcanzadas con sales de potasio (Tabla 7), evidenciando que, para este medio de reacción, estas sales son importantes en el funcionamiento de esta biotransformación.

Resultado Tiempo (h)	Concentración UMP (mM)	Porcentaje de conversión*
0	1.2	3
2	2.4	6
4	3.0	8
8	3.4	9
10	5.0	13
24	4.3	11

Tabla 7: Resultados obtenidos para la síntesis de UMP utilizando *C. ammoniagenes* ATCC 19350 en condiciones de Biotransformación IIB.

*% de conversión determinado por HPLC: concentración UMP (mM)/concentración inicial ácido orótico (38.5 mM)x100.

Luego se analizaron las concentraciones de Glc y Pi presentes en el medio en los distintos tiempos de reacción. Para el caso del Pi, su concentración se mantuvo constante a lo largo de la reacción del mismo modo que para las biotransformaciones anteriores. Para el Pi y la Glc se observó una disminución en su concentración. Para ésta última se detectó un remanente de Glc de 35 mM a las 24h, mostrando que las sales de sodio generan un efecto negativo sobre la reacción.

Debido a que el acondicionamiento del medio para la siguiente etapa podría realizarse sin problemas, también se evaluará el uso de la mezcla obtenida en la Biotransformación IIB a las 10h en el próximo paso de síntesis de UDP, desarrollado en el Capítulo 5.

3.3.3. Biotransformaciones a partir de uracilo

Se ensayó la síntesis de UMP utilizando *C. ammoniagenes* ATCC 19350 como biocatalizador y uracilo como sustrato, debido a que este compuesto es precursor de la síntesis del nucleósido fosforilado. Dado que su costo comercial no es elevado, se lo consideró como una alternativa útil para la obtención del producto de interés.

El microorganismo se cultivó en un medio óptimo de crecimiento (M3U) y luego se lo transfirió a un medio salino (MF2) conteniendo diferentes sales, urea como fuente de nitrógeno y micronutrientes necesarios para su crecimiento. Una vez alcanzada la DO_{600nm} adecuada, esto es que el crecimiento llegara a fase exponencial media, las células fueron centrifugadas y el pellet fue utilizado como biocatalizador.

En primer lugar se evaluó la variación del pH durante el transcurso de la reacción y pudo observarse que se mantuvo constante. En esta biotransformación se empleó Na_2HPO_4 141 mM (149 mM determinado por método colorimétrico) y NaOH para generar la capacidad amortiguadora necesaria para la reacción. El camino enzimático que involucra uracilo como precursor de UMP no comprende ningún paso de descarboxilación, con lo cual la ausencia de ácido carbónico permitiría un control óptimo del pH de reacción por el sistema *buffer* involucrado. Los resultados obtenidos para la Biotransformación III se presentan en la Tabla 8.

Resultado Tiempo (h)	Concentración UMP (mM)	Porcentaje de conversión*
0	2.4	12
2	7.2	36
4	7.5	38
8	8.7	44
10	9.3	46
24	10.0	48

Tabla 8: Resultados obtenidos para la síntesis de UMP utilizando *C. ammoniagenes* ATCC 19350 en condiciones de Biotransformación III.

*% de conversión determinado por HPLC: concentración UMP (mM)/concentración inicial uracilo (20 mM)x100.

Puede observarse que a las 24h de reacción se obtuvo el máximo de conversión de UMP. Una de las ventajas que presenta esta biotransformación es que el sustrato, uracilo, presenta una elevada solubilidad en agua, 10 mg/mL, con lo cual estaría en solución desde el inicio de la reacción, facilitando el proceso de entrada a las células y generando así mayores rendimientos de UMP con respecto a las biotransformaciones ensayadas anteriormente con ácido orótico como sustrato. En segundo lugar, la biotransformación procede sin el agregado de Mg^{2+} [5] ya que la enzima PPRTasa, involucrada en esta ruta, no lo requiere como cofactor enzimático y además el UMP no actúa como inhibidor de su actividad, logrando así mejores conversiones que para las reacciones anteriores. Finalmente es importante destacar que en estos ensayos se empleó únicamente xileno como agente porante y en concentración 1.5% (v/v). Para las reacciones con ácido orótico como sustrato se emplearon concentraciones de agentes porantes de 1.4% y 0.6%, para la Biotransformación I y II, respectivamente. Los resultados obtenidos en la reacción con uracilo indicarían la necesidad del agregado de concentraciones finales de agentes porantes mayores a 0.6 % para permitir la salida de las células del UMP generado eficientemente.

Del mismo modo que para las Biotransformaciones I, II y IIB, se procedió a cuantificar Glc y Pi en las mezclas de reacción. Para la glucosa, su concentración descendió

desde el inicio de la reacción debido a su participación en la formación de UMP, vía síntesis de PRPP como se mencionó anteriormente, sin embargo no llegó a consumirse completamente. Por otra parte, para el caso del Pi vuelve a observarse que se mantuvo constante a lo largo de la reacción.

Posteriormente, algunas de las mezclas obtenidas mediante esta biotransformación se utilizaron en reacciones consecutivas para la síntesis de UDP, descrita en el Capítulo 5, debiendo acondicionarse de modo de alcanzar las concentraciones de UMP, Pi y Glc requeridas en dicha reacción.

3.4 Conclusiones

En esta parte del trabajo se eligió, del cepario de nuestro laboratorio, *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC 19350 como biocatalizador para la síntesis de UMP. Este compuesto pudo obtenerse utilizando tanto ácido orótico como uracilo como materiales de partida.

Para las Biotransformaciones I, II y IIB, el ácido orótico fue fosforilado a OMP por una reacción catalizada por la orotato fosforribosiltransferasa celular y posteriormente descarboxilado por la orotidina 5'-monofosfato descarboxilasa, involucradas en la ruta de síntesis *de novo* de pirimidinas. Los mejores resultados se obtuvieron mediante la Biotransformación I, para la cual se utilizaron medios de crecimiento e inducción complejos, compuestos por diferentes sales así como micronutrientes, evidentemente necesarios para la activación de las enzimas del proceso biocatalítico. A su vez, el uso conjunto de Tritón X-100 y xileno como agentes porantes con una concentración total de 1.6% (v/v) permitió permear adecuadamente las células para poder acumular en el medio mayores cantidades de UMP. Si bien, para las Biotransformaciones II y IIB, se obtuvieron menores rendimientos es importante destacar que la metodología empleada para el crecimiento y preparación de los biocatalizadores fue más sencilla comparada con la anterior. Asimismo, no se produjeron variaciones importantes del pH de reacción debido a que la concentración del *buffer* empleado presentó una mayor capacidad para soportar cambios producidos por el ácido carbónico generado, contrariamente a lo ocurrido para la Biotransformación I. Para el caso de la Biotransformación IIB los rendimientos obtenidos fueron aún menores debido al uso de sales fosfato de sodio en lugar de potasio. Esto indicaría que en el camino metabólico la presencia de determinados cationes puede influir en el rendimiento del proceso.

Por otra parte, los mejores resultados se obtuvieron utilizando uracilo como sustrato debido, especialmente, a su mayor solubilidad en agua con respecto a la del ácido orótico, lo que permitiría el ingreso del sustrato a las células de un modo más eficiente. El camino

metabólico estudiado en esta biotransformación involucra a la enzima pirimidín fosforribosiltransferasa, la cual solo acepta uracilo como base pirimidínica conjuntamente con PRPP para producir directamente el UMP, no es dependiente de cationes bivalentes como Mg^{2+} y no se inhibiría por concentraciones altas del producto de la reacción.

En cuanto al tiempo de crecimiento en los medios de inducción, los mejores resultados se obtuvieron durante la fase exponencial media, 17h. Esto concuerda con el hecho que la reproducción celular durante ese período es alta, la velocidad de síntesis de ADN y ARN también es elevada, y por ende las vías de síntesis *de novo* se encuentran activadas.

En conclusión, en esta parte del trabajo se obtuvieron resultados satisfactorios debido a que se logró producir UMP, utilizando células enteras de *Corynebacterium ammoniagenes* y como sustratos tanto ácido orótico, compuesto de bajo valor comercial, como uracilo. Algunas mezclas de reacción obtenidas se utilizaron en el siguiente paso de obtención de UDP correspondiente al Capítulo 5 de este trabajo, siguiendo el camino metabólico planteado en esta Tesis Doctoral.

Bibliografía

- [1] Abbouni, B.; Elhariry, HM.; Auling G. (2004). Overproduction of NAD⁺ and 5'-inosine monophosphate in the presence of 10 μ M Mn²⁺ by a mutant of *Corynebacterium ammoniagenes* with thermosensitive nucleotide reduction (nrd^{ts}) after temperature shift. *Arch. Microbiol.*, **182**, 119–125.
- [2] Fujio, T. & Maruyama, A. (1997). Enzymatic production of pyrimidine nucleotides using *Corynebacterium ammoniagenes* cells and recombinant *Escherichia coli* cells: Enzymatic production of CDP-choline from orotic acid and choline chloride (Part I). *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**, 956-959.
- [3] Maruyama, A. & Fujio, T. (2001). ATP production from adenine by a self-coupling enzymatic process: High-level accumulation under ammonium-limited conditions. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **65**, 644-650.
- [4] Kamada, N.; Yasuhara, A.; Ikeda, M. (2003). Significance of the non-oxidative route of the pentose phosphate pathway for supplying carbon to the purine-nucleotide pathway in *Corynebacterium ammoniagenes*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **30**, 129-132.
- [5] Fujio, T. & Furuya, A. (1983). Production of ATP from adenine by *Brevibacterium ammoniagenes*. *J. Ferment. Technol.*, **61**, 261-267.
- [6] Nara, T.; Misawa, M.; Kinoshita, S. (1968). Production of nucleic acid-related substances by fermentative processes. Part XVIII. Pantothenate, thiamine and manganese in 5'-purine ribonucleotide production by *Brevibacterium ammoniagenes*. *Agric. Biol. Chem.*, **32**, 1153-1161.
- [7] Fujio, T. & Furuya, A. (1985). Effects of magnesium ion and chelating agents on enzymatic production of ATP from adenine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **21**, 143-147.
- [8] Nakayama, K. & Tanaka, H. (1971). Production of nucleic acid-related substances by fermentative processes. Part XXXVIII. Production of uridine 5'-monophosphate and orotidine 5'-monophosphate by *Brevibacterium ammoniagenes*. *Agr. Biol. Chem.*, **35**, 518-525.
- [9] Wang, X.; Wang, X.; Yin, M.; Xiao, Z.; Ma, C.; Lin, Z.; Wang, P. G.; Xu, P. (2007). Production of uridine 5'-monophosphate by *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC 6872 using a statistically improved biocatalytic process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **76**, 321-328.
- [10] Garavaglia, M.; Rossi, E.; Landini, P. (2012). The pyrimidine nucleotide biosynthetic pathway modulates production of biofilm determinants in *Escherichia coli*. *PLoS ONE*, **7** (2).

- [11] Makoff, A. J. & Radford, A. (1978). Genetics and biochemistry of carbamoyl phosphate biosynthesis and its utilization in the pyrimidine biosynthetic pathway. *Microbiological Rev.*, **42**, 307-328.
- [12] Hochstadt, J. (1974). The role of the membrane in the utilization of nucleic acid precursors. *CRC Crit. Rev. Biochem.*, **2**, 259-309.
- [13] Yashunsky, D. V.; Tsvetkov, Y. E.; Nikolaev, A. V. (2000). Synthesis of carbohydrate mimetics of an acceptor substrate for the *Leishmania* elongating α -D-mannopyranosylphosphate transferase. *Tetrahedron Lett.*, **41**, 3665-3668.
- [14] Yoshikawa, M.; Kato, T.; Takenishi, T. (1969). Studies of phosphorylation. III. Selective phosphorylation of unprotected nucleosides. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **42**, 3505-3508.
- [15] *Glicemia enzimática, Método enzimático para la determinación de glucosa en suero o plasma*. Laboratorios Winner S.A.I.C., Rosario, Argentina.
- [16] Itaya K. & Iu M. (1966). A new micromethod for the colorimetric determination of Inorganic phosphate. *Clin. Chim. Acta*, **14**, 361-366.
- [17] Nakayama K. & Hagino H. (Jul. 27, 1971). Process for producing L-lysine. US Patent 3, 595-751.
- [18] Henriksen, A.; Aghajari, N.; Jensen, K. F.; Gajhede, M. (1996). Flexible loop at the dimer interface is a part of the active site of the adjacent monomer of *Escherichia coli* Orotate Phosphoribosyltransferase. *Biochem.*, **35**, 3803-3809.
- [19] Dawson, R.M.C. *et al.* (1959). pKa Data, Compiled by R. Williams. *Data for Biochemical Research*, Oxford, Clarendon Press.

Capítulo 4

Obtención biocatalizada de desoxinucleósidos, arabinósidos y azúcares monofosfato

4.1. Introducción

La síntesis de nucleósidos, desoxinucleósidos y arabinósidos 5'-monofosfatos resulta de particular importancia debido a su aplicación en la industria alimenticia o farmacéutica. Además, la obtención de diferentes azúcares monofosfato resulta de interés debido a que dichos compuestos son importantes precursores de la síntesis no solo de nucleósidos y sus análogos, sino también de hidratos de carbono. Desde este punto de vista, las biotransformaciones se presentan, en la actualidad, como una alternativa interesante para la síntesis de estos compuestos.

4.1.1. Fosfohidrolasas

Las bacterias poseen diversas enzimas capaces de desfosforilar compuestos orgánicos que participan de procesos esenciales en el metabolismo celular. La función principal de estas enzimas es hidrolizar compuestos fosforilados que no pueden atravesar la membrana plasmática bacteriana (nucleótidos, azúcares fosfato, etc.). El fosfato inorgánico (Pi) y los correspondientes productos de desfosforilación pueden, de ese modo, atravesar la membrana celular y proveer a la célula de nutrientes esenciales para su proliferación [1, 2]. En general, la desfosforilación en células procariotas involucra reacciones de hidrólisis de uniones fosfoésteres o fosfoanhídridos y son catalizadas por un grupo de enzimas denominadas fosfohidrolasas o fosfatasa [3]. Se demostró que algunas de estas enzimas son secretadas fuera de la membrana plasmática, donde son liberadas al espacio

periplásmico en su forma soluble o retenidas como proteínas asociadas a membrana. Así mismo, se reportó la importancia de estas enzimas como factor de virulencia bacteriana [4, 5] y, para el caso de fosfatasas citoplasmáticas, su participación en mecanismos de señalización transduccional [6] y en diversos caminos metabólicos.

La clasificación de las fosfatasas se basó inicialmente en las propiedades bioquímicas y biofísicas de estas enzimas como pH óptimo, afinidad por sustrato, y tamaño molecular. Debido al desarrollo de bancos de secuencias se determinó que las fosfatasas, así como otras proteínas, pueden agruparse en base a su estructura primaria. Este criterio ha llevado a la clasificación en familias definiendo un patrón de secuencia para cada una de ellas, lo cual es muy útil para la identificación de la función de nuevos genes.

4.1.2. Fosfatasas ácidas no-específicas (NSAPs)

El término NSAP (del inglés *bacterial nonspecific acid phosphatases*) se adoptó inicialmente para aquellas enzimas bacterianas que, de modo contrario a las fosfatasas alcalinas, muestran actividad de catálisis óptima a valores de pH ácido o neutro y no exhiben una afinidad específica por sustrato, siendo capaces de hidrolizar un amplio espectro de fosfoésteres orgánicos. Estas enzimas se encuentran principalmente en enterobacterias en forma de proteínas solubles en el espacio periplasmático o unidas a membrana.

Las primeras NSAPs purificadas y caracterizadas fueron las enzimas periplásmicas PhoN (fosfatasa ácida no específica I) y AphA (fosfatasa ácida no específica II) de *Salmonella typhimurium* [7, 8]. Se determinó que ambas enzimas poseían un peso molecular de aproximadamente 25 kDa pero mostraban diferentes propiedades biofísicas y funcionales. En estudios posteriores sobre distintas especies bacterianas, se demostró que la producción de fosfatasas ácidas de bajo peso molecular (25-30 kDa) no se restringía solo a miembros de ese género [9, 10]. Paralelamente, el clonado de genes codificantes de NSAPs permitió, en base a la secuencia de aminoácidos, la identificación de dos familias

moleculares diferentes, clasificándose como NSAPs de clase molecular A y NSAPs de clase molecular B [11]. En particular, las primeras enzimas de *Salmonella typhimurium*, PhoN y AphA, se incluyeron dentro de la clase A y clase B, respectivamente.

Recientemente, los estudios sobre NSAPs de especies no enterobacterianas condujo a la identificación de una tercera familia molecular de NSAPs, las de clase molecular C [12, 13]. Las enzimas de esta clase parecen distantemente relacionadas con las NSAPs de clase B desde el punto de vista estructural y evolutivo. A diferencia de estas últimas, las cuales son secretadas a través de la membrana plasmática generando proteínas periplásmicas solubles, las de clase C contienen una secuencia amino-terminal de señal, típica de lipoproteínas bacterianas y se encuentran como lipoproteínas asociadas a membrana.

En base a la secuencia de aminoácidos se determinó además, que el sitio activo de las fosfatasas ácidas de clase A se encuentra conservado en glucosa 6-fosfatasas de mamíferos, fosfatasas lipídicas y haloperoxidasas dependientes de vanadio [14]. Los residuos del sitio activo funcionan como sitios de unión a fosfatos, actúan como nucleófilos, estabilizan el estado de transición y juegan un rol especial en la protonación del grupo saliente [15].

Se demostró que en cada especie bacteriana pueden encontrarse NSAPs de diferentes clases, demostrando su participación en diferentes caminos metabólicos [16]. Asimismo, es importante destacar que, conjuntamente con su actividad fosfatasa, todas las NSAPs de clase A y B también poseen actividad fosfotransferasa según lo mostrado en la Figura 15 [17]. Previamente, Axelrod y Appleyard [18, 19] reportaron la transferencia de un grupo fosfato proveniente de diferentes compuestos dadores sobre compuestos hidroxilados utilizando fosfatasas presentes en jugos.

Asano *et al.* [16] estudiaron la actividad fosfotransferasa de gran cantidad de enterobacterias utilizando PPi y demostraron que especialmente las NSAPs de clase A1 poseen una alta regiospecificidad [20]. En particular, reportaron una metodología enzimática de fosforilación de un nucleósido purínico como inosina (Ino) para generar inosina-5'-monofosfato (IMP) utilizando PhoC recombinante de *Morganella morganii*, NSAP de clase A1, y pirofosfato (PPi) como dador de fosfato.

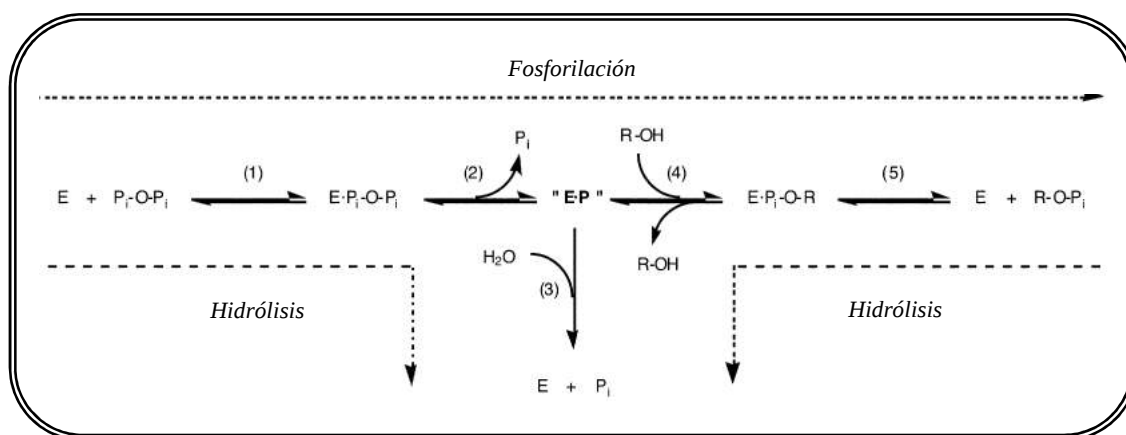


Figura 15: Modo de acción de las NSAPs mediante la formación de un intermediario “E-P”.

(1) y (2): Pasos de formación del intermediario enzimático fosforilado; **(3):** Reacción de hidrólisis del intermediario “E-P”; **(4):** Equilibrio: -reacción directa: reacción de “E-P” hacia la formación de un intermediario binario enzima-sustrato fosforilado; -reacción inversa: disociación de dicho producto; **(5):** Equilibrio: -reacción directa: disociación del intermediario binario en producto fosforilado y enzima libre; -reacción inversa: hidrólisis del producto fosforilado.

4.1.2.1. Fosfatasas ácidas bacterianas de clase molecular A

Las fosfatasas ácidas de clase molecular A son un grupo de fosfatasas de secreción bacterianas que poseen un peso molecular entre 25 y 27 kDa y que muestran motivos de secuencias conservados. Existen seis genes diferentes que codifican para esta clase de enzimas, los cuales ya fueron clonados y secuenciados y las proteínas caracterizadas [11].

La enzima PhoN de *Salmonella typhimurium* fue la primer enzima de clase A purificada y caracterizada. Esta enzima es activa frente a un rango muy variado de sustratos como nucleósidos monofosfato, nucleósidos difosfato, nucleósidos trifosfato, hexosas y pentosas fosforiladas, glicerol fosfato, *p*-nitrofenil fosfato (*pNPP*, del inglés *p-nitrophenyl phosphate*), PPI, pero no frente a fosfodiésteres. El pH óptimo es aproximadamente 5.5 y su actividad es inhibida por iones mercurio y fluor y, parcialmente, por Pi en concentraciones superiores a 0.1 M. Otras fosfatasas ácidas bacterianas del tipo A han sido descritas [21] y se han subclasificado como A1 y A2 dependiendo de la resistencia que presentan ante el efecto inhibitorio de fluor [11].

4.1.2.2. Fosfatasas ácidas bacterianas de clase molecular B

Las fosfatasas ácidas de clase molecular B son un grupo de fosfatasas de secreción bacteriana de peso molecular de aproximadamente 100 kDa y muestran motivos de secuencias conservadas. A pesar de que el peso molecular es similar al de las enzimas de clase A, este grupo no se encuentra relacionado a nivel de secuencia. En su forma nativa, las NSAPs de clase B son proteínas homotetraméricas compuestas por cuatro subunidades polipeptídicas. Las enzimas de este grupo presentan resistencia a la desnaturalización por (SDS), contrariamente a lo que ocurre con las de clase A, y en un gel de SDS-PAGE, migran en bandas de 100 kDa [11, 12]. Existen cuatro genes diferentes, ya clonados y secuenciados, codificantes para esta clase de enzimas que también fueron caracterizadas.

AphA-Se de *Salmonella enterica* fue la primer NSAP de clase B purificada y caracterizada en detalle [8] y fue originalmente purificada de *S. enterica ser. typhimurium* LT2. Esta enzima también fue nombrada como fosfatasa ácida no específica II para diferenciarla de la NSAP clase A (Pho-Se, llamadas también fosfatasa ácida no específica I) que ya había sido identificada en esta cepa.

Las NSAPs de clase B son activas sobre varios fosfoésteres orgánicos incluyendo uridina monofosfato y pNPP pero no diésteres. El pH óptimo para su actividad fosfatasa es entre 5 y 5.5. La actividad fosfatasa de la enzima AphA-Se es inhibida por EDTA, altas concentraciones de Pi y por nucleósidos.

La enzima AphA-Se es también capaz de funcionar como fosfotransferasa sobre compuestos orgánicos que contienen un grupo hidroxilo libre al emplear un fosfoéster hidrolizable como dador de fosfato (Figura 15). Esta actividad fosfotransferasa fue demostrada usando pNPP como dador de fosfato y alcoholes alquílicos (metanol, etanol, etilenglicol o glicerol) en altas concentraciones (0.2 a 2 M) ó nucleósidos en concentraciones bajas (0.1 mM) como aceptores [21]. Con nucleósidos, la reacción de

transfosforilación requiere menores concentraciones, de modo que los nucleósidos parecen ser más eficaces que los alcoholes como aceptores de fosfato.

Otras fosfatasas ácidas bacterianas del tipo B han sido descritas [21]. Se ha postulado que el rol fisiológico de las NSAPs de clase B podría ser el de sustituir a la fosfatasa alcalina, ausente en la especie *Enterobacteriana*, representando mayoritariamente a las enzimas periplásmicas de ruptura de nucleótidos.

4.1.2.3. Fosfatasas ácidas bacterianas de clase molecular C

Las fosfatasas ácidas bacterianas de clase molecular C han sido identificadas como un grupo de lipoproteínas bacterianas de secreción (con actividad NSAP) con un peso molecular de aproximadamente 30 kDa y parte de los motivos de secuencia conservados. Las enzimas clase C parecen estar relacionadas a nivel de secuencia, aunque distantemente, con las NSAPs de clase B y también a algunas fosfatasas ácidas de plantas.

La primera NSAP de clase C identificada fue la enzima OlpA de *Chryseobacterium meningosepticum* (anteriormente *Flavobacterium meningosepticum*) que, entre la especie ex-flavobacteriana, es la más relevante desde el punto de vista clínico [22]. Esta enzima fue purificada y caracterizada en detalle y contiene un polipéptido de aproximadamente 30 kDa. Se encontró que OlpA-cm posee semejanza de secuencia significativa con otras dos lipoproteínas bacterianas para las cuales no se había reportado su actividad fosfatasa: la lipoproteína e (P4) asociada a la membrana externa de *H. influenzae* [23], y una lipoproteína citoplasmática asociada a membrana de *Streptococcus equisimilis* [24].

4.1.3. Aplicación de NSAPs bacterianas a la obtención de nucleósidos y azúcares fosfato

En 1972, Wallin & Arion [25] sintetizaron glucosa 6-fosfato a partir de glucosa y diferentes dadores de fosfato tanto orgánicos como inorgánicos demostrando la actividad

glucosa 6-fosfatasa de las NSAPs. Además estas enzimas se han utilizado para la producción de aditivos alimentarios y como herramientas para biorremediación [26, 27]

Como se mencionó anteriormente en este Capítulo, *Asano et al.* [16] reportaron una metodología enzimática de fosforilación de inosina para generar inosina 5'-monofosfato (IMP) utilizando PhoC recombinante de *Morganella morganii* siendo pirofosfato PPi el dador de fosfato. Ellos estudiaron la actividad fosfotransferasa de gran cantidad de enterobacterias demostrando la regioselectividad de las NSAPs de clase A1 para la producción específica del producto 5'-fosforilado de inosina [16, 20]. Resultados similares fueron reportados por *Weber et al.* [17, 28] utilizando una fosfatasa ácida de *Shigella flexneri* (PhoN-Sf). Las fosfatasas ácidas no-específicas de *S. flexneri* y *Salmonella enterica* son capaces también de catalizar la fosforilación de una amplia variedad de hidratos de carbono, utilizados como precursores de síntesis [29], y alcoholes de manera regioselectiva utilizando pirofosfato como el dador de fosfato [28]. Asimismo, *van Herk et al.* [30] propusieron la fosforilación de dihidroxiacetona usando NSAPs de *S. flexneri* y *S. enterica ser. typhimurium LT2*, siguiendo la estrategia aplicada previamente para la fosforilación de diferentes compuestos polihidroxilados [28].

En esta parte del trabajo se desarrolló la búsqueda de biocatalizadores con actividad NSAP para la producción de uridina 5'-monofosfato de modo de poder utilizar las mezclas obtenidas en el siguiente paso de obtención de UDP, desarrollado en el Capítulo 5 de esta Tesis. Además, con los microorganismos seleccionados, se proyectó la síntesis de azúcares fosfato como ribosa y desoxirribosa 5-fosfato, debido a que pueden emplearse como precursores en la producción de nucleósidos y desoxinucleósidos, respectivamente [31, 32]. Luego, esos mismos biocatalizadores se ensayaron para la obtención de azúcares fosforilados de 3 átomos de carbono, tales como gliceraldehído 3-fosfato y dihidroxiacetona fosfato debido a que pueden emplearse en la preparación de desoxirribosa 5-fosfato mediante enzimas de la familia de las aldolasas [33]. Finalmente se evaluó la actividad de dos microorganismos genéticamente modificados, desarrollados previamente en nuestro laboratorio, sobre la fosforilación de los sustratos ensayados anteriormente con microorganismos *wild type* [34]. Estos microorganismos recombinantes contienen genes

codificantes para NSAPs, sin mutaciones, y su aplicación resulta interesante debido a que posibilitan la reducción de los tiempos de reacción de forma significativa.

4.2. Materiales y Métodos

4.2.1. Materiales

Todos los productos empleados fueron de calidad analítica. Los sustratos y reactivos de las reacciones se compraron en Sigma-Aldrich. Las drogas para los medios de cultivo fueron de Anedra, Britania y Sigma-Aldrich. Los solventes utilizados para el análisis cuali-cuantitativo, el revelado y para HPLC fueron de Sintorgan, Biopack y Carlo Erba, respectivamente. El pirofosfato ácido de sodio fue amablemente donado por Saporiti SA (Buenos Aires, Argentina).

4.2.2. Metodología

4.2.2.1. Cultivo y preparación de los biocatalizadores

Los microorganismos pertenecientes al género *Enterobacter* se cultivaron en 10 mL de medio líquido Luria Broth (LB) de la siguiente composición (p/v): triptona 1%, extracto de levadura 0.5% y NaCl 1%, en agua destilada, y bajo las condiciones siguientes pH 7.0, 37°C, 200 rpm y durante 24h. Los cultivos saturados se centrifugaron a 10000 rpm por 5 minutos, se descartaron los sobrenadantes, los pellets obtenidos fueron lavados con *buffer* acetato 0.1 M pH 4 y las células húmedas enteras se utilizaron como biocatalizadores.

4.2.2.2. Expresión de enzimas recombinantes y preparación de los biocatalizadores

Escherichia coli BL21 (DE3) ATCC 47092 (fosfatasa ácida deficiente) portadoras de los plásmidos recombinantes [22] se cultivaron a 37°C en medio LB_{Amp} con la siguiente composición (p/v): triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1% y 2 µL/mL de una

solución de ampicilina (100 mg/mL), en agua destilada, y bajo las condiciones siguientes pH 7.0, 37°C y 200 rpm, hasta que la absorbancia del cultivo alcanzó $A_{600} = 0.4-0.6$. La expresión de las enzimas recombinantes Pho-Rp y Pho-Ea fue inducida mediante la adición de 0.5 mM de IPTG (isopropil isotio- β -D-galactosido) y el crecimiento se continuó a 20 °C durante 4h hasta 2 unidades de DO. Las células bacterianas se obtuvieron por centrifugación a 5000 rpm durante 10 minutos y 4°C. Los *pellets* se lavaron con buffer acetato 0.1 M, pH 4.0 y las células húmedas obtenidas fueron empleadas como biocatalizadores.

4.2.2.3 Biotransformaciones con ribonucleósidos, desoxirribonucleósidos y arabinonucleósidos como sustrato

El medio de reacción fue: pirofosfato ácido de sodio (PPi) 260 mM, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 mM, 5% (p/v) de biocatalizador en *buffer* acetato 0.1 M, y las condiciones pH 4.0, 40°C y 200 rpm. Las concentraciones de los sustratos fueron: uridina (Uri), desoxiuridina (dU) y timidina (Td) 74.5 mM, adenínarabinósido (AraA) 30mM. Se tomaron alícuotas a diferentes tiempos y se centrifugaron a 10000 rpm por 3 minutos. Los sobrenadantes se almacenaron a -20°C para su posterior análisis.

4.2.2.4. Biotransformaciones con diferentes azúcares como sustrato

El medio de reacción consistió en: PPi 300 mM, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.8 mM, 5% de biocatalizador en *buffer* acetato 0.1 M, y las condiciones pH 4.0, 40°C y 200 rpm, utilizando dímero de dihidroxiacetona (DHA), *D*-desoxirribosa (dR), *D*-ribosa (Rib), *D*-glucosa (Glc) en concentración 100 mM. Para las biotransformaciones utilizando gliceraldehído (Glad) se utilizó una concentración de 200 mM por ser una mezcla racémica *D-L*. Se tomaron alícuotas a diferentes tiempos y se centrifugaron a 10000 rpm por 3 minutos. Los sobrenadantes se almacenaron a -20°C para su posterior análisis.

4.2.2.5. Análisis cualitativo

Cromatografía en capa delgada

El análisis y detección de los productos de reacción se llevó a cabo mediante CCD utilizando placas de aluminio de silica gel 60F₂₅₄. Se utilizaron dos sistemas de desarrollo diferentes. Para nucleósidos consistió en n-propanol/NH₄OH/H₂O 6.6/5.0/1.0 (v/v/v) y se revelaron por UV. Para azúcares consistió en n-butanol/isopropanol/H₂O 3/12/4 (v/v/v). Como revelador de azúcares y sus correspondientes productos fosforilados se utilizó (v/v) anisaldehído 1%/H₂SO₄ 2% en ácido acético glacial, observándose señales de diferentes colores.

En la Tabla 9 se muestran los valores de Relación de frente (Rf) de los azúcares y sus correspondientes productos fosforilados.

Producto	Rf	
	Prod. monofosfato	Azúcar
glucosa 6-monofosfato (Glc6P)	0.14	0.53
desoxirribosa 5-monofosfato (dRib5P)	0.16	0.64
ribosa 5-monofosfato (Rib5P)	0.13	0.53
gliceraldehído 3-monofosfato (G3P)	0.15	0.60
dihidroxiacetona 3-fosfato (DHAP)	0.16	0.57

Tabla 9: Relación de Frente (Rf) de los diferentes productos analizados por cromatografía en capa delgada utilizando revelador de azúcares.

4.2.2.6. Análisis cuantitativo

Cromatografía líquida de alta resolución

El análisis y cuantificación de productos nucleotídicos se realizó mediante HPLC utilizando un equipo Gilson con detector UV (254 nm), inyector automático y columna GraceSmart, C18 fase reversa, 150 mm x 4.6 mm, 5 μ m. El sistema de desarrollo utilizado fue 16 minutos *buffer* acetato de trietilamonio 100 mM pH 7.0/acetronitrilo (98/2 vol/vol), con flujo 0.9 mL/min, a temperatura ambiente. En la Tabla 10 se muestran los tiempos de retención de los reactivos y productos ensayados.

Producto	Tr (min)	
	5'-NMP	Nucleósido
uridina 5'-monofosfato (UMP)	3.1	4.4
timidina 5'-monofosfato (TMP)	5.5	9.5
2'-desoxiuridina 5'-monofosfato (dUMP)	3.3	4.3
adenínarabinosido 5'-monofosfato (AraAMP)	8.7	13.4

Tabla 10: Tiempos de retención (TR) obtenidos mediante HPLC de nucleósidos y nucleótidos.

Resonancia magnética nuclear (RMN)

Para la cuantificación de Glc6P, dR5P, Rib5P, G3P y DHAP, las muestras almacenadas a 0°C se liofilizaron y el polvo obtenido se resuspendió en agua deuterada (D₂O) hasta su completa homogeneización. El análisis mediante Resonancia Magnética Nuclear de fósforo (³¹P-RMN) se realizó utilizando un equipo Bruker de 500 MHz. Los desplazamientos químicos (δ) se expresaron en ppm respecto a ácido fosfórico 85% como estándar externo (Tabla 11).

Producto	δ (ppm)
glucosa 6-monofosfato (Glc6P)	1.91
desoxirribosa 5-monofosfato (dRib5P)	1.55
ribosa 5-monofosfato (Rib5P)	1.52; 1.57
gliceraldehído 3-monofosfato (G3P)	1.86
dihidroxiacetona fosfato (DHAP)	1.81

Tabla 11: Desplazamientos químicos (δ) de los diferentes azúcares monofosfato obtenidos expresados en ppm respecto a ácido fosfórico 85%.

La cuantificación se realizó inicialmente mediante una estimación que relaciona las áreas de las señales del espectro de ^{31}P -RMN, obtenidas mediante el programa Bruker 1D WINNMR, con el contenido de fósforo de la muestra. Para ello se determinó que la molaridad máxima total posible de productos conteniendo fósforo (en forma de fosfato) debía ser 600 mM, ya que se partió de 300 mM de PPi (en la mayoría de los casos), asignándole a dicho compuesto el valor de área 1 en el espectro. Luego y del mismo modo, se asignaron las áreas relativas del fosfato inorgánico obtenido (A_{Pi}), y de los correspondientes productos fosforilados ($A_{\text{AzúcarP}}$) [35-37]. Luego se estableció un sistema de ecuaciones con una incógnita X , que corresponde a la cantidad de fósforo representada por el área de cada señal de las distintas especies fosforiladas de la mezcla, donde:

$$[\text{PPi}] = X/2 \quad [\text{Pi}] = A_{\text{Pi}} \cdot X \quad [\text{ProdP}] = A_{\text{ProdP}} \cdot X$$

$$2[\text{PPi}] + [\text{Pi}] + [\text{ProdP}] = 600 \text{ mM}$$

$$\text{y la suma de } X + (A_{\text{Pi}} \cdot X) + (A_{\text{ProdP}} \cdot X) = 600 \text{ mM}$$

Despejando X del sistema de ecuaciones se obtuvo que $X = 600 / (1 + AR_{Pi} + AR_{ProdP})$. Así, X/2 correspondió a la concentración P_{Pi} remanente, y se reemplazó, además, el valor de X para [P_i] y [ProdP] de modo de obtener las concentraciones correspondientes.

Para el ejemplo propuesto en la Figura 16 se obtiene que $X = 29.4$

$$\rightarrow [P_i] = 29.4 \cdot 14.3 = 420.6 \text{ mM}$$

$$\rightarrow [Glc6P] = 29.4 \cdot 5.1 = 150 \text{ mM}$$

$$\rightarrow [PP_i] = 29.4 / 2 = 14.2 \text{ mM}$$

Posteriormente, se utilizó como estándar interno metanofosfonato de dimetilo (MFM) [17] en concentración final 15 mM, con algunas de las muestras analizadas, verificando los resultados obtenidos mediante la estimación propuesta. Para ello se prepararon las muestras del mismo modo que se detalló anteriormente y se agregó MFM. La concentración que se utilizó no fue arbitraria sino que se determinó la solubilidad del estándar en D₂O, conteniendo además las especies a cuantificar, y se estableció que 15 mM era la concentración adecuada para estas mediciones ya que el MFM se solubilizó completamente. Luego se realizó el análisis de una muestra de reacción conteniendo Glc6P, P_{Pi}, P_i obtenida con *R. planticola*. En base a los cálculos anteriores referidos a la Figura 16, se estimó una concentración de P_{Pi} de 14.2 mM, osea un total de 28.4 mM de fósforo (en forma de fosfato). Esta aproximación coincide con lo calculado para el estándar interno metanofosfonato de metilo -MFM-: si 1.0 de área corresponde a 28.4 mM de fósforo, entonces 0.5 de área corresponde a 14.2 mM de esta especie mono fosforilada.

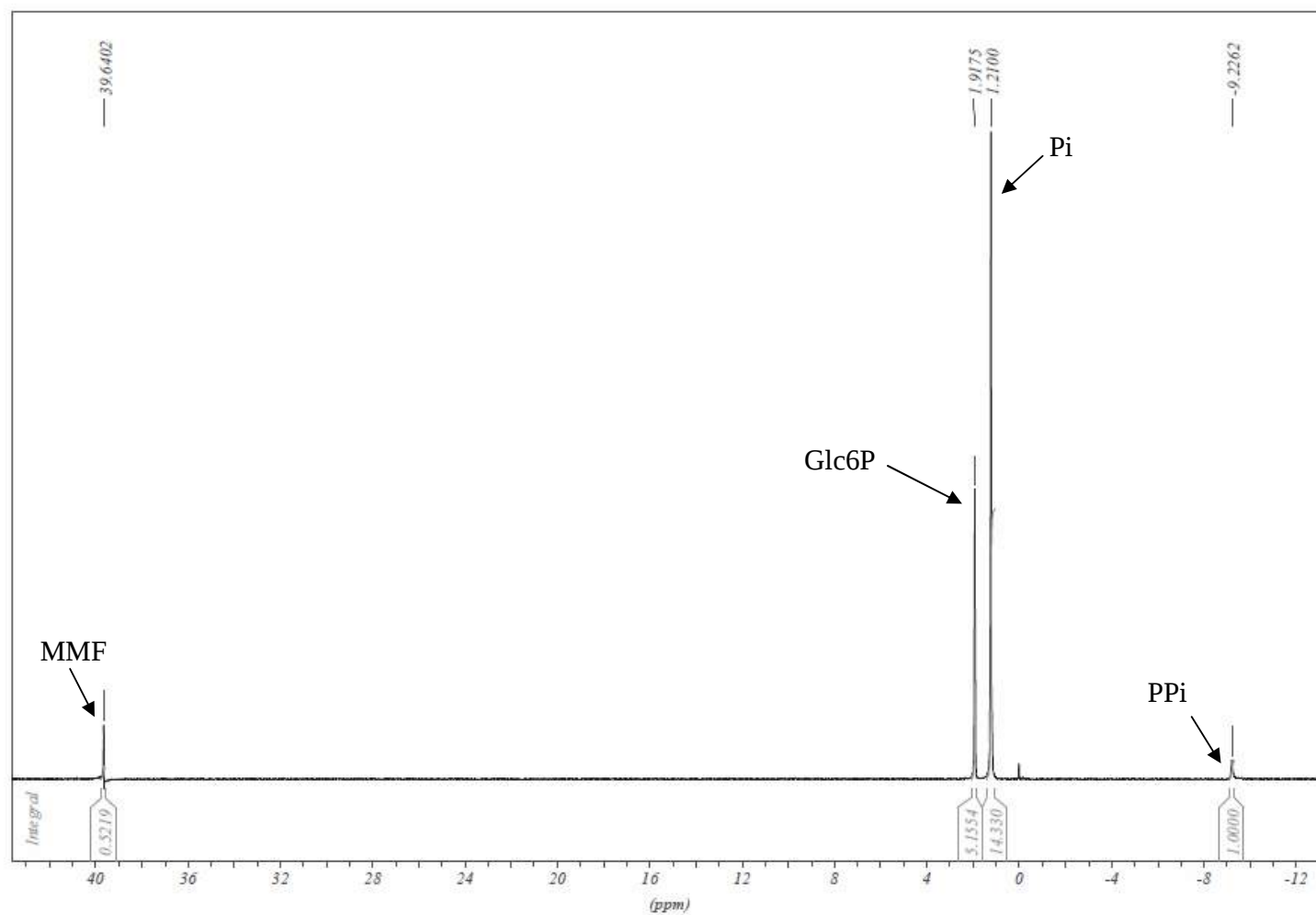


Figura 16: Espectro de ^{31}P -RMN de una mezcla de reacción obtenida utilizando *R. planticola* como biocatalizador, Glc 1000mM y PPi 300 mM como sustratos, empleando metanofosfonato de dimetilo (MMF) 15 mM como estándar interno.

4.3. Resultados y discusión

4.3.1. Selección de los biocatalizadores utilizando uridina como sustrato

Con el objetivo de evaluar una metodología alternativa a la desarrollada en el Capítulo 2 para la obtención de UMP, se utilizaron bacterias del género *Enterobacteria* con actividad NSAP del cepario de nuestro laboratorio. En primer lugar, se ensayaron sobre uridina aquellas cepas seleccionadas previamente en nuestro laboratorio para la síntesis de IMP y AMP. En la Tabla 12 se presentan los primeros resultados obtenidos en la síntesis de UMP, analizados mediante CCD semicuantitativa.

Microorganismos	Intensidad de señal (254nm)		
	16h	24h	36h
<i>Klebsiella sp.</i> CECT 367	+	++	++
<i>Chromobacterium violaceum</i> CECT 23421	-	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	-	++	+
<i>Citrobacter amalonaticus</i> ATCC 25405	-	-	-
<i>Raoultella planticola</i> ATCC 33531	+	++	++
<i>Escherichia coli</i> ATCC 13005	-	-	-
<i>Serratia macescens</i> ATCC 14041	-	+	+
<i>Enterobacter gergoviae</i> ATCC 33028	+	++	++

Tabla 12: Resultados obtenidos para la síntesis de UMP utilizando uridina (72.5 mM) y PPi (260 mM) como sustratos y enterobacterias como biocatalizadores.

Resultados analizados semicuantitativamente por CCD: +: conversiones menores a 5%; ++: 5-10%.

Para la reacción, se tomaron alícuotas a las 2, 4, 12, 16, 24, 36 y 48 horas y se observó que cinco cepas dieron resultados positivos para la biotransformación propuesta. En los primeros tres tiempos no se observó conversión de sustrato a producto para ninguna de ellas con lo cual no se incluyeron en la tabla. De modo similar, para las 48h de reacción, la intensidad de las señales de UMP no superó a las de las 36h.

Estas reacciones biocatalizadas fueron llevadas a cabo en *buffer* acetato de sodio pH 4.0, ya que las NSAPs exhiben su máxima actividad fosfatasa específica a pHs ácidos. Además se empleó pirofosfato ácido de sodio como dador de fosfato y uridina como aceptor en concentraciones 260 y 74.5 mM, respectivamente. Estudios previos, en los cuales se utilizaron células enteras de *Morganella morganii* como biocatalizador conteniendo NSAPs [16], determinaron que estas enzimas, al poseer no sólo actividad fosfotransferasa sino también fosfohidrolasa, causarían la hidrólisis del nucleósido monofosfato, disminuyendo los rendimientos. Esto puede compensarse con el uso de mayores concentraciones del dador de fosfato lo cual no se presenta como un problema dado que el PPi es un compuesto económico y que además es utilizado usualmente en la industria alimenticia como aditivo, por lo que no presenta grados de toxicidad importantes. Por el contrario, el uso de mayores concentraciones del nucleósido se vería limitada tanto por su solubilidad en agua como por su costo comercial.

En la Tabla 13 se muestran los resultados obtenidos para la cuantificación de UMP de cada biotransformación realizada mediante HPLC contra curvas de calibración de dicho compuesto.

El análisis de las muestras tomadas luego de 24h de reacción demostró que, posteriormente a dichos tiempos, no se obtuvieron mayores conversiones y, en algunos casos como el de *Enterobacter aerogenes*, disminuyó la concentración de producto. Esto se debe a la actividad fosfatasa de las enzimas involucradas en el proceso como se mencionó anteriormente. Si bien los resultados obtenidos no presentan porcentajes de conversión elevados, la selección de nuevos biocatalizadores para la síntesis de nucleósidos monofosfato resulta de interés.

Microorganismos	UMP	
	Conc. (mM)	Tiempo (h)
<i>Klebsiella sp.</i> CECT 367	8.0	24
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	2.0	24
<i>Raoultella planticola</i> ATCC 33531	5.6	24
<i>Enterobacter gergoviae</i> ATCC 33028	4.0	24

Tabla 13: Resultados obtenidos para la síntesis de UMP.

4.3.2. Biotransformaciones con desoxirribonucleósidos y arabinonucleósidos como sustrato

Con el objetivo de ampliar el espectro de sustratos para la síntesis biocatalizada de compuestos nucleosídicos fosforilados, se ensayaron reacciones utilizando los microorganismos previamente seleccionados. Del mismo modo que en los ensayos anteriores, se tomaron alícuotas a diferentes tiempos de reacción y se analizaron mediante HPLC. En la Tabla 14 se muestran los mejores resultados obtenidos utilizando desoxiuridina, timidina y adenínarabinosido como sustratos.

En todos los casos ensayados se ha obtenido un único producto fosforilado y en la posición 5', verificado contra patrones. Esto determinaría que las NSAPs contenidas en los microorganismos seleccionados pertenecen a la clase molecular A las cuales son conocidas por poseer alta regioselectividad [16, 20] en la fosforilación del hidroxilo 5'.

Microorganismos	dUMP			TMP			AraAMP		
	Conc. (mM)	Conv. *	Tiempo (h)	Conc. (mM)	Conv. *	Tiempo (h)	Conc. (mM)	Conv. *	Tiempo (h)
<i>Klebsiella sp.</i> CECT 367	0.5	0.7	24	0.9	1.2	24	3.4	11.3	24
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	1.4	1.9	76	1.8	2.4	48	0.3	1.0	30
<i>Raoultella planticola</i> ATCC 33531	2.4	3.2	24	2.8	3.8	12	0.4	1.3	9
<i>Enterobacter gergoviae</i> ATCC 33028	1.3	1.7	24	1.3	1.7	24	0.5	1.6	24

Tabla 14: Mejores resultados obtenidos para la síntesis de dUMP, TMP y AraAMP (5'-monofosfatos de desoxiuridina, timidina y adeninarabinósido, respectivamente).

*Conv: porcentaje de conversión obtenido a partir de dU y Td 74.5 mM y de AraA 30 mM.

Asimismo, en base a los resultados mostrados en la tabla anterior puede observarse que para la fosforilación de dU y Td los rendimientos obtenidos son más bajos respecto a la biotransformación con uridina. Si bien, como su nombre lo indica, las NSAPs son enzimas inespecíficas que pueden aceptar gran variedad de sustratos, su afinidad por cada uno de ellos estaría íntimamente relacionada con el K_m (constante de afinidad) específico. De esta manera, para los desoxinucleósidos la ausencia del grupo hidroxilo en la posición 2' podría influir negativamente en los rendimientos de fosforilación ya que su ubicación o interacción en el sitio activo de la enzima sería diferente a la de los nucleósidos, aumentando de este modo los K_m de ambos sustratos [38]. Particularmente, para las reacciones que involucran a *Enterobacter gergoviae*, los rendimientos máximos de dUMP y TMP fueron de 1.3 mM a las 24h. Esto indicaría que la NSAP de este microorganismo presenta afinidad equivalente para Uri y Td demostrando que, para estas reacciones enzimáticas, la estructura del azúcar aceptor de fosfato sería más relevante que la estructura

de la base, si comparamos el rendimiento de 4 mM alcanzado con Uri respecto a 1.3 mM obtenido a partir de dU.

Por otra parte, la concentración inicial del arabinósido AraA fue 30 mM y no 74.5 mM, la empleada para los otros sustratos ensayados, debido a su baja solubilidad en soluciones acuosas (0.45 mg/mL a 25°C). Sin embargo, los porcentajes de conversión de AraAMP no difieren demasiado respecto de los obtenidos con los otros sustratos, a excepción del resultado de la biotransformación con *Klebsiella sp.*, para la cual el porcentaje de conversión es superior al del resto de los biocatalizadores. Este hecho se atribuye a las diferencias funcionales de las NSAPs entre distintas cepas de enterobacterias [21] como se mencionó con anterioridad.

4.3.3. Biotransformaciones con diferentes azúcares como sustrato

Posteriormente se planteó el uso de enterobacterias para la síntesis de diversos azúcares fosforilados, cuya aplicación se ha detallado en la Introducción de este Capítulo. *Van Herk et al.* [28] sintetizaron previamente diversos carbohidratos y alcoholes fosforilados de manera regioselectiva empleando fosfatasas ácidas de *Shigella flexneri* y *Salmonella enterica* sobreexpresadas y purificadas. En base a estos antecedentes, en este trabajo se planteó la obtención de *D*-glucosa 6-fosfato (Glc6P), *D*-desoxirribosa y *D*-ribosa 5-fosfato (dRib5P y Rib5P, respectivamente) utilizando células enteras de microorganismos. De esta manera, se realizó un *screening* de las enterobacterias del cepario del laboratorio ensayándose 12 cepas de diferentes géneros, entre ellos *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Escherichia*, *Citrobacter* y *Proteus*. El análisis semicuantitativo permitió determinar que, de las 12 cepas, 6 presentaron resultados positivos. En la Tabla 15 se muestran los mejores resultados obtenidos.

Microorganismos	dR5P		Rib5P		Glc6P	
	Conv.*	Tiempo (h)	Conv.*	Tiempo (h)	Conv.*	Tiempo (h)
<i>Klebsiella</i> sp. CECT 367	-	-	+	20	+	20
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	+	24	++	12	++	4
<i>Citrobacter amalonaticus</i> ATCC 25405	++	20	++	20	-	-
<i>Proteus rettgeri</i> ATCC 29944	++	20	++	20	-	-
<i>Raoultella planticola</i> ATCC 33531	++	24	++	12	++	4
<i>Enterobacter gergoviae</i> ATCC 33028	+	20	+	20	++	2

Tabla 15: Mejores resultados obtenidos utilizando células enteras de microorganismos que contienen NSAPs y diversos azúcares como sustrato.

*Conv.: Conversión determina mediante análisis semicuantitativo por CCD: +: menores a 10%; ++: 10-20%.

En primer lugar, debe considerarse que las biotransformaciones con azúcares se llevaron a cabo empleando concentraciones más elevadas de sustrato con respecto a las ensayadas con nucleósidos (100 mM vs. 74.5 mM). Esto se debe principalmente a que los azúcares presentan mayor solubilidad en soluciones acuosas respecto a los compuestos nucleosídicos y además, tienen menor valor comercial lo cual puede resultar beneficioso en el escalado del proceso. Para el caso del PPi se utilizó una concentración tres veces mayor que la del aceptor de fosfato, de modo de minimizar la actividad fosfatasa de la NSAPs de estos biocatalizadores sobre los azúcares fosfato obtenidos, del mismo modo que se ensayó con los nucleósidos como sustrato.

En la Tabla 15 puede observarse que *Enterobacter aerogenes*, *Raoultella planticola* y *Enterobacter gergoviae* dieron resultados positivos para los tres sustratos empleados. Si bien *Citrobacter amalonaticus* y *Proteus rettgeri* mostraron mejores resultados para la obtención de dRib5P y Rib5P, no lograron sintetizar exitosamente Glc6P. Estos resultados

muestran nuevamente que las enzimas de distintas bacterias presentan diferente especificidad con respecto al aceptor de fosfato.

Posteriormente, se prosiguió con la búsqueda de biocatalizadores versátiles para la obtención de diferentes compuestos fosforilados utilizando azúcares de 3 átomos de carbono como sustratos. Se evaluó así la actividad de 12 enterobacterias para la síntesis de gliceraldehído 3-fosfato (G3P) y su isómero, la dihidroxiacetonafofosfato (DHAP). La fosforilación regioselectiva de estos compuestos resulta de relevancia debido a que pueden utilizarse como materiales de partida para la síntesis de dR5P utilizando microorganismos con actividad aldolasa [33], como se detalló en la Introducción de este capítulo. El análisis semicuantitativo permitió determinar que de las 12 cepas ensayadas, solo con 3 se alcanzaron resultados positivos (Tabla 16).

Microorganismos	G3P		DHAP	
	Conv.*	Tiempo (h)	Conv.*	Tiempo (h)
<i>Citrobacter amalonaticus</i> ATCC 25405	+	20	+	17
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	+	12	+	20
<i>Raoultella planticola</i> ATCC 33531	++	12	+	20

Tabla 16: Mejores resultados obtenidos para la síntesis de G3P y DHAP.

* Conv.: Conversión determina mediante análisis semicuantitativo por CCD: +: menores a 10%; ++: 10-20%.

En las biotransformaciones para la obtención de DHAP se utilizó el sustrato comercial económico en forma de dímero. Éste puede emplearse en estos ensayos dado que a pH 4.0, que es el óptimo para estas reacciones, se libera DHA. De este modo, la concentración inicial de reactivo fue 50 mM generando en el medio de reacción la misma concentración que en los ensayos anteriores para azúcares. Debido a que se conoce la selectividad de las NSAPs por los *D*-azúcares [28], así como por los β -*D*-nucleósidos [40], para el caso del

gliceraldehído, el cual se comercializa en forma de mezcla *D-L*, se agregó el doble de concentración de modo de contar con la requerida para la biotransformación.

Si bien, a partir del análisis semicuantitativo, estas reacciones biocatalizadas no presentan conversiones elevadas, puede observarse que, nuevamente, *Enterobacter aerogenes* y *Raoultella planticola* arrojaron los mejores resultados. De esta manera, se seleccionó *R. planticola* para realizar un último análisis relacionado con las concentraciones óptimas de aceptor y dador de fosfato de modo de poner a punto estos requerimientos. Esta elección se basó en que este microorganismo presentó buenos resultados en todas las reacciones ensayadas tanto con nucleósidos, desoxinucleósidos, arabinósidos y azúcares como sustratos.

Para encontrar la mejor relación aceptor/dador de fosfato se empleó glucosa como sustrato por ser el reactivo más económico y con el cual se observaron mejores resultados en los ensayos preliminares. Para ello se ensayaron concentraciones fijas de PPi de 100 y 300 mM y glucosa 100, 300, 400 y 1000 mM, para ambos casos. En la Figura 17 puede observarse las concentraciones de Pi y Glc6P resultantes así como los porcentajes de conversión respecto a la concentración de glucosa inicial, a las 4h de reacción. Se observa que a medida que aumenta la concentración de Glc y manteniendo la de PPi en 300 mM, la cantidad de Glc6P formada es superior. Esto se debe a que la glucosa actúa como inhibidor de la reacción de desfosforilación de Glc6P [17]. Para el caso de la concentración de Pi, cuanto mayor es la concentración de PPi inicial, la eficiencia de la reacción es superior dado que la enzima actúa hidrolizando su enlace fosfoéster disminuyendo su actividad sobre la Glc6P generada, logrando así mejores conversiones de Glc6P, como se esperaba debido al mecanismo de reacción de las NSAPs. Este aumento en la eficiencia de fosforilación se evidencia además en la presencia de menores cantidades de PPi remanente y mayor concentración de Pi.

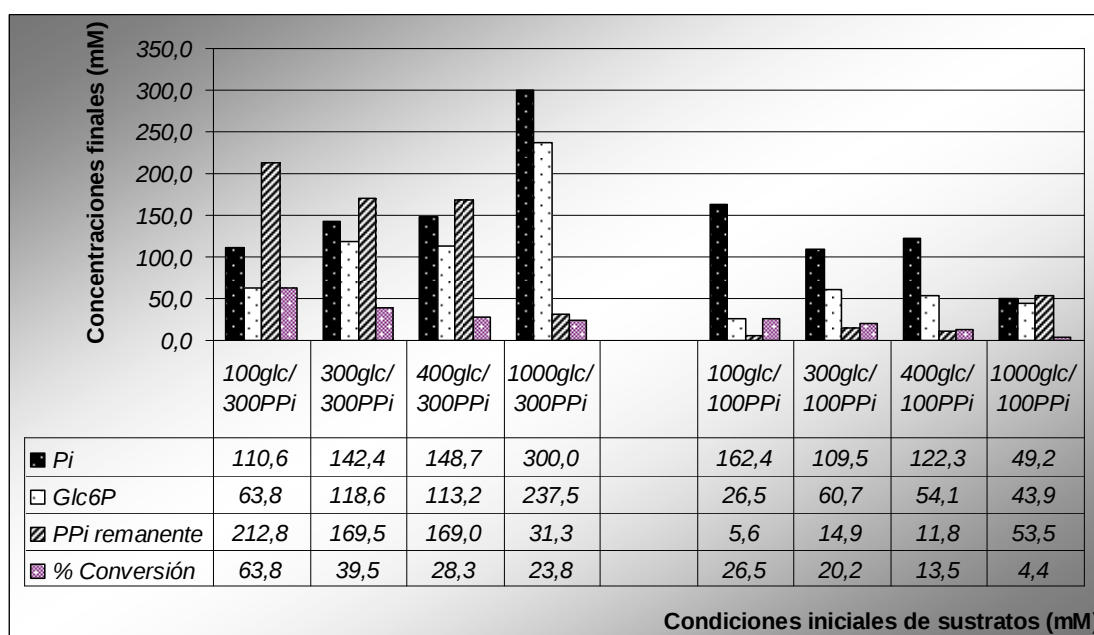


Figura 17: Análisis de la relación aceptor/dador de fosfato utilizando *Raoultella planticola* y glucosa como sustrato, a las 4h de reacción.

% conversión: $(\text{concentración Glc6P} / \text{concentración Glc}) \times 100$.

Posteriormente, y con el objetivo de mejorar la biotransformación con todos los sustratos, se procedió a realizar las biotransformaciones empleando dos microorganismos genéticamente modificados, previamente construidos en nuestro laboratorio a partir de los genes que codifican para las NSAPs de *Enterobacter aerogenes* y *Raoultella planticola*.

4.3.4. Uso de biocatalizadores genéticamente modificados

La síntesis de otros nucleósidos-5'-monofosfato como adenosina, inosina, citidina, guanosina y fludarabina se llevó a cabo anteriormente por nuestro grupo de investigación [34]. Debido a que dichos resultados fueron satisfactorios se seleccionaron dos microorganismos que presentaron actividad fosfatasa ácida en prácticamente todas las biotransformaciones ensayadas. De esta manera, NSAPs de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 y *Raoultella planticola* ATCC 33531 fueron clonadas y expresadas en *E. coli* BL21

[22]. Dichos microorganismos fueron ensayados con los sustratos de interés para este trabajo. En la Tabla 17 se comparan los resultados obtenidos con las cepas recombinantes como biocatalizadores y los logrados previamente con las cepas salvajes.

Puede evidenciarse que para la síntesis de UMP, dUMP, TMP y AraAMP se obtuvieron, en todos los casos, mayores conversiones con las cepas recombinantes comparados con los de las cepas salvajes, y si bien los mismos no son considerablemente mayores, resulta satisfactoria la reducción de los tiempos de reacción. Esto se debe a que, al no haberse efectuado ninguna mutación del sitio activo de las enzimas, los K_m se mantendrían; sin embargo su sobreexpresión y por lo tanto mayor concentración enzimática, genera mejores conversiones a partir de las mismas cantidades de sustrato ya que la disminución en el tiempo de reacción evitaría la acción de otras enzimas involucradas en caminos metabólicos alternativos.

Producto	<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048		<i>E. coli</i> BL21/ pETEapho		<i>Raoultella planticola</i> ATCC 33531		<i>E. coli</i> BL21/ pETRppho	
	mM	t (h)	mM	t (min)	mM	t (h)	mM	t (min)
UMP	2.0	24	4.7	40	5.6	24	6.7	25
TMP	1.8	50	2.5	150	2.8	12	4.6	25
dUMP	1.4	76	1.8	120	1.7	12	2.0	40
AraAMP	0.3	30	1.0	80	0.4	9	1.3	25
Rib5P	14.3	12	14.4	60	9.9	12	28.4	60
dRib5P	2.3	27	2.7	60	11.5	27	15.7	60
Glc6P	31.4	4	29.2	40	63.8	4	66.9	40
G3P	2.3	12	7.3	60	13.1	12	17.3	60
DHAP	1.9	21	2.3	60	2.3	21	6.9	60

Tabla 17: Resumen de resultados obtenidos mediante el empleo de biocatalizadores *wild type* y genéticamente modificados.

Para el caso de los azúcares fosfato también puede observarse la importante disminución en los tiempos óptimos de reacción con las cepas recombinantes y, en la mayoría de los casos, mayores concentraciones de productos. Es evidente que las biotransformaciones con glucosa como sustrato presentan los mejores resultados, lo que coincidiría con lo demostrado por *Tanaka et al.* [17] quienes determinaron que la glucosa inhibiría la desfosforilación de Glc6P mediante un mecanismo de inhibición complejo. Paralelamente, y a pesar de la gran variedad de sustratos aceptados por las NSAPs, los K_m para cada uno de ellos son diferentes.

4.4. Conclusiones

En primer lugar, en esta parte del trabajo se seleccionaron del cepario de nuestro laboratorio, diferentes bacterias del género *Enterobacteria* con actividad NSAP, entre ellas *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Escherichia*, *Citrobacter* y *Proteus*, como biocatalizadores para la síntesis de diversos productos fosforilados como UMP, dUMP, TMP y AraAMP. Las reacciones se llevaron a cabo bajo condiciones suaves de reacción y PPi, un reactivo económico y no tóxico empleado ampliamente en la industria alimenticia, como dador de fosfato. Los mejores resultados se obtuvieron a partir de uridina como sustrato y *Klebsiella sp.* CECT 367, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Raoultella planticola* ATCC 33531 y *Enterobacter gergoviae* ATCC 33028. Si bien Mihara *et al.* [39] clonaron y caracterizaron NSAPs de estas mismas especies y otras de clase A1 de alta homología (como por ejemplo de *Morganella morganii*, *Escheria Blattae* y *Providencia stuartii*), su estudio se centró en el uso de los biocatalizadores en la síntesis de inosina 5'-monofosfato.

Posteriormente, y con el fin de expandir el espectro de sustratos ensayados, se realizó un segundo *screening* de enterobacterias utilizando azúcares de 3, 5 y 6 átomos de carbono, entre ellos Rib, dRib, Glc, Glad y DHA. A partir de esta búsqueda se determinó que *Citrobacter amalonaticus* ATCC 25405, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 y *Raoultella planticola* ATCC 33531 fueron los biocatalizadores más versátiles sintetizando todos los productos fosforilados de interés. *Raoultella planticola* fue utilizada en un ensayo sencillo para la determinación de la relación aceptor/dador de fosfato empleando glucosa como sustrato. Se determinó que la relación 1:3 es la óptima para obtener mayores rendimientos dado que se encontraría favorecida la actividad fosfatasa de la NSAP de esta bacteria sobre el PPi respecto al producto, Glc6P. Se observó que la fosforilación de azúcares fue mucho más eficiente que la de los nucleósidos, especialmente utilizando *R. planticola* como biocatalizador.

Se seleccionaron *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 y *Raoultella planticola* ATCC 33531 como biocatalizadores interesantes ya que contienen NSAPs que aceptan la mayor variedad de sustratos. Esto coincide con ensayos anteriores desarrollados en nuestro grupo de trabajo en los cuales se emplearon otros nucleósidos purínicos y pirimidínicos como sustratos obteniéndose, del mismo modo, buenos resultados con ambas cepas. Estos trabajos previos incluyeron la construcción de dos microorganismos genéticamente modificados *E. coli* BL21/pETEapho y *E. coli* BL21/pETRppho a partir de los genes de las NSAPs de *Enterobacter aerogenes* y *Raoultella planticola*, respectivamente. Finalmente, se ensayaron con dichos biocatalizadores las reacciones de fosforilación de Uri, dU, Td, AraA, Rib, dRib, Glc, Glad y DHA con buenos resultados. Pudo determinarse que, para todos los casos, los tiempos de reacción respecto a los obtenidos con las dos cepas salvajes, fueron notablemente menores. Si bien *van Herk et al.* [28] estudiaron la fosforilación de diversos alcoholes y carbohidratos, utilizaron una fosfatasa ácida purificada aislada de *Shigella flexneri*, en lugar de células enteras. En su trabajo obtuvieron 60 mM, 2.5 mM y 5 mM de Glc6P, Rib5P y DHAP, respectivamente, en 200 minutos a partir de 100 mM de los correspondientes sustratos. En nuestros ensayos se superaron dichas cantidades así como se disminuyeron los tiempos de reacción.

En conclusión, en esta parte del trabajo se obtuvieron resultados satisfactorios debido a que, se logró producir no sólo UMP, sino también una amplia variedad de compuestos fosforilados utilizando células enteras de enterobacterias con actividad NSAP. Algunas de las mezclas de reacción conteniendo UMP se utilizaron en el siguiente paso de obtención de UDP, correspondiente al Capítulo 4 de este trabajo, siguiendo los objetivos específicos planteados en esta Tesis Doctoral.

Bibliografía

- [1] Stadtman, T. C. (1961). Alkaline phosphatases, pp. 55-71, "The Enzymes", 2nd edition, Boyer, P. D., Lardy, H. and Myrbäck, K. (Eds.), vol. 5, Academic Press, New York.
- [2] Beacham I. R. (1979). Periplasmic enzymes in gram-negative bacteria *Int. J. Biochem.*, **10**, 877–883.
- [3] Wanner, B. L. (1996). Phosphorous assimilation and control of the phosphate regulon, pp. 1357-1381, "*Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology", 2nd edition, Neidhardt, F. C., Curtiss III, R., Ingraham, J. L., Lin, E. C. C., Low, K. B., Magasanik, B., Reznikoff, W. S., Riley, M., Schaechter, M. and Umberger, H. E. (Eds.), Washington, D.C.
- [4] Reilly, T. J.; Baron, G. S.; Nano, F. & Kuhlenschmidt, M. S. (1996). Characterization and sequencing of a respiratory burst-inhibiting acid phosphatase from *Francisella tularensis*. *J. Biol. Chem.*, **271**, 10973–10983.
- [5] Guan K. & Dixon J. E. (1990). Protein tyrosine phosphatase activity of an essential virulence determinant in *Yersinia*. *Science*, **249**, 553–556.
- [6] Stock, J.B.; Surette, M.G.; Levit, M. & Park, P. (1995). Two component signal transduction systems: Structure-function relationships and mechanisms of catalysis, pp 25-51, "Two-Component Signal Transduction", Hoch, J.A., Silhavy, T.J. (Eds.). ASM Press, Washington, DC.
- [7] Kier, L. D.; Weppelman, R. & Ames B. N. (1977). Regulation of two phosphatases and a cyclic phosphodiesterase of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.*, **130**, 399–410.
- [8] Uerkvitz, W. & Beck, C. F. (1981). Periplasmic phosphatases in *Salmonella typhimurium* LT2. A biochemical, physiological, and partial genetic analysis of three nucleoside monophosphate dephosphorylating enzymes. *J. Biol. Chem.*, **256**, 382–389.
- [9] Rossolini, G. M.; Thaller, M. C.; Pezzi, R. & Satta, G. (1994). Identification of an *Escherichia coli* periplasmic acid phosphatase containing a 27 kDa-polypeptide component. *FEMS Microbiol. Lett.*, **118**, 167–174.
- [10] Thaller, M. C.; Berlutti, F.; Schippa, S.; Lombardi, G. & Rossolini, G. M. (1994). Characterization and sequence of PhoC, the principal phosphate-irrepressible acid phosphatase of *Morganella morganii*. *Microbiol.*, **140**, 1341–1350.
- [11] Thaller, M. C.; Lombardi, G.; Berlutti, F.; Schippa, S. & Rossolini G. M. (1995). Cloning and characterization of the NapA acid phosphatase/phosphotransferase of *Morganella morganii*:

- p>identification of a new family of bacterial acid-phosphatase-encoding genes.
- Microbiol.*
- ,
- 141**
- , 147–154.
- [12] Thaller, M. C.; Schippa, S.; Bonci, A.; Cresti, S. & Rossolini G. M. (1997). Identification of the gene (aphA) encoding the class B acid phosphatase/phosphotransferase of *Escherichia coli* MG1655 and characterization of its product. *FEMS Microbiol. Lett.*, **146**, 191–198.
- [13] Thaller, M. C.; Schippa, S.; Iori, P.; Berlutti, F. & Rossolini G.M. (1997). Cloning of a *Chryseobacterium meningosepticum* acid phosphatase-encoding gene: Identification of a family of outer membrane bacterial phosphatases. Abstract 97th General Meeting of American Society for Microbiology, Miami Beach, FL, USA, p. 286.b.
- [14] Hemrika, W.; Renirie, R.; Dekker, H. L.; Barnett, P.; Wever, R. (1997). From phosphatases to vanadium peroxidases: a similar architecture of the active site. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **94**, 2145–2149.
- [15] Renirie, R.; Hemrika, W.; Wever, R. (2000). Peroxidase and phosphatase activity of active-site mutants of vanadium chloroperoxidase from the *Fungus curvularia inaequalis*. Implications for the catalytic mechanisms. *J. Biol. Chem.*, **275**, 11650–11657.
- [16] Asano, Y.; Mihara, Y.; Yamada, H. (1999). A new enzymatic method of selective phosphorylation of nucleosides. *J. Mol. Catal. B Enzym.*, **6**, 271–277.
- [17] Tanaka, N.; Hasan, Z.; Hartog, A. F.; van Herk, T. & Wever, R. (2003). Phosphorylation and dephosphorylation of polyhydroxy compounds by class A bacterial acid phosphatases. *Org. Biomol. Chem.*, **1**, 2833–2839.
- [18] Axelrod, B. (1948). A study of the mechanism of "phospho-transferase" activity by use of radioactive phosphorus. *J. Biol. Chem.*, **176**, 295–298.
- [19] Appleyard, J. (1948). The effect of alcohols on the hydrolysis of sodium phenolphthalein diphosphate by prostatic extracts. *Biochem. J.*, **42**, 596–597.
- [20] Mihara, Y.; Utagawa, T.; Yamada, H.; Asano, Y. (2000). Phosphorylation of nucleosides by the mutated acid phosphatase from *Morganella morganii*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 2811–2816.
- [21] Rossolini, G. M.; Schippa, S.; Riccio, M. L.; Berlutti, F.; Macaskie L. E. & Thaller, M. C. (1998). Bacterial nonspecific acid phosphohydrolases: physiology, evolution and use as tools in microbial biotechnology. *Cell. Mol. Life Sci.*, **54**, 833–85.

- [22] Bloch, K. C.; Nadarajah, R. & Jacobs, R. (1997). *Chryseobacterium meningosepticum*: an emerging pathogen among immunocompromised adults. Report of 6 cases and literature review. *Medicine*, **76**, 30–41.
- [23] Green, B. A.; Farley, J. E.; Quinn-Dey, T.; Deich, R. A. & Zlotnick G. W. (1991). The e (P4) outer membrane protein of *Haemophilus influenzae*: biologic activity of anti-e serum and cloning and sequencing of the structural gene. *Infect. Immun.*, **59**, 3191-3198.
- [24] Gase, K.; Liu, G.; Bruckmann, A.; Steiner, K.; Ozegowski, J. & Malke, H. (1997). The lppC gene of *Streptococcus equisimilis* encodes a lipoprotein that is homologous to the e (P4) outer membrane protein from *Haemophilus influenzae*. *Med. Microbiol. Immunol.*, **186**, 63–73.
- [25] Wallin, B. K. & Arion, W. J. (1972). The requirement for membrane integrity in the inhibition of hepatic glucose 6-phosphatase by sulfhydryl reagents and taurocholate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **48**, 694-699.
- [26] Dissing, K.; Uerkvitz, W. (2006). Class B nonspecific acid phosphatase from *Salmonella typhimurium* LT2 Phosphotransferase activity, stability and thiol group reactivity. *Enzyme Microb. Technol.*, **38**, 683-688.
- [27] Basnakova, G.; Stephens, E. R.; Thaller, M.C.; Rossolini, G. M.; Macaskie, L.E. (1998). The use of *Escherichia coli* bearing a phoN gene for the removal of uranium and nickel from aqueous flows. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **50**, 266-272.
- [28] van Herk, T.; Hartog, A. F.; van der Burg, A. M.; Wever, R. (2005). Regioselective phosphorylation of carbohydrates and various alcohols by bacterial acid phosphatases; Probing the substrate specificity of the enzyme from *Shigella flexneri*. *Adv. Synth. Catal.*, **347**, 1155-1162.
- [29] Lee, H. C.; Lee, S.; Sohng, J. K. & Liou, K. (2004). One-pot enzymatic synthesis of UDP-D-glucose from UMP and glucose-1-phosphate using an ATP regeneration system. *J. Biochem. Mol. Biol.*, **37**, 503-506.
- [30] Van Herk, T.; Hartog, A. F.; Schoemaker, H. E. & Wever, R. (2006). Simple enzymatic in situ generation of dihydroxyacetone phosphate and its use in a cascade reaction for the production of carbohydrates: increased efficiency by phosphate cycling. *J. Org. Chem.*, **71**, 6244-6247.
- [31] Lewkowicz, E. S.; Iribarren, A. M. (2006). Nucleoside phosphorylases. *Curr. Org. Chem.*, **10**, 1197-1215.
- [32] Taverna-Porro, M.; Bouvier, L. A.; Pereira, C. A.; Montserrat, J. M.; Iribarren, A. M. (2008). Chemoenzymatic preparation of nucleosides from furanoses. *Tetrahedron Lett.*, **49**, 2642–2645.

- [33] Valino, A. L.; Palazzolo, M.; Iribarren, A. M.; Lewkowicz, E. (2012). Selection of a new whole cell biocatalyst for the synthesis of 2-deoxyribose 5-phosphate. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **166**, 300-308.
- [34] Medici, R.; Garaycochea, J. I.; Valino, A. L.; Iribarren, A. (2013). A comparative study on phosphotransferase activity of acid phosphatases from *Raoultella planticola* and *Enterobacter aerogenes* on nucleosides, sugars, and related compounds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, publicado on line el 31 de agosto de 2013, DOI 10.1007/s00253-013-5194-1.
- [35] Sotirhos, N.; Herslöf, B. & Kenne, L. (1986). Quantitative analysis of phospholipids by ³¹P-NMR. *J. Lipid. Res.*, **27**, 386-392.
- [36] Crans, D. C. and Whitesides, G. M. (1985). Glycerol Kinase: Substrate Specificity. *J. Am. Soc.*, **107**, 7008-7018.
- [37] Barany, M.; Glonek, T. (1982). Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance of contractile systems. *Methods Enzymol.*, **85**, 624-676.
- [38] Ishikawa, K.; Mihara, Y.; Shimba, N. O.; Kawasaki, H.; Suzuki, E. & Asano, Y. (2002). Enhancement of nucleoside phosphorylation activity in an acid phosphatase. *Protein eng.*, **15**, 539-543.
- [39] Mihara, Y.; Utagawa, T.; Yamada, H.; Asano, Y. (2001). Acid phosphatase/phosphotransferases from enteric bacteria. *J. Biosci. Bioeng.*, **92**, 50-54.
- [40] Birichevskaya, L. L.; Kvach, S. V.; Sivets, G. G.; Kalinichenko, E. N.; Zinchenko, A. I.; Mikhailopulo, I. A. (2007). A comparison of enzymatic phosphorylation and phosphatidylation of β -L- and β -D-nucleosides. *Biotechnol. Lett.*, **29**, 585-591.

Capítulo 5

Obtención de nucleósidos 5'-difosfato

5.1. Introducción

Los nucleósidos 5'-difosfato (NDP) son precursores de NDP-*D*-glucosa y sus derivados, compuestos utilizados como dadores del azúcar en la biosíntesis de carbohidratos, con lo cual su síntesis se encuentra bastante estudiada. En particular, uridina 5'-difosfato (UDP) es utilizada para tal fin así como intermediario en la obtención de nucleótidos y desoxinucleótidos. La síntesis química de los NDP es compleja con lo cual el uso de nuevas metodologías que permitan obtenerlos de modo más sencillo resulta interesante.

5.1.1. Nucleósido monofosfato quinasas

Las nucleósido monofosfato quinasas (NMPKs, del inglés *nucleoside monophosphate kinases*) son enzimas claves en el metabolismo de nucleótidos y representan una familia homogénea de catalizadores [1] debido a que provendrían de un ancestro común. Estas enzimas catalizan la transferencia reversible de un grupo γ -fosforilo de un nucleósido trifosfato, generalmente adenosina 5'-trifosfato (ATP), sobre un nucleósido monofosfato particular. Los nucleósidos difosfato generados, luego son fosforilados (y eventualmente reducidos) para producir nucleósidos trifosfato, precursores de ARN y ADN. Las NMPKs más conocidas son las que aceptan los correspondientes compuestos 5'-monofosfato de timidina, adenosina, guanosina, uridina y citidina.

Son enzimas comunmente encontradas tanto en células eucariotas como en procariotas pero con ciertas diferencias estructurales y funcionales importante. Por ejemplo,

en bacterias existen dos enzimas diferentes específicas para uridina 5'-monofosfato (UMP) y citidina 5'-monofosfato (CMP). La uridina monofosfato quinasa (UMPK) bacteriana es hexamérica y fosforila UMP específicamente utilizando ATP como dador de fosfato y es dependiente de Mg^{2+} [2]. Esta enzima puede ser también activada por guanosina 5'-trifosfato (GTP) y es inhibida por UTP. Por otra parte, la citidina monofosfato quinasa (CMPK) de bacterias es monomérica, como la mayoría de las NMPKs, con una estructura tridimensional similar a las del resto de las enzimas de esta familia [3] y acepta específicamente CMP como sustrato. Por el contrario, tanto UMPK como la CMPK de eucariotas representan una excepción respecto a la especificidad de las NMPK por el nucleótido aceptor [3] y ambas quinasas fosforilan eficientemente tanto UMP como CMP. *Jong et al.* [4] han reportado la síntesis de diversos nucleósidos difosfato utilizando la UMPK de *Saccharomyces cerevisiae* demostrando así su baja especificidad por sustrato.

5.1.1.2. Uridina-5'-monofosfato quinasa de *Saccharomyces cerevisiae*

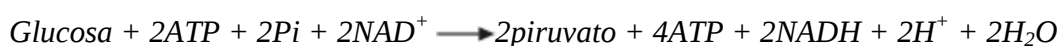
La UMPK de *Saccharomyces cerevisiae* se localiza en el núcleo y citoplasma celular y cataliza la reacción $Mg\cdot ATP + NMP \rightleftharpoons Mg\cdot ADP + NDP$ con moderada especificidad por UMP. Esta enzima requiere iones divalentes para su actividad como Mg^{2+} ó Mn^{2+} y posee actividad en un amplio rango de pH, desde 6.0 hasta 10.0 preferentemente en *buffer* fosfato o Tris-HCl. Además, acepta como sustratos una amplia gama de NMP, presentando mayor actividad con UMP, dUMP y CMP [4]. *Müller-Dieckmann & Schulz* [5] demostraron que esta enzima cambia su conformación al unirse al sustrato permitiendo así la interacción con el dador de fosfato de manera eficiente.

Asimismo se conoce que *Saccharomyces cerevisiae* posee no sólo UMPK/CMPK sino también timidilato, adenilato, desoxiadenilato y guanilato quinasas (TMPK, AMPK, dAMPK y GMPK, respectivamente) [6-10]. Estas enzimas muestran también una baja selectividad por sustrato haciendo de este sistema una alternativa interesante para sintetizar diversos productos nucleosídicos difosforilados.

5.1.2. *Saccharomyces cerevisiae* y su uso como sistema de producción de ATP

Saccharomyces cerevisiae es un hongo unicelular utilizado industrialmente en la fabricación de pan, cerveza y vino. Las levaduras pueden utilizar como fuente de carbono diversos compuestos tales como alcoholes, ácidos orgánicos y amino ácidos para su crecimiento, sin embargo utilizan preferentemente azúcares. Su aplicación dentro de la industria alimenticia se debe a su capacidad de generar etanol y dióxido de carbono durante el proceso de fermentación alcohólica. Este proceso se lleva a cabo cuando la levadura se encuentra en un medio rico en azúcares, como glucosa, manosa, galactosa así como pentosas en condiciones anaeróbicas. En condiciones de escasez de nutrientes, las levaduras utilizan otras rutas metabólicas que les permiten obtener un mayor rendimiento energético, y por tanto no realizan fermentación.

ECUACIÓN DE LA GLUCÓLISIS



Por otra parte, durante la glucólisis, proceso previo a la fermentación, se generan dos moléculas de ácido pirúvico, dos de NADH y cuatro de ATP por molécula de glucosa [11]. Sin embargo, en la primer etapa de esta ruta, se consumen dos moléculas de ATP en la síntesis de los intermediarios glucosa 6-fosfato y fructosa 1,6-difosfato, siendo la ganancia neta de dos moléculas del compuesto fosforilado por cada molécula de glucosa.

En particular, el ATP es esencial en muchos caminos metabólicos y es utilizado a nivel industrial [12] para la producción de una amplia variedad de metabolitos mediante el uso de microorganismos. Además, es ampliamente utilizado en el área clínica en tratamientos de enfermedades vasculares, de corazón y cerebro como un importante dador energético. Las levaduras pueden generar, en un medio rico en glucosa, una pequeña

cantidad de ATP pero vital para el microorganismo y suficiente para ser empleado en otros procesos enzimáticos. Se desarrollaron métodos biocatalíticos, los cuales incluyen técnicas de ingeniería genética y enzimática, mediante los cuales se obtiene ATP a partir de AMP o adenosina empleando células enteras de *Saccharomyces cerevisiae*, aumentando significativamente su rendimiento [13-15]. Yao *et al.* [16] diseñaron un sistema de regeneración energética eficiente a través del cual, por fermentación alcohólica, se genera NAD^+ , necesario para incrementar el rendimiento de ATP, y utiliza acetaldehído como aceptor de electrones [17]. Mediante esta metodología, en condiciones fisiológicas normales para las levaduras, el ATP generado no puede ser excretado a través de la membrana, debido a su carga negativa, y se acumula dentro de las células con lo cual deben emplearse agentes porantes.

En base a lo expuesto anteriormente, en esta parte del trabajo se aprovechó la capacidad de las células de levadura de producir, a partir de glucosa, cantidades suficientes de ATP para ser utilizado posteriormente por las NMPKs, particularmente la UMPK, para la síntesis de UDP a partir de UMP. Para ello se empleó un extracto de levadura de pan el cual contiene tanto las enzimas de la vía glucolítica como las nucleosido monofosfato quinasas activas, evitando el uso de agentes porantes, siendo una metodología sencilla, con condiciones suaves de reacción y ambientalmente amigable. Esta metodología se utilizó también para la obtención de otros derivados difosforilados. Además se evaluó la aplicación de reacciones consecutivas utilizando mezclas de reacción conteniendo UMP obtenidas según los capítulos anteriores, alcanzando resultados satisfactorios.

5.2. Materiales y Métodos

5.2.1. Materiales

Todos los productos empleados fueron de calidad analítica. Los sustratos y reactivos de las reacciones se compraron en Sigma-Aldrich. Las drogas para los medios de cultivo fueron de Anedra, Britania y Sigma-Aldrich. Los solventes utilizados para el análisis cualitativo, el revelado y para HPLC fueron de Sintorgan, Biopack y Carlo Erba, respectivamente.

5.2.2. Metodología

5.2.2.1. Cultivo y preparación del biocatalizador

Se creció levadura de pan en 250 mL de medio líquido M3 con la siguiente composición (p/v): peptona caseína 1%, extracto de levadura 0.5%, glucosa 0.5%, NaCl 0.5%, en agua destilada, y bajo las condiciones siguientes pH 7.2, 37°C y 200 rpm durante 24h. Luego, se centrifugó a 5000 rpm a 4°C durante 10 minutos. La pasta húmeda obtenida fue transferida a un cristalizador y secada por corriente de aire. La pasta seca se procesó mecánicamente con mortero y de este modo se obtuvo el extracto de levadura utilizado como biocatalizador.

5.2.2.2. Biotransformación estándar

El medio de reacción estándar (MRL) consistió en glucosa 10 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 20 mM, uridina 5'-monofosfato (UMP) 4 mM y 10% (p/v) de biocatalizador en *buffer* fosfato 0.4 M pH 7.0, 37°C y 200 rpm. Se tomaron alícuotas a diferentes tiempos, se llevaron a

baño de agua a 100°C durante 1 minuto, se centrifugaron a 10000 rpm por 3 minutos y los sobrenadantes se almacenaron a -20°C para su posterior análisis.

Esta misma metodología se siguió al utilizar otros sustratos como citidina, inosina, guanosina, timidina, fludarabina y adeninarabinósido 5'-monofosfato.

5.2.2.3. Reacciones biocatalizadas consecutivas

Las mezclas en las que se obtuvo UMP utilizando *Brevibacterium ammoniagenes* y *Raoultella planticola* como biocatalizadores (detalladas en los Capítulos 2 y 3, respectivamente) se emplearon en esta parte del trabajo en reacciones consecutivas para la obtención de UDP. Para ello, 1 mL de cada una de las mezclas de reacción seleccionadas se acondicionó de modo tal de alcanzar las condiciones de reacción óptimas para la síntesis de UDP.

Las mezclas seleccionadas fueron:

a) Biotransformación utilizando *Raoultella planticola* a las 24h de reacción. Esta mezcla contenía: UMP 5.6 mM, uridina 68.6 mM, fosfato inorgánico (de la hidrólisis de PPI) 514 mM, MgCl₂ 0.2 mM, acetato de sodio (en forma de *buffer*) pH 4.0. Para adecuar la mezcla a la reacción de síntesis de UDP, a 870 µL de mezcla se le adicionaron 38 µL de NaOH 10 N, 223 µL de H₂O destilada, glucosa y MgSO₄·7H₂O hasta 100 y 20 mM de concentración final, respectivamente.

b) Biotransformación IIA a las 24h de reacción. Esta reacción se llevó a cabo utilizando *Brevibacterium ammoniagenes* y ácido orótico como sustrato. A las 24h contenía: UMP 5.2 mM, ácido orótico 33 mM, fosfato inorgánico (en forma de sal de potasio) 281 mM, MgCl₂ 20 mM, Tritón X-100 0.6% (v/v) en *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 7.5. Para adecuar la mezcla a la reacción de síntesis de UDP, a 1 mL de mezcla se le adicionaron 310 µL de *buffer* fosfato de sodio 752 mM pH 7.0, glucosa y MgSO₄·7H₂O hasta 100 y 20 mM de concentración final, respectivamente.

Biotransformación IIB: Esta reacción se llevó a cabo utilizando *Brevibacterium ammoniagenes* y ácido orótico como sustrato. A las 10h contenía: UMP 5 mM, ácido orótico 33 mM, fosfato inorgánico (en forma de sal de sodio) 258 mM, MgCl_2 20 mM, glucosa 128 mM, Tritón X-100 0.6% (v/v) en *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 7.5. Para adecuar la mezcla a la reacción de síntesis de UDP, a 1 mL de mezcla se le adicionaron 238 μL de *buffer* fosfato de sodio 1.04 M pH 7.0 y $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ hasta 20 mM de concentración final. En este caso no fue necesario el agregado de glucosa debido a que, mediante el agregado del *buffer*, la concentración final de la misma es 103 mM siendo 100 mM la concentración óptima.

c) Biotransformación III a las 24h de reacción. Esta reacción se llevó a cabo utilizando *Brevibacterium ammoniagenes* y uracilo como sustrato. A las 24h contenía: UMP 10 mM, uracilo 10.4 mM, fosfato inorgánico (en forma de sal de sodio) 121 mM, glucosa 74 mM, xileno 1.5% (v/v) y pH 7.2. Para adecuar la mezcla a la reacción de síntesis de UDP, a 1 mL de mezcla se le adicionaron 1.4 mL de *buffer* fosfato de sodio 600 mM pH 7.0, glucosa y $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ hasta 100 y 20 mM de concentración final, respectivamente.

5.2.2.4. Análisis cuali-cuantitativo

Cromatografía en capa delgada

El análisis y detección de los productos de reacción se llevaron a cabo mediante CCD, utilizando placas de aluminio de silica gel 60F₂₅₄ y n-propanol/ NH_4OH / H_2O 6.6/5.0/1.0 (v/v/v) como fase móvil.

Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

El análisis y cuantificación de productos se realizó mediante HPLC utilizando un equipo Gilson con detector UV (254 nm), inyector automático y columna GraceSmart, C18 fase reversa, 150 mm x 4.6 mm, 5 μm . El sistema de desarrollo utilizado fue 15 minutos *buffer* TEAA 100 mM pH 7.0 100%, 2 minutos hasta TEAA/ACN (98/2 vol/vol), 10

minutos TEAA/ACN (98/2 vol/vol)) con flujo 0.9 mL/min, a temperatura ambiente. En la Tabla 18 se muestran los tiempos de retención de los reactivos, productos y algunos de los subproductos de reacción.

Compuesto	Tr (min)
Uridina 5'-monofosfato (UMP)	7.74
Uridina 5'-difosfato (UDP)	16.10
Uridina	8.66
Uracilo	4.66

Tabla 18. Tiempos de retención de los reactivos, productos y subproductos obtenidos en la reacción de fosforilación de UMP utilizando extracto de levadura de pan.

HPLC-MS

La verificación de la identidad del producto de reacción UDP se realizó mediante HPLC/MS (*mass spectrometry*) utilizando un equipo Agilent 1100 con inyector manual, bomba binaria y detector cuadrupolar, con interfase electrospray en modo negativo. Se utilizó una columna GraceSmart, C18 fase reversa, 150 mm x 4.6 mm, 5 μ m. El sistema de desarrollo utilizado fue 15 minutos *buffer* TEAA 100 mM pH 7.0 100%, 2 minutos hasta TEAA/ACN (98/2 vol/vol), 10 minutos TEAA/ACN (98/2 vol/vol)) con flujo 0.9 mL/min, a temperatura ambiente. En las Figuras 18, 19 y 20 se observa el cromatograma obtenido mediante HPLC, y el análisis de los picos correspondientes a UMP y UDP, respectivamente por MS. El pico del ion molecular esperado para UMP (M^-) era de 324 m/z y se observó mayoritariamente un pico correspondiente al ion $(M-H)^-$ de 323 m/z y uno más pequeño correspondiente al M^- . El pico del ion molecular esperado para UDP (M^-) era de 404 m/z y se observó mayoritariamente un pico correspondiente al ion $(M-H)^-$ de 403 m/z y uno más pequeño correspondiente al M^- .

Cuantificación de fosfato inorgánico

La determinación cuantitativa de fosfato inorgánico (Pi) en las mezclas de reacción se realizó mediante el método del molibdato de amonio [18]. Esta metodología requirió de la preparación del reactivo que consistió en 1 volumen de una solución 4.2% (p/v) de molibdato de amonio en HCl 5 N y 3 volúmenes de verde de malaquita 0.2% (p/v) en agua. Se dejó reposar 30 minutos, se centrifugó para descartar el reactivo en exceso precipitado y la solución obtenida se utilizó para la determinación requerida. La metodología fue puesta a punto para concentraciones 0-0.27 g/mL de KH_2PO_4 . Se preparó una solución stock 2.70 g/mL de KH_2PO_4 y se realizó una curva de calibración, efectuando inicialmente una dilución 1/10 y luego 9 diluciones seriadas, por triplicado, de las cuales se tomaron 20 μL y se agregaron a 120 μL de reactivo sobre microplacas de 96 wells. Posteriormente se midió absorbancia a 660 nm utilizando la lectora de microplacas mencionada anteriormente. Para las mezclas de reacción se procedió de igual modo, para lo cual se calcularon previamente las diluciones adecuadas de modo que las concentraciones de Pi se encontraran dentro del rango lineal del método.

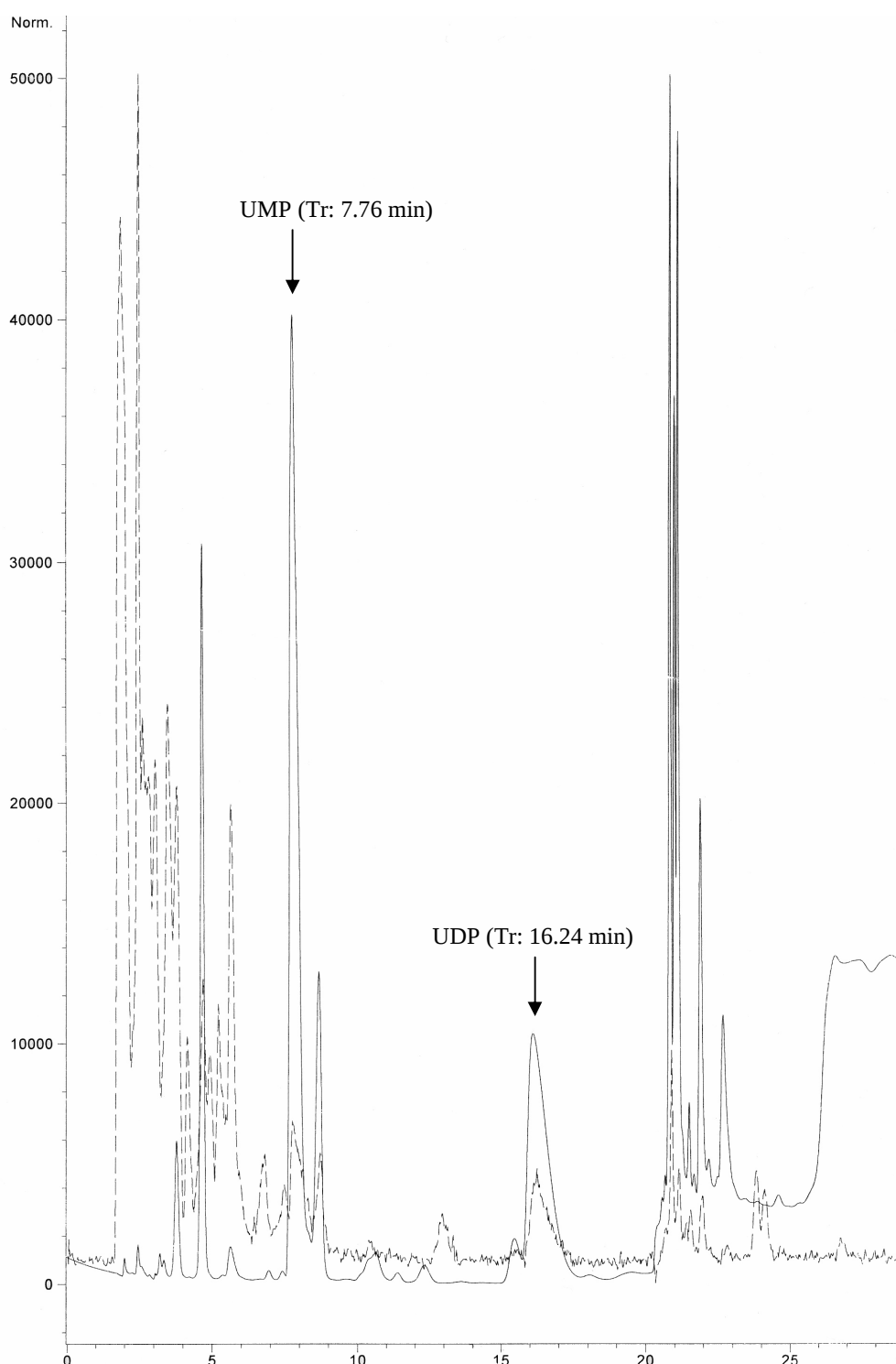


Figura 18: Cromatograma de la mezcla de reacción de síntesis de UDP a partir de UMP utilizando levadura como biocatalizador. La línea completa corresponde al cromatograma obtenido a 260 nm; la línea punteada corresponde al análisis de masa por MS, API-ES en modo negativo.

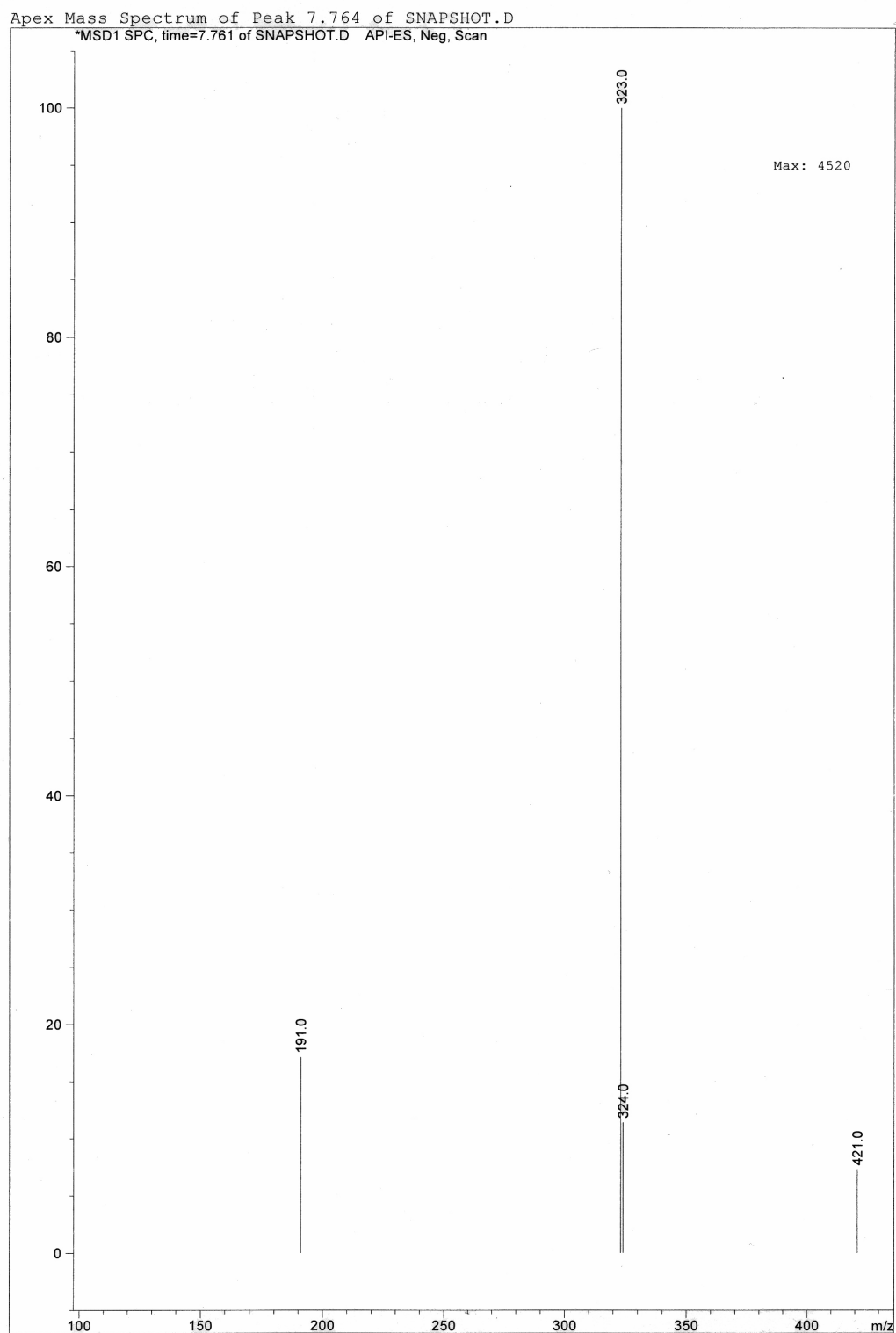


Figura 19: Espectro de masas del pico correspondiente a UMP ($(M)^+$ 324 m/z , $(M-H)^+$ 323 m/z) de la mezcla de reacción de síntesis de UDP.

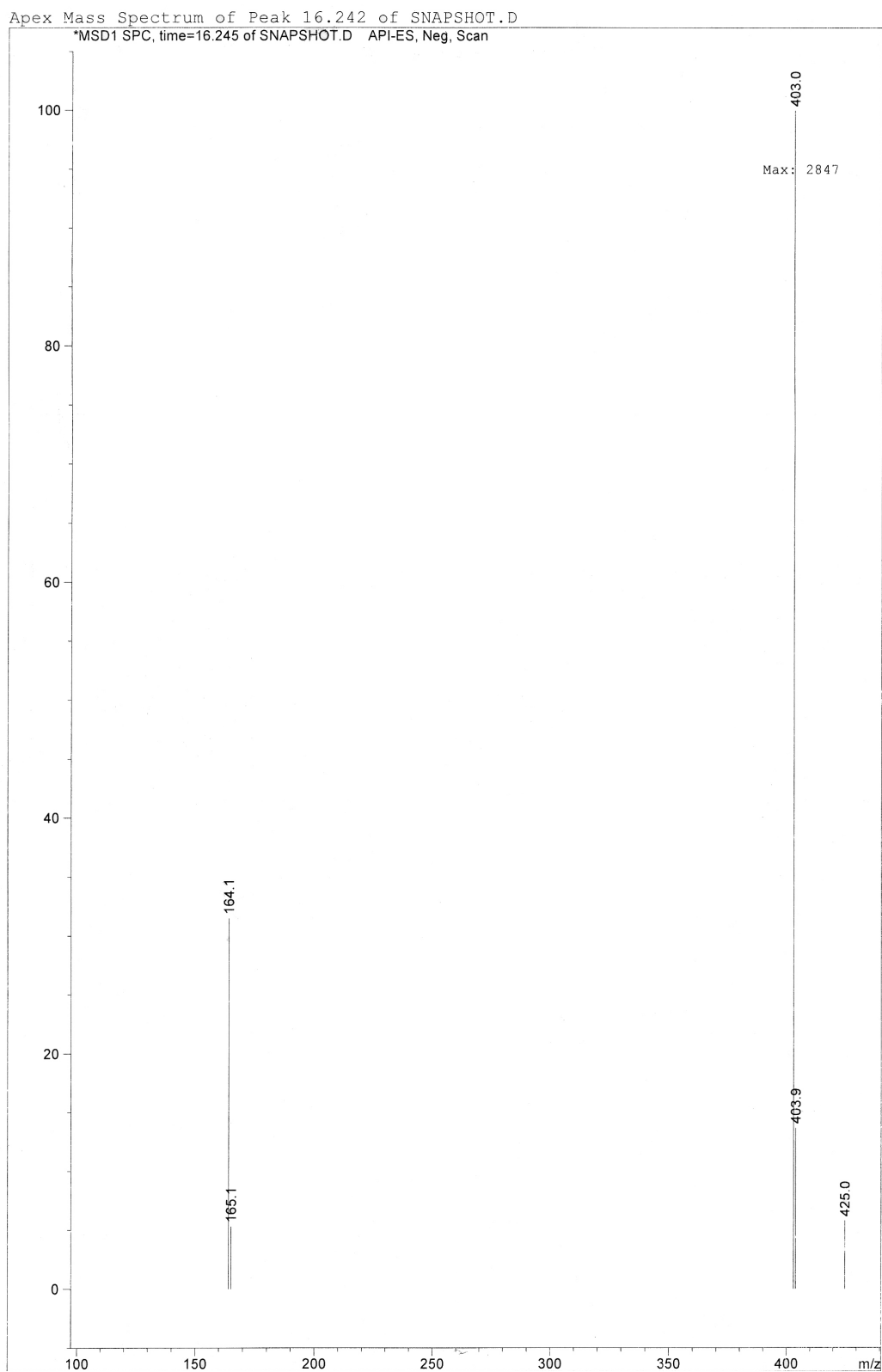


Figura 20: Espectro de masas del pico correspondiente a UDP ($(M)^+$ 403.9 m/z , $(M-H)^+$ 403 m/z) de la mezcla de reacción de síntesis de UDP.

5.3. Resultados y discusión

5.3.1. Preparación del biocatalizador

En base a datos bibliográficos que exponen la presencia de diferentes NMPKs en *Saccharomyces cerevisiae* y en particular UMPK, se procedió a evaluar su actividad como biocatalizador, utilizando inicialmente UMP comercial como sustrato [1,4].

De esta manera, se utilizó levadura de pan comercial cultivada en un medio con alta concentración de glucosa como fuente de carbono y energía. Posteriormente se centrifugó el cultivo, la pasta obtenida se secó en desecador por 24h y el polvo resultante de la ruptura física en mortero se empleó directamente como biocatalizador para la síntesis de UDP así como de diversos nucleósidos 5'-difosforilados.

5.3.2. Obtención de uridina-5'-difosfato

Para llevar a cabo la síntesis de UDP se utilizó el extracto celular obtenido en un medio de reacción conteniendo: *buffer* fosfato 0.4 M pH 7.0, el cual es el óptimo para el funcionamiento de la UMPK [4]; Mg^{2+} en forma de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, un cofactor esencial para la síntesis de ATP [19] y necesario para la actividad de enzimas clave de la glucólisis, las fosfofructoquinasa y la piruvato quinasa y, además forma la sal de Mg^{2+} del ATP requerida por la UMPK para su óptima actividad [5]; glucosa en concentración 10 mM ya que a través de la glucólisis se produce el ATP necesario para la reacción. Este compuesto de alta energía es fundamental para la fosforilación de los sustratos.

Así, se ensayó la síntesis de UDP tomándose muestras a los 60, 75, 90, 105, 120 y 240 minutos. En la Figura 21 se grafican los porcentajes de conversión obtenidos mediante HPLC, determinándose que el máximo, 30%, se logró a los 90min.

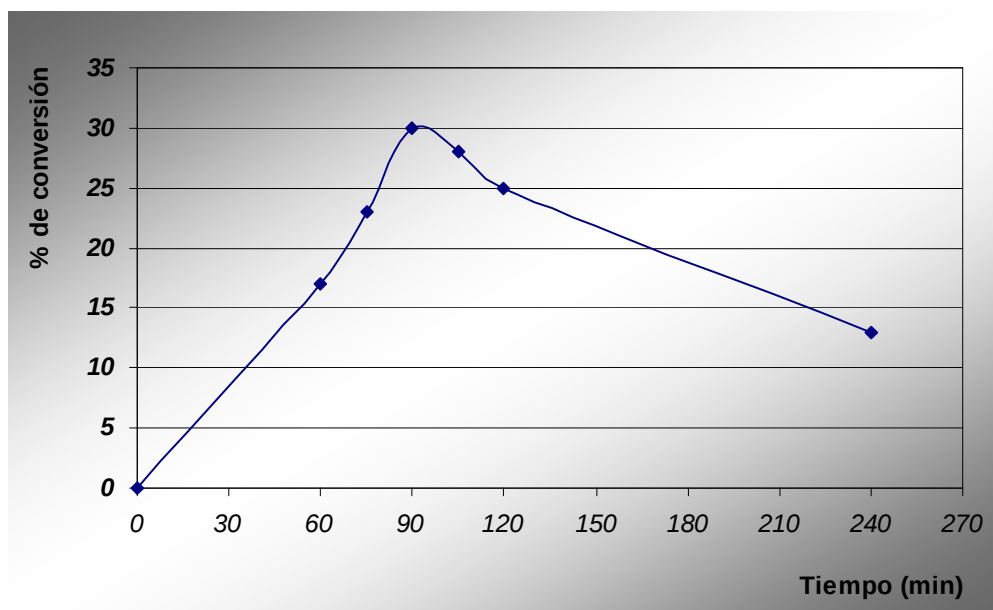


Figura 21: Porcentajes de conversión de UDP obtenidos con un extracto de levadura de pan y UMP como sustrato.

*% de conversión: $(\text{área UDP}/\text{área UMP}) \times 100$.

Posteriormente, se confirmó la presencia del producto en el tiempo óptimo de reacción mediante espectrometría de masas acoplada a HPLC (HPLC-MS). En el cromatograma obtenido por HPLC (Figura 18) puede observarse UMP y UDP con un Tr de 7.76 y 16.24 minutos, respectivamente. El posterior análisis de masas del pico correspondiente a UMP (Figura 19), mostró un pico de 323 m/z correspondiente al ión $(M-H)^-$ y uno de menor intensidad de 324 m/z correspondiente al ión $(M)^-$. Para el caso del UDP (Figura 20) se observó mayoritariamente un pico de 403 m/z correspondiente al ion $(M-H)^-$ y se observó uno más pequeño con 404 m/z correspondiente al $(M)^-$. De esta manera se confirmó la identidad del producto obtenido y se continuó con los ensayos.

Seguidamente, y con el fin de incrementar los rendimientos obtenidos, se evaluó el uso de diferentes concentraciones de glucosa en el medio de reacción de modo de generar *in situ* mayores concentraciones de ATP y consecuentemente, mayor cantidad de UDP. De esta manera se prepararon 4 mezclas de reacción las cuales contenían 10, 50, 100 y 500

mM de glucosa cada una y se observó, mediante análisis semicuantitativo, que la concentración óptima era 100 mM. Por análisis cuantitativo posterior se determinó que el porcentaje de conversión alcanzado fue del 52% respecto al UMP inicial. De esta manera la concentración de glucosa empleada para el resto de los ensayos con UMP fue de 100 mM.

La Figura 22 muestra el cromatograma obtenido para la biotransformación con 100 mM de glucosa a los 90 minutos de reacción y UMP comercial. Puede observarse la presencia de UDP representado por el pico N° 15 correspondiente a un Tr de 11.61 min. Asimismo el sustrato, UMP, presenta un Tr de 6.02 min (Pico N° 10) y además pueden observarse los subproductos uridina y uracilo con Tr 7.91 (Pico N° 13) y 3.86 min (Pico N° 7), respectivamente. Estos últimos compuestos son generados *in situ* mediante la acción de fosfatasas, sobre el UMP, y nucleósido fosforilasas, sobre uridina, presentes en el extracto de levadura [21]. Los picos con Trs superiores a 20 min corresponden a adenosina y sus correspondientes nucleótidos como ATP, ADP y AMP.

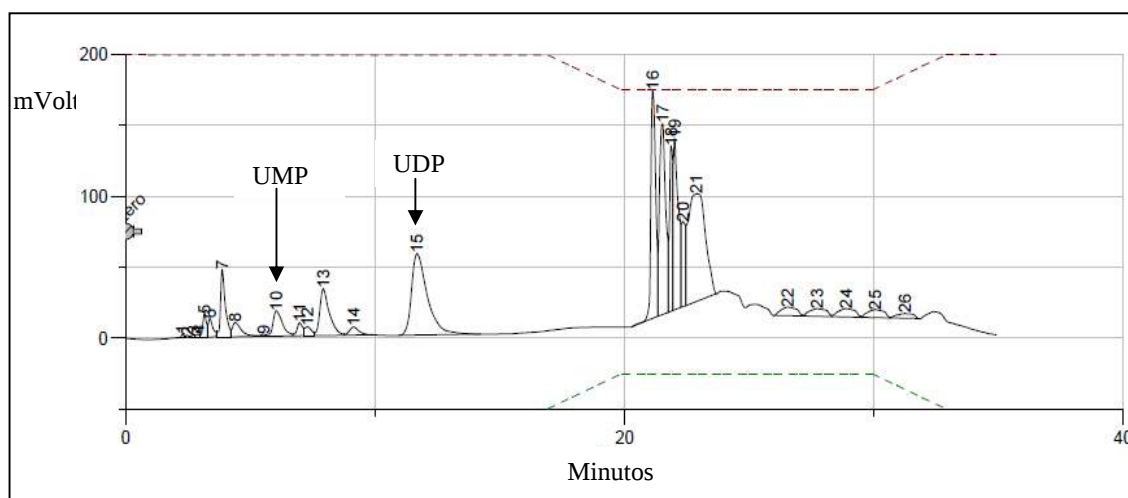


Figura 22: Cromatograma correspondiente a la reacción biocatalizada con extracto de levadura para la síntesis de UDP a partir de UMP comercial y condiciones óptimas de reacción.

5.3.3. Obtención de otros nucleósidos, 2'-desoxinucleósidos y 2'-arabinonucleósidos 5'-difosfato

Los resultados obtenidos inicialmente con UMP alentaron a evaluar la aplicación de este sistema biocatalítico para la obtención de timidina, citidina, inosina, guanosina, fludarabina y adeninarabinósido 5'-difosfato (TDP, CDP, IDP, GDP, FAraADP, AraADP, respectivamente). Se analizaron las mezclas semicuantitativamente mediante CCD y se observó que el tiempo óptimo de reacción fue 1³⁰h. Los resultados cuantitativos de dicho tiempo, analizados mediante HPLC, se muestran en la Tabla 19.

NDP	TDP	CDP	IDP	GDP	FAraADP	AraADP
% Conversión*	10	6	13	12	10	7

Tabla 19: Resultados obtenidos utilizando un extracto celular de *Saccharomyces cerevisiae* comercial y diferentes NMP como sustratos.

NDP: nucleósido-5'-difosfato. *% de conversión: (área de NDP/área de NMP)x100.
Tiempo de reacción: 1³⁰h.

Estos resultados indican que este sistema biocatalítico puede emplearse para la síntesis de diversos nucleósidos difosfato. Debido a que en esta reacción se empleó un extracto celular de levadura comercial, la actividad sobre diversos nucleósidos 5'-monofosfato se debe a la variedad de NMPKs presentes. En principio, las condiciones utilizadas fueron adecuadas para el funcionamiento de las diferentes NMPKs de *Saccharomyces cerevisiae*. Esto se debe a que la mayoría de estas enzimas presentan un máximo de actividad a pH 7.0, manteniéndola entre 6.0-9.0 unidades de pH [3, 4]. Además aceptan ATP como dador de fosfato, el cual es generado *in situ* en la reacción mediante el agregado de glucosa. Asimismo, todas son dependientes de cationes bivalentes, generalmente Mg²⁺, ya que el ATP se encuentra en el sitio activo de la enzima en forma de sal de Mg²⁺ [1, 5]. Dado la baja especificidad por sustrato que presentan estas enzimas, ha sido posible la obtención de arabinósidos 5'-difosfato, cuya síntesis no ha sido previamente reportada mediante metodologías que involucren NMPKs de levaduras. Si bien los rendimientos no fueron demasiado elevados, la obtención de estos compuestos mediante

esta metodología resulta atractiva debido a que la síntesis química de los mismos es compleja [20].

5.3.4. Obtención de UDP a partir de reacciones biocatalizadas consecutivas

Desde el punto de vista sintético para el desarrollo de los objetivos específicos de esta Tesis, los resultados obtenidos para la síntesis de UDP resultaron satisfactorios. Así, en esta parte del trabajo, se analizaron las variables que podrían influir sobre la metodología aplicada en este capítulo empleando los medios de reacción obtenidos previamente para la síntesis biocatalizada de UMP a partir de sustratos más económicos.

5.3.4.1. Uso de mezclas de reacción provenientes de la biotransformación con *Raoultella planticola*

En primer lugar, se analizó la influencia de los componentes del medio de reacción proveniente de la síntesis de UMP empleando *Raoultella planticola* como biocatalizador y uridina como sustrato (Capítulo 4) sobre la obtención de UDP. Para tal fin se ensayaron diferentes medios de modo de representar las condiciones obtenidas en las mezclas de reacción a utilizar.

1) Diferencias entre los medios de reacción

El medio de reacción inicial para la síntesis de UMP con *R. planticola* consistió en pirofosfato ácido de sodio (PPi) 260 mM, uridina 74.5 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 mM y biocatalizador 5% (p/v) en *buffer* acetato 0.1 M pH 4.0. El mejor resultado en la síntesis de UMP, 5.6 mM, se obtuvo a las 24h de reacción y, en ese tiempo, todo el PPi inicial fue hidrolizado a Pi siendo su concentración 514 mM, determinada mediante ensayos colorimétricos cuantitativos [18]. Para detener la reacción simplemente se separó el biocatalizador del medio por centrifugación. En la Tabla 20 se muestran las condiciones

iniciales ($MR1_{inicial}$) y finales ($MR1_{final}$) de la reacción de obtención de UMP y las iniciales ($MRL_{inicial}$) necesarias para la síntesis de UDP empleando extracto de levadura comercial.

Componentes	$MR1_{inicial}$	$MR1_{final}$	$MRL_{inicial}$
Pirofosfato ácido de sodio	260 mM	0	0
Fosfato inorgánico	0	514 mM	400 mM (como <i>buffer</i>)
Uridina	74.5 mM	69 mM	0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2 mM	0.2 mM	20 mM
UMP	0	5.6 mM	4 mM
Glucosa	0	0	100 mM
<i>Buffer</i>	acetato de sodio 0.1 M	acetato de sodio 0.1 M	fosfato de potasio 0.4 M
pH	4.0	4.0	7.0

Tabla 20: Condiciones iniciales y finales del medio de reacción correspondiente a la síntesis de UMP a partir de uridina y *Raoultella planticola* como biocatalizador ($MR1_{inicial}$, $MR1_{final}$) y condiciones iniciales para la síntesis de UDP mediante un extracto de levadura comercial ($MRL_{inicial}$)

2) Análisis de las variables que influyen sobre la síntesis de UDP mediante reacciones consecutivas

En primer lugar, y dado que en la biotransformación con *R. planticola* se utilizó acetato de sodio como *buffer* y en la de levadura fosfato de potasio, se analizó la incidencia del cambio de catión en la segunda reacción mediante el uso de sales de fosfato de sodio como sistema *buffer* así como la influencia del acetato. Para ello se ensayaron tres sistemas diferentes, los cuales contenían los componentes necesarios para la reacción con el extracto de levadura, con las siguientes variantes:

- 1- *Buffer* fosfato de potasio 0.4 M pH 7.0 + acetato de sodio 0.1 M
- 2- *Buffer* fosfato de sodio 0.4 M pH 7.0
- 3- *Buffer* fosfato de sodio 0.4 M pH 7.0 + acetato de sodio 0.1 M

En la Tabla 21 se muestran los resultados obtenidos utilizando los diferentes medios incluyendo un control en condiciones estándar (MRL).

Medios de reacción	UMP (mM)	% Conv. ^{*2}
1 [*] - <i>Buffer</i> fosfato K ⁺	2.1	53
2- <i>Buffer</i> fosfato K ⁺ + acetato 0.1 M	1.9	47
3- <i>Buffer</i> fosfato Na ⁺	2.3	58
4- <i>Buffer</i> fosfato Na ⁺ + acetato 0.1M	2.2	54

Tabla 21: Incidencia del sodio y del acetato sobre los rendimientos de UDP en la biotransformación con extracto de levadura.

*Control. ^{*2}% Conv.: % de conversión: concentración de UDP (mM)/concentración de UMP (mM)x100.

Si bien la diferencia en los resultados obtenidos no representa un cambio significativo en la conversión, ya que se puede considerar dentro del error experimental, se observa que el agregado de acetato de sodio (2) no influye significativamente sobre la actividad de la UMPK, sin embargo hay un ligero descenso del porcentaje de conversión. Por otra parte, el uso de *buffer* fosfato de sodio (3) incide de forma levemente positiva sobre la conversión, alcanzando mejores resultados respecto al control. *Jong et al.* [4] utilizaron diferentes *buffers* analizando su influencia en la actividad UMPK, y reportaron que el rango óptimo de pH para su correcto funcionamiento es entre 6 y 9.5. Sin embargo, el empleo de otras sales de sodio como sistema *buffer* a pH 7.0 no ha sido reportado previamente en reacciones con UMPK. No obstante, *Jong & Campbell* [6] reportaron la inhibición ejercida por potasio sobre la acción de otra quinasa de *Saccharomyces cerevisiae*, la enzima timidilato quinasa (TMPK), con lo cual un efecto similar podría ocurrir sobre la actividad de la UMPK. Para el uso conjunto de sales de sodio como sistema *buffer* y acetato en forma de acetato de sodio (4) puede observarse que se alcanzó un rendimiento similar al control. Nuevamente se evidencia que el acetato genera un cierto efecto negativo sobre la actividad de la UMPK compensado por el uso de sodio como catión. Mediante este análisis de resultados se pudo concluir que la mezcla proveniente de la biotransformación empleando

R. planticola para la obtención de UMP podría emplearse en una reacción consecutiva de síntesis de UDP sin afectar el rendimiento de dicho producto. De aquí en más los controles de la biotransformación con el extracto de levadura se realizaron empleando *buffer* fosfato de sodio en lugar de potasio.

Para continuar con el análisis de las variables que afectan a la síntesis de UDP, se evaluó la influencia de la concentración de fosfato inorgánico. Esto se debe a que la reacción de obtención de UMP analizada utiliza PPi como dador de fosfato. Esto genera no sólo UMP sino también Pi por la hidrólisis total del PPi a las 24h de reacción. Como se detalla en la Tabla 21, la concentración final de Pi en esa mezcla es de 515 mM y, si bien la biotransformación con extracto de levadura emplea *buffer* fosfato, la concentración empleada para la misma es de 400 mM. En la Figura 23 se muestran los resultados obtenidos para la síntesis de UDP en condiciones estándar pero empleando concentraciones de *buffer* fosfato de sodio 200, 600 y 800 mM, comparándose con el control.

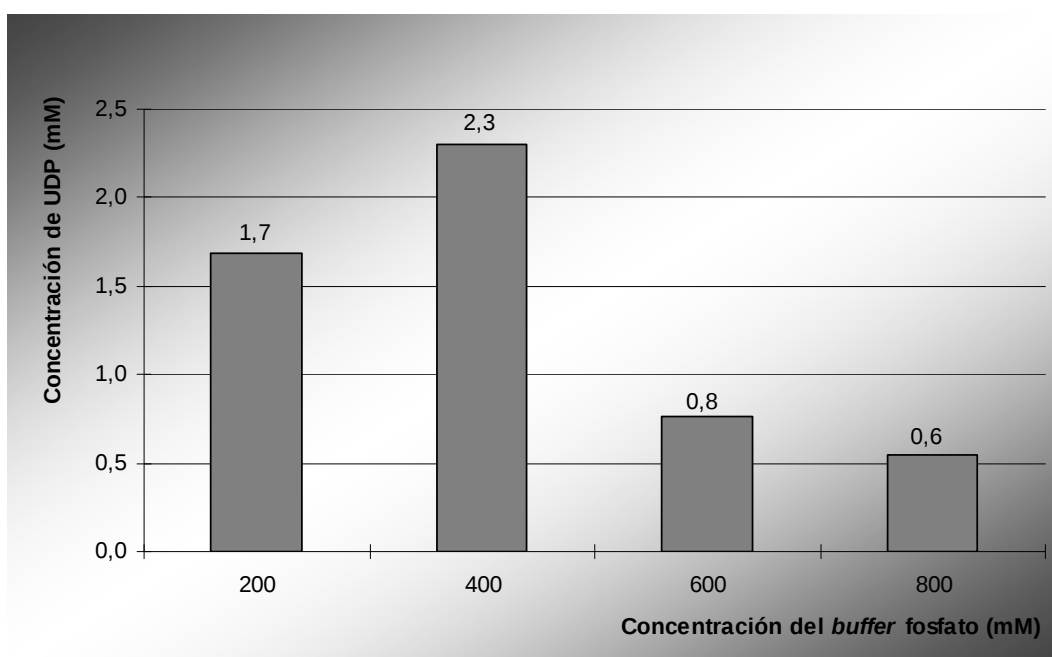


Figura 23: Concentración de UDP obtenida con el extracto de levadura y empleando diferentes concentraciones de *buffer* fosfato de sodio.

Como se esperaba, los mejores resultados se obtuvieron empleando *buffer* fosfato 400 mM con lo cual la mezcla de reacción proveniente de la síntesis de UMP con *R. planticola* requiere una dilución de modo de alcanzar la concentración de fosfato óptima para la reacción.

Debido entonces a la necesidad de diluir la mezcla, fue conveniente evaluar el efecto de la concentración de UMP sobre el rendimiento de UDP. Para ello se prepararon mezclas de reacción con 2, 6 y 8 mM de UMP comercial y se compararon con el control (4 mM). En la Tabla 22 se observa que concentraciones de UMP menores a 4 mM no solo no disminuyen el rendimiento de la reacción sino que lo aumentan, con lo cual una dilución de la mezcla de reacción proveniente de la síntesis biocatalizada por *R. planticola* podría efectuarse sencillamente sin afectar negativamente el rendimiento. Opuestamente, concentraciones de UMP mayores a 4 mM genera una importante disminución en el rendimiento de la reacción debido, probablemente, a efectos relacionados con mecanismos de inhibición por sustrato o producto sobre la UMPK.

Concentración de UMP _i (mM)	Concentración de UDP (mM)	% Conv. ^{*2}
2	1.3	65
4*	2.3	57
6	2.3	38
8	3.0	37

Tabla 22: Resultados obtenidos para la síntesis de UDP con extracto de levadura y empleando diferentes concentraciones de UMP inicial.

*Concentración de UMP: 4 mM, Control.

^{*2}% Conv.: % de conversión: concentración de UDP (mM)/concentración de UMP (mM)x100.

Finalmente, se preparó una mezcla similar (**mezcla simulada**) a la obtenida con *R. planticola* de manera de imitar las condiciones de la misma empleando los reactivos comerciales necesarios (MR1_{final}, Tabla 20). A una parte de esta mezcla se le adicionó

NaOH 10 N llevando su pH a 7.0 unidades y posteriormente se le agregó agua destilada para alcanzar la concentración adecuada de Pi, 400 mM, generando además 4,5 mM de UMP. Luego se le adicionó glucosa y $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (100 y 20 mM, respectivamente) necesarios para cumplimentar los requerimientos para la biotransformación con el extracto de levadura. La reacción transcurrió durante 90 minutos y se obtuvo como resultado 2.4 mM de UDP (53% de rendimiento).

Debido a los resultados satisfactorios obtenidos con la **mezcla simulada**, se procedió de igual manera con la **mezcla real** proveniente de la reacción biocatalizada por *R. planticola* y nuevamente el rendimiento alcanzado fue 52%. La figura 24 muestra el cromatograma obtenido mediante HPLC. Puede observarse, de modo similar a lo mostrado en la Figura 22, la presencia de UDP representado por el pico N° 14 correspondiente a un Tr de 11.61 min. La presencia de uridina, pico N° 11 con Tr de 7.91 min, en alta proporción, corresponde a la cantidad de uridina remanente en la reacción de síntesis de UMP con *R. planticola*. El UMP presenta un Tr de 6.02 min (Pico N° 8) con un área de pico pequeña respecto a la uridina. Además se identifica al uracilo, Tr de 3.86 min (Pico N° 6) debido, como se mencionó anteriormente, a la presencia de nucleósido fosforilasas las cuales, en las condiciones empleadas, son activas y actúan sobre el nucleósido generando la base correspondiente. Del mismo modo que para la Figura 21, los picos con Trs mayores a 20 min pertenecen a adenosina y sus correspondientes nucleótidos como ATP, ADP y AMP.

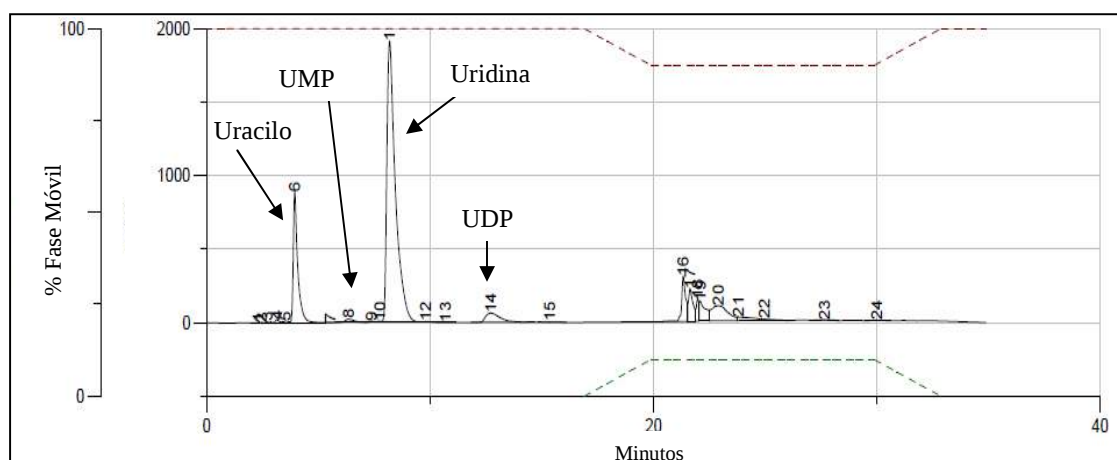


Figura 24: Cromatograma de una muestra obtenida en la síntesis de UDP con extracto de levadura, mediante una reacción biocatalizada consecutiva utilizando una mezcla que contiene UMP sintetizado a partir de uridina y *Raoultella planticola* como biocatalizador.

En resumen, el medio que contiene UMP obtenido por fosforilación de uridina utilizando *R. planticola* como biocatalizador puede ser utilizado para la obtención posterior de UDP con extracto de levadura comercial en una reacción “one pot”. Para ello se requiere, en primer lugar, llevar el pH del medio a 7.0 unidades mediante el agregado de NaOH, ya que es el óptimo para la reacción; en segundo lugar, realizar una dilución con agua destilada para que la concentración de Pi sea 400 mM, debido a que el mismo presenta efectos inhibitorios sobre la actividad de la UMPK a concentraciones mayores; y finalmente, agregar glucosa 100 mM y MgSO_4 20 mM requeridos para la biotransformación. Si bien esta metodología genera un rendimiento global bajo (3%, correspondiente a una concentración de UDP de 2.4 mM o 0.97 gr/L, a partir de uridina 74.5 mM de la reacción con *R. planticola*), la mayor ventaja que presenta es la de evitar el uso de UMP comercial, dado su alto costo, así como su purificación de la primer reacción biocatalizada, la cual resultaría compleja debido a la presencia de concentraciones elevadas de Pi junto a compuestos orgánicos fosforilados en mucha menor concentración [22].

5.3.4.2. Uso de mezclas de reacción provenientes de las biotransformaciones con *Corynebacterium ammoniagenes* y ácido orótico

1) Diferencias entre los medios de reacción

Seguidamente, se analizaron las diferencias entre los medios provenientes de las Biotransformaciones IIA, IIB y III (Capítulo 3) con el empleado inicialmente en la reacción con extracto de levadura. La Tabla 23 muestra las condiciones iniciales y finales (24h) de la Biotransformación II en comparación con las necesarias para la reacción de obtención de UDP.

Componentes	MRIIA _{inicial}	MRIIA _{final}	MRL _{inicial}
Ácido orótico	38.5 mM	33 mM	0
UMP	0	5.2 mM	4 mM
Glucosa	333 mM	0	100 mM
Fosfato inorgánico (sales de K ⁺)	286 mM	281 mM	400 mM (como <i>buffer</i>)
Mg ²⁺	20 mM (MgCl ₂)	20 mM	20 mM (MgSO ₄)
Agente porante	Tritón 0.6 %	Tritón 0.6 %	0
<i>Buffer</i>	Tris-HCl 50 mM	Tris-HCl 50 mM	fosfato de sodio 400 mM
pH	7.5	7.5	7.0

Tabla 23: Condiciones iniciales y finales del medio de reacción correspondiente a la síntesis de UMP a partir de ácido orótico y *Corynebacterium ammoniagenes* como biocatalizador (MRIIA_{inicial}, MRIIA_{final}) y condiciones iniciales para la síntesis de UDP mediante un extracto de levadura comercial (MRL_{inicial})

Como puede observarse las condiciones finales de la Biotransformación IIA no difieren de modo significativo respecto a MRL_{inicial}. Debido a que la mayoría de las variables fueron analizadas anteriormente, se acondicionó el medio proveniente de la Biotransformación IIA de modo de obtener las concentraciones adecuadas de componentes para la reacción con el extracto de levadura. Para ello, se preparó una solución de fosfato de sodio pH 7.0 y se agregó la cantidad adecuada necesaria para obtener *buffer* fosfato 400 mM debido a que MRIIA_{final} contenía 281 mM de Pi, proveniente del KH₂PO₄ y K₂HPO₄

presentes inicialmente en la reacción. Si bien, como se demostró anteriormente, el uso de sales de sodio genera mejores conversiones de UDP respecto al de sales de potasio, la separación de éstas del medio sería compleja. Asimismo, el agregado de esta solución de fosfato permitió diluir el UMP hasta 4 mM. Finalmente se agregó glucosa 100 mM y se procedió a realizar la biotransformación con el extracto de levadura. La reacción transcurrió durante 90 minutos y se obtuvo menor conversión, 37.6% correspondiente a 1.54 mM de UDP.

Los resultados obtenidos indicaron que alguno de los componentes del medio MRIIA pudo influir negativamente en la reacción. Como se mencionó anteriormente, la presencia de potasio genera un pequeño efecto negativo sobre la obtención de UDP pero, no sería la causa fundamental del resultado obtenido. Se ensayaron reacciones modelo y en primer lugar se evaluó la incidencia del ácido orótico sobre la reacción con levadura y no se observó un cambio significativo sobre la concentración de UDP obtenida respecto al control. Por otra parte, se evaluó el efecto de la presencia de Tris y Tritón X-100. Para ello se ensayaron las reacciones estándar adicionando cada uno de estos componentes por separado. Pudo evidenciarse que tanto el Tris como el Tritón disminuyen el rendimiento de UDP formado respecto al control, alcanzando concentraciones de 0.8 y 0.9 mM, respectivamente. Cabe aclarar que las concentraciones empleadas de ambos componentes en estas reacciones control corresponden a la concentración que presentaban en el medio de reacción de la Biotransformación IIA y no se consideró la dilución que se realizó realmente, es por esto que la conversión de UDP es menor que la obtenida con ambos componentes juntos. Sin embargo los rendimientos menores de UDP obtenidos a partir de MRIIA podrían deberse a la presencia de Tris y Tritón.

Posteriormente se evaluó la biotransformación con levadura con una mezcla proveniente de la Biotransformación IIB. La Tabla 24 muestra las condiciones iniciales y finales (10h) de la Biotransformación IIB en comparación con las necesarias para la reacción de obtención de UDP.

Componentes	MRIIB _{inicial}	MRIIB _{final}	MRL _{inicial}
Ácido orótico	38.5 mM	33 mM	0
UMP	0	5 mM	4 mM
Glucosa	333 mM	128	100 mM
Fosfato inorgánico (sales de Na ⁺)	278 mM	258 mM	400 mM (como <i>buffer</i>)
Mg ²⁺	20 mM (MgCl ₂)	20 mM	20 mM (MgSO ₄)
Agente porante	Tritón 0.6 %	Tritón 0.6 %	0
<i>Buffer</i>	Tris-HCl 50 mM	Tris-HCl 50 mM	fosfato de sodio 400 mM
pH	7.5	7.5	7.0

Tabla 24: Condiciones iniciales y finales del medio de reacción correspondiente a la síntesis de UMP a partir de ácido orótico y *Corynebacterium ammoniagenes* como biocatalizador (MRIIB_{inicial}, MRIIB_{final}) y condiciones iniciales para la síntesis de UDP mediante un extracto de levadura comercial (MRL_{inicial})

Debido a que la mayoría de las variables fueron analizadas anteriormente, se acondicionó el medio proveniente de la Biotransformación IIB de modo de obtener las concentraciones adecuadas de componentes para la reacción con el extracto de levadura. Para ello, se preparó una solución de fosfato de sodio pH 7.0 y se agregó la cantidad adecuada necesaria para obtener *buffer* fosfato 400 mM debido a que MRIIB_{final} contenía 258 mM de Pi, proveniente del NaH₂PO₄ y Na₂HPO₄ presentes inicialmente en la reacción. Asimismo, el agregado de esta solución de fosfato permitió diluir el UMP hasta 4 mM y la glucosa hasta 103 mM. Finalmente se procedió a realizar la biotransformación con el extracto de levadura, la reacción transcurrió durante 90 minutos y se obtuvo una conversión de 43% correspondiente a 1.72 mM de UDP probablemente debido a la presencia mayoritaria de fosfato de sodio. Estos resultados indicarían que el sodio sería un catión necesario en la biotransformación con levadura y tanto el Tris como el Tritón serían los posibles causantes de la disminución de los rendimientos respecto al control. Si bien se obtuvo una mínima diferencia en la concentración de UMP mediante la Biotransformación IIA (5.2 mM) respecto a la Biotransformación IIB (5 mM), lo cual podría atribuirse a la presencia de iones sodio en esta última, se logró una mejor conversión de UDP en la presente reacción con levadura (1.54 mM y 1.72 mM, respectivamente).

Mediante los resultados obtenidos y debido a la sencillez de la operatoria conjuntamente con las condiciones suaves de reacción, la aplicación de reacciones consecutivas se presenta como una alternativa interesante para la síntesis de UDP a partir de MRIIA y MRIIB. Sin embargo, el rendimiento global de estas reacciones es un poco más bajo (0.6 y 0.7 gr/L respectivamente, a partir de 38.5 mM de ácido orótico) que el alcanzado anteriormente con la mezcla de reacción obtenida con *R. planticola*.

5.3.4.3. Uso de mezclas de reacción provenientes de las biotransformaciones con *Corynebacterium ammoniagenes* y uracilo

1) Diferencias entre los medios de reacción

Finalmente, se analizaron las condiciones de la mezcla proveniente de la Biotransformación III obtenida a las 24h de reacción. La Tabla 25 muestra las condiciones iniciales y finales de dicha biotransformación en comparación con las requeridas por la obtención de UDP.

Componentes	MRIII _{inicial}	MRIII _{final}	MRL _{inicial}
Uracilo	20 mM	10. 4 mM	0
UMP	0	10 mM	4 mM
Glucosa	277 mM	74	100 mM
Fosfato inorgánico	141 mM (como <i>buffer</i>)	121 mM	400 mM (como <i>buffer</i>)
MgSO ₄	0	0	20 mM
Agente porante	Xileno 1.6 %	Xileno 1.6 %	0
	Fosfato de sodio	Fosfato de sodio 121	fosfato de sodio 400
<i>Buffer</i>	140 mM	mM	mM
pH	7.2	7.2	7.0

Tabla 25: Condiciones iniciales y finales del medio de reacción correspondiente a la síntesis de UMP a partir de uracilo y *Corynebacterium ammoniagenes* como biocatalizador (MRIII_{inicial}, MRIII_{final}) y condiciones iniciales para la síntesis de UDP mediante un extracto de levadura comercial (MRL_{inicial})

Puede observarse que la mezcla proveniente de la Biotransformación III también es compatible con la requerida por la reacción con el extracto de levadura. Inicialmente se preparó una solución de fosfato de sodio pH 7.0 adecuada para agregar a la mezcla y obtener una concentración de dicha sal (también como sistema *buffer*) de 400 mM y además llegar a 4 mM de UMP. Luego se agregó glucosa hasta alcanzar 100 mM de concentración final y por último MgSO_4 20 mM. La reacción se llevó a cabo durante 90 minutos y se obtuvo un 66% de conversión de UDP correspondiente a 2.64 mM, evidenciándose que tanto el uso de sales de sodio como sistema *buffer* así como la ausencia de compuestos como Tris y Tritón favorecerían la reacción.

En la Tabla 26 se presenta un resumen de los resultados obtenidos para la biotransformación con *S. cerevisiae* en la obtención de UDP mediante reacciones consecutivas sin la necesidad de aislar y purificar UMP, mostrando el rendimiento global de las reacciones así como el costo de los reactivos precursores de UDP utilizados.

Biocatalizador	Sustrato inicial	PM (gr/mol)	Costo (\$/gr)	Conc. UDP (mM)	Rendimiento global
<i>Raoultella planticola</i>	Uridina 74.5 mM	244.2	655	2.40	3% o 0.97 gr/L
<i>Corynebacterium ammoniagenes</i>					
Biotransformación IIA	Acido orótico 38.5 mM	156.1	65.5	1.52	4% o 0.60 gr/L
Biotransformación IIB				1.72	4.5% o 0.70 gr/L
Biotransformación III	Uracilo 20 mM	112.1	109	2.64	13.2% o 1.10 gr/L
Control con UMP comercial	4 mM	324.2	2264	2.30	58% o 0.93 gr/L

Puede observarse que los rendimientos finales, en términos de concentración de UDP, para todas las biotransformaciones no presentan mayores diferencias entre sí. Sin embargo

se debe evaluar no solo el rendimiento global sino también el costo de los reactivos utilizados, el modo de crecimiento y obtención de los biocatalizadores así como el tiempo total requerido para el proceso general. Para el caso de la reacción de síntesis de UMP con *Raoultella planticola*, el crecimiento del microorganismo resultó sencillo (durante 24h), así como las condiciones y tiempo de reacción (24h), sin embargo la concentración inicial elevada del reactivo genera un proceso más costoso que el que utiliza UMP comercial como sustrato. Para las Biotransformaciones IIA y IIB el crecimiento de *Corynebacterium ammoniagenes* resultó más complejo debido al uso de dos medios, uno de crecimiento (30h) y otro de inducción (24h). Luego, cada una de las reacciones alcanzaron el máximo de UMP a las 24 y 10h, respectivamente, generando procesos más largos que para la primer biotransformación, no obstante, el bajo costo del ácido orótico genera un proceso mucho más económico respecto al que se utiliza UMP comercial. Para el caso de la Biotransformación III se alcanzó un rendimiento global superior a las anteriores. A pesar de que la preparación del biocatalizador fue más larga debido a que se utilizaron 72h para su crecimiento e inducción, ese tiempo se compensa con el bajo costo del uracilo y el rendimiento global superior obtenido. De esta manera y en base al elevado costo del UMP comercial, las biotransformaciones utilizando *C. ammoniagenes* se presentan como una alternativa ventajosa para la obtención biocatalizada de UDP, fundamentalmente por la reducción del costo económico respecto a los reactivos empleados y a que no son necesarios procesos de aislamiento y purificación del UMP obtenido.

5.4. Conclusiones

En esta parte del trabajo se utilizó como sistema biocatalítico un extracto de *Saccharomyces cerevisiae* como fuente de nucleósido monofosfato quinasas. En primer lugar el sistema fue utilizado para la síntesis de UDP obteniéndose resultados satisfactorios a los 90 minutos de reacción y mediante la optimización de la misma se logró alcanzar un 58% de conversión. Debido a que los resultados fueron alentadores se evaluó la síntesis de otros nucleósidos, desoxinucleósidos y arabinósidos 5'-difosfato consiguiéndose, del mismo modo, resultados positivos. Si bien los rendimientos no fueron demasiado elevados, la obtención de estos compuestos mediante esta metodología resulta atractiva debido a que la síntesis química de los mismos es compleja.

Posteriormente se evaluó la aplicación de reacciones biocatalizadas consecutivas a partir de sustratos económicos. Para ellos se utilizaron las mezclas provenientes de la síntesis de UMP empleando *Raoultella planticola* y *Corynebacterim ammoniagenes* como biocatalizadores (Capítulos 3 y 4, respectivamente) y se analizaron las variables influyentes en la biotransformación con extracto de levadura. En principio se observó un efecto levemente negativo sobre la actividad de la UMPK por parte del ión acetato y del catión potasio y se determinó que el uso de *buffer* fosfato de sodio 400 mM así como UMP 4 mM eran adecuados para alcanzar mejores rendimientos, con lo cual las mezclas que contenían UMP se adecuaron para ser empleadas como medios de reacción para el extracto de levadura. De esta manera se logró producir UDP en forma exitosa a partir de uridina para el caso de las mezclas que provenían de la síntesis de UMP con *Raoultella planticola* y de ácido orótico o uracilo con *Corynebacterim ammoniagenes*, lográndose conversiones equivalentes a los obtenidos con UMP comercial mediante una metodología biocatalítica sencilla y utilizando sustratos económicos y caminos multienzimáticos *one-pot*.

Bibliografía

- [1] Yan, H. & Tsai, M. D. (1999). Nucleoside monophosphate kinases: structure, mechanism, and substrate specificity. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, **73**, 103-133.
- [2] Serina, L.; Blondin, C.; Krin, E.; Sismeiro, O.; Danchin, A.; Sakamoto, H.; Gilles, A. M. & Bärzu, O. (1995). *Escherichia coli* UMP-kinase, a member of the aspartokinase family, is a hexamer regulated by guanine nucleotides and UTP. *Biochemistry.*, **34**, 5066-5074.
- [3] Briozzo, P.; Goninelli-Pimpaneau, B.; Gilles, A. M.; Gaucher, J. F.; Burclacu- Moron, S.; Sakamoto, H.; Janin, J. & Bärzu, O. (1998). Structures of *Escherichia coli* CMP kinase alone and in complex with CDP: a new fold of the nucleoside monophosphate binding domain and insights into cytosine nucleotide specificity. *Structure*, **6**, 1517-1527.
- [4] Jong, A.; Yeh, Y.; Ma, J. J. (1993). Characteristics, substrate analysis, and intracellular location of *Saccharomyces cerevisiae* UMP Kinase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **304**, 197-204.
- [5] Müller-Dieckmann, H. & Schulz, G. E. (1995). Substrate specificity and assembly of the catalytic center derived from two structures of ligated uridylate kinase. *J. Mol. Biol.*, **246**, 522-530.
- [6] Jong, A. Y. & Campbell, J. L. (1984). Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* thymidylate kinase, the CDC8 gene product. *J. Biol. Chem.*, **259**, 14394-14398.
- [7] Schricker, R., Magdolen, V., Kaniak, A., Wolf, K. & Bandlow, W. (1992). The adenylate kinase family in yeast: identification of URA6 as a multicopy suppressor of deficiency in major AMP kinase. *Gene*, **122**, 111–118.
- [8] Konrad, M. (1988). Analysis and in vivo disruption of the gene coding for adenilate kinase (ADK1) in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **263**, 19468-19474.
- [9] Bao, J. & Ryu, D. D. Y. (2006). Cloning of deoxynucleoside monophosphate kinase genes and biosynthesis of deoxynucleoside diphosphates. *Biotech. and Bioeng.*, **93**, 572-580.
- [10] Lecoq, K.; Honrad, M. & Daignan-Fornier, B. (2000). Yeast GMP kinase mutants constitutively express AMP biosynthesis genes by phenocopying a hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase defect. *Genetics*, **156**, 953–961.
- [11] Nelson, D. L. & Cox, M. M. (2008). Carbohydrates and glycobiology, Chapter 7, “Lehninger Principles of Biochemistry”, 5th edition, Freeman, W. H. & Company (Ed.), New York.
- [12] Zhou, J. W.; Liu, L. M.; Shi, Z. P.; Du, G. C. & Chen, J. (2009). ATP in current biotechnology: Regulation, applications and perspectives. *Biotechnol. Adv.*, **27**, 94-101.

- [13] Tochikura, T.; Kuwahara, M.; Yagi, S.; Okamoto, H.; Tominaga, Y.; Kano, T.; Ogata, K. Fermentation and metabolism of nucleic acid-related compounds in yeast. (1967). *J. Ferment. Technol.*, **45**, 511–529.
- [14] Kadowaki, S.; Yano, T.; Tachiki, T. & Tochikura, T. (1989). Production of ATP from adenine by a combination of bacterial and baker's yeast cells. *J. Ferment. Bioeng.*, **68**, 417-422.
- [15] Asada, M.; Nakanishi, K.; Matsuno, R.; Kariya, Y.; Kimura, A. & Kamikubo, T. (1978). Continuous ATP regeneration utilizing glycolysis and kinase systems of yeast. *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 1533-1538.
- [16] Yao, Y.; Xiong, J.; Chen, Y.; Tang, J. & Ying, H. (2011). Enhanced adenosine triphosphate production by *Saccharomyces cerevisiae* using an efficient energy regeneration system. *Korean J. Chem. Eng.*, **28**, 178-183.
- [17] Li, Y.; Hugenholtz, J.; Chen, J. & Lun, S.Y. (2002). Enhancement of pyruvate production by *Torulopsis glabrata* using a two-stage oxygen supply control strategy. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **60**, 101-106.
- [18] Itaya K. & Iu M. (1966). A new micromethod for the colorimetric determination of Inorganic phosphate. *Clin. Chim. Acta.*, **14**, 361-366.
- [19] Fujio, T. & Furuya, A. (1985). Effects of magnesium ion and chelating agents on enzymatic production of ATP from adenine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **21**, 143-147.
- [20] Li, P. *et al.* (2005). Synthesis of α -P-modified nucleoside diphosphates with ethylenediamine. *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 16782–16783.
- [21] Magni, J.; Fioretti, E.; Ipata, P. & Natalini, P. (1975). Bakers' yeast uridine nucleosidase. Purification, composition, and physical and enzymatic properties. *J. Biol. Chem.*, **250**, 9-13.
- [22] Hokse, H. (1983). Purification of α -D-glucose-1-phosphate. *Starch*, **3**, 101-102.

Capítulo 6

Obtención de desoxiuridina 5'-difosfato a partir de uridina 5'-difosfato

6.1. Introducción

Como se mencionó en la introducción de este trabajo, los desoxinucleótidos (dNXPs) son ampliamente utilizados en técnicas de diagnósticos y como precursores de compuestos con actividad antiviral y antitumoral. La síntesis química de los dNXPs involucra solventes y reactivos tóxicos generando, además, bajos rendimientos. De este modo, su obtención mediante metodologías biocatalíticas se presenta como una alternativa interesante.

6.1.1. Ribonucleótido reductasas

Las ribonucleótido reductasas (RNR) son enzimas responsables de la conversión de los cuatro ribonucleósidos 5'-di- o 5'-trifosfato naturales, adenosina, citidina, guanosina y uridina, a sus respectivos 2'-desoxirribonucleótidos, proporcionando los precursores necesarios para la síntesis y reparación del ADN [1, 2]. Es por eso que estas enzimas son el principal blanco para el control de crecimiento celular y muchos inhibidores de RNRs están siendo implementados como drogas quimioterapéuticas contra el cáncer, en combinación con otras drogas, y en infecciones como malaria y SIDA [1].

Se ha reportado la existencia de tres clases de RNR cuya diferencia radica en la dependencia de los cofactores metálicos necesarios para su actividad catalítica [3]. Las enzimas de clase I son oxígeno dependientes, poseen un centro de unión a hierro y a su vez, se subdividen en 2 subclases distintas. Las enzimas de clase II utilizan un derivado de cobalamina (vitamina B12) como cofactor y las de clase III utilizan un complejo de hierro-

azufre acoplado a *S*-adenosilmetionina (SAM). A pesar de las diferencias, los tres tipos de enzimas poseen un residuo de cisteína conservado en el sitio activo que es convertido al radical correspondiente. Se sospecha que este radical inicia la conversión del sustrato extrayendo un átomo de hidrógeno del anillo ribosídico del mismo (Figura 25) [5]. Este residuo de cisteína se encuentra dentro de un barril α/β en todas las RNRs [4] lo cual indicaría que provienen de una reductasa ancestral común [7]. Sin embargo, únicamente en las RNRs de clase II, el cofactor interactúa directamente con la cisteína del sitio activo, mientras que en las de clase I y III, se genera un radical estable en un sitio diferente al del sitio activo. Dicho radical es transferido hacia el sitio activo por un camino de transferencia radicalaria que involucra una serie de residuos aminoácidos hidrogenados. Generalmente se encuentran asociadas a proteínas como tiorredoxina y tiorredoxina reductasa que requieren nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH, del inglés *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) para regenerar su poder reductor.

6.1.1.1. Ribonucleótido reductasas de clase I

Las RNRs de clase I son oxígeno dependientes, utilizan un catión de hierro (III) que se reduce a hierro (II) generando un radical libre de tirosina (Tyr) que inicia una cadena de transferencia de electrones hasta la reducción del sustrato por un radical Cys formado. Estas enzimas se encuentran prácticamente en todos los organismos eucariotas: levaduras, algas, plantas y mamíferos, así como en algunos procariotas y virus, aceptan como sustratos nucleósidos 5'-difosfato y son activas en rangos de pH entre 4.0 y 7.6.

Esta clase de RNR son enzimas tetraméricas ($\alpha_2\beta_2$) [6] y el sitio de unión a sustrato del sitio activo, con el sistema redox de Cys, así como el sitio alostérico se encuentran en el homodímero α_2 llamado R1 [7]. El otro homodímero, llamado R2 [8], contiene el sitio de unión de los dos iones hierro (III) en cada cadena polipeptídica y los residuos Tyr involucrados en la primer etapa de formación de radicales.

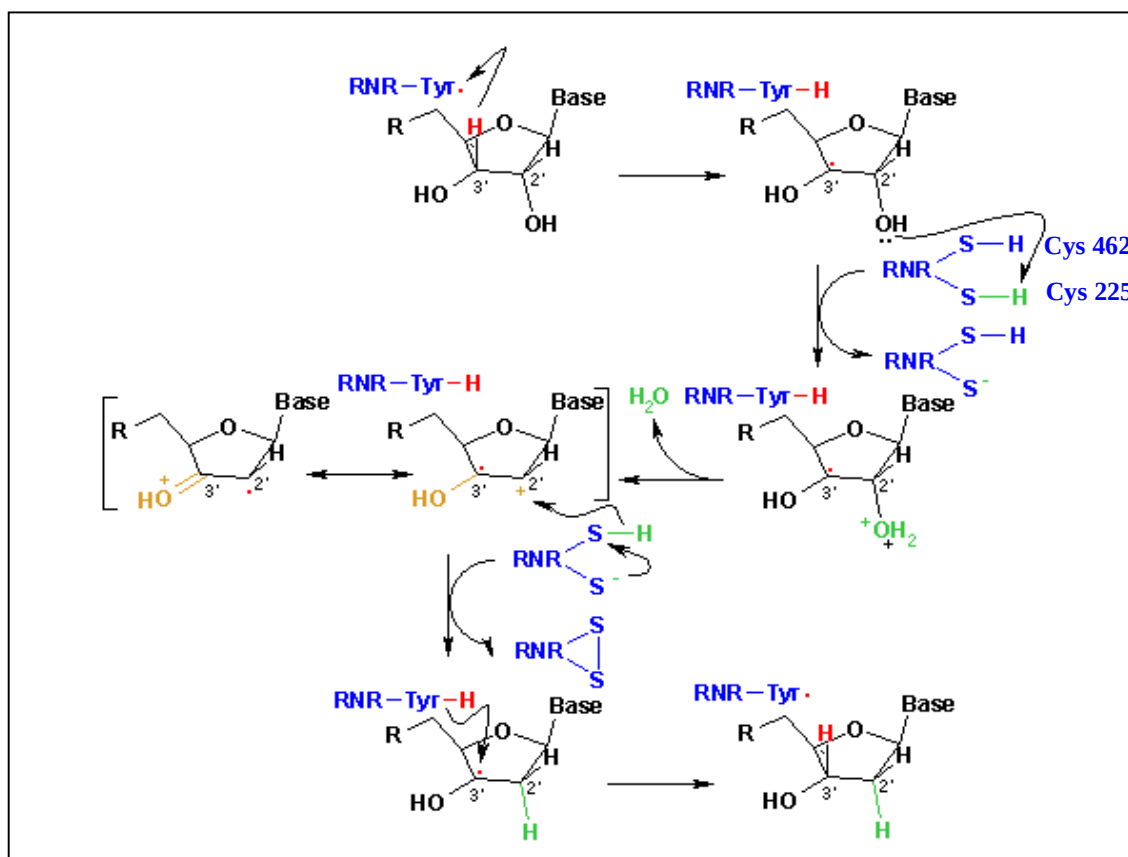


Figura 25: Mecanismo general de reacción de las enzimas ribonucleótido reductasas de clase I.

A su vez este tipo de RNR se divide en dos subclases, Ia y Ib, en base a la homología de secuencia polipeptídica y su regulación alostérica. Las RNRs Ia existen en eucariotas, procariotas, virus y bacteriofagos como por ejemplo: *Saccharomyces cerevisiae*, *E. coli*, *Chlamydia trachomatis*, mientras que las Ib sólo se han encontrado en procariotas como *Salmonella typhimurium* y *Corynebacterium ammoniagenes*. Las enzimas Ib presentan un centro binuclear de manganeso que genera el radical iniciador de la reacción de reducción.

6.1.1.2. Ribonucleótido reductasas de clase II

Las RNRs de clase II se encuentran en bacterias que pueden vivir tanto en condiciones de anaerobiosis o de aerobiosis tales como *Lactobacillus leichmannii* y también en algunos de sus fagos. En general son llamadas RTPRs (del inglés *ribonucleótide triphosphate reductases*) debido a que aceptan como sustrato nucleósidos 5'-trifosfato. Las RNR de clase II son homodiméricas [7] y utilizan como cofactor 5'-desoxiadenosilcobalamina (un derivado de la vitamina B12) que interactúa directamente con una cisteína del sitio activo para formar el radical de ese aminoácido necesario para la reducción. El mecanismo de reacción del sitio activo se conserva respecto a las RNR de clase I.

6.1.1.3. Ribonucleótido reductasas de clase III

Estas enzimas se encuentran en bacterias anaeróbicas estrictas o facultativas y en algunos bacteriofagos como Bacteriofago T4, aceptando como sustrato nucleósidos-5'-trifosfato. Consisten en dos subunidades, en las cuales la subunidad mayor α_2 , contiene el sitio activo y el alostérico [9]. La subunidad más pequeña β_2 es llamada activasa y contiene el bloque hierro-azufre $((4\text{Fe-4S})^+)$ que reacciona con SAM y genera un radical de glicina en la subunidad mayor [10, 11]. Este radical generaría un radical de cisteína (Cys 290) en el sitio activo cuando los activantes alostéricos y el sustrato se encuentran en sus correspondientes sitios.

6.1.2. Sistema de reducción de ribonucleótidos de *Escherichia coli*

Como se mencionó anteriormente, *E. coli* contiene RNRs de clase I, en particular de la subclase Ia. El reductor fisiológico es el NADPH y su oxidación pareciera estar acoplada a la reducción de ribonucleótidos vía un sistema de transporte de hidrógeno formado por tiorredoxina y tiorredoxina reductasa [12]. La actividad específica de RNR de *E. coli* está modulada de manera compleja por varios nucleósidos trifosfato que actúan como efectores alostéricos, siendo la subunidad R1 la que contiene los sitios alostéricos regulando la

especificidad de sustrato así como su actividad [13]. Dependiendo de la configuración del sitio alostérico, uno de los cuatro ribonucleótidos se une al sitio activo. Cuando el ATP se une al sitio de actividad, la RNR es activada, sin embargo cuando se une dATP, es desactivada [7]. Además estos mecanismos regulan la especificidad de sustrato asegurando la producción balanceada de cada uno de los dNTP para la síntesis de DNA. En todos los casos, la unión de ATP o dATP al sitio alostérico induce la reducción de citidina 5'-difosfato (CDP) y uridina 5'-difosfato (UDP); por otra parte 2'-desoxiguanosina 5'-trifosfato (dGTP) induce la reducción de adenosina 5'-difosfato (ADP) y 2'-desoxitimidina 5'-trifosfato (dTTP) lo hace sobre la reducción de guanosina 5'-difosfato (GDP) (Figura 26) [14].

Las células eucariotas que poseen RNRs de clase Ia, presentan un mecanismo de control negativo para detener la síntesis de dNTPs a medida que estos se acumulan intracelularmente. Dichos mecanismos protegen a las células de los efectos tóxicos y mutagénicos que pueden ocasionarse por producción excesiva de dNTPs ya que cambios en el balance del *pool* de estos compuestos producen daños en el DNA y por lo tanto causan la muerte celular [15, 16].

Por otra parte es importante destacar que los niveles de RNR pueden aumentarse mediante el uso de agentes inhibidores de la síntesis de DNA, como ácido nalidíxico, debido a que se activan las enzimas involucradas, las cuales generan una señal de falta de timidina, lo que a su vez aumentaría los niveles de RNR [17].

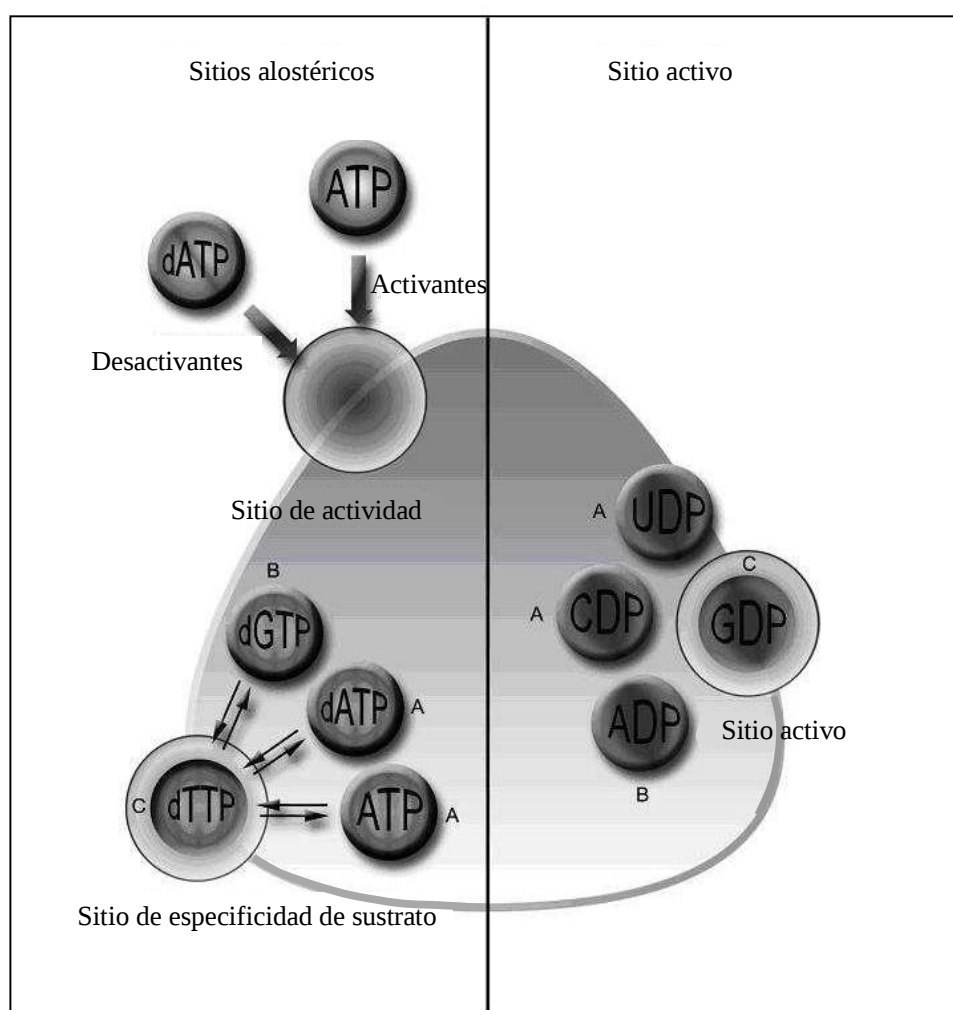


Figura 26: Regulación de RNR de clase I en la subunidad R1.

A = con la unión de dATP o ATP en el sitio alostérico, la enzima acepta UDP y CDP en el sitio catalítico; **B** = la unión de dGTP permite la entrada de ADP en el sitio catalítico; **C** = cuando se une dTTP, ingresa GDP en el sitio catalítico.

6.2. Materiales y Métodos

6.2.1. Materiales

Todos los productos empleados fueron de calidad analítica. Los patrones, sustratos y reactivos de reacción se compraron en ICN, Fluka y Sigma-Aldrich. Las drogas para los medios de cultivo fueron de Anedra, Britania y Sigma-Aldrich. Los solventes utilizados para el análisis cuali-cuantitativo, el revelado y para HPLC fueron de Sintorgan, Biopack y Carlo Erba, respectivamente.

6.2.2. Metodología

6.2.2.1. Medios de cultivo

Los microorganismos pertenecientes al género *Escherichia*, en particular *E. coli* (código ATCC 13005, 23513, 23231, 4157, CECT 433, 12407, 47092) se cultivaron en medio mínimo líquido Davis-Mingioli (MDM) suplementado con aminoácidos y otros nutrientes bajo la siguiente composición (p/v): glucosa (esterilizada separadamente) 0.4%, KH_2PO_4 0.3%, K_2HPO_4 0.7%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01%, citrato de sodio $\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1%, timina 5 $\mu\text{g/mL}$, vitamina B1 $\cdot \text{HCl}$ 4 $\mu\text{g/mL}$, leucina 80 $\mu\text{g/mL}$, treonina 100 $\mu\text{g/mL}$, prolina 50 $\mu\text{g/mL}$, arginina 100 $\mu\text{g/mL}$ y ácido nalidíxico 40 $\mu\text{g/mL}$, en agua destilada, y bajo las condiciones siguientes pH 7.0, 37°C y 200 rpm.

El *buffer* de agotamiento (BufS) utilizado para comenzar con el tratamiento de las células con éter se compuso de (p/v): KCl 0.5%, NaCl 0.1%, Tris-base 0.12%, MgSO_4 0.01% y CaCl_2 10% (v/v) de un stock 1 M, en agua y pH 8.1.

Luego para este tratamiento se utilizó un medio básico bajo la siguiente composición: KCl 80 mM, acetato de magnesio 7 mM, espermidina 0.4 mM, sacarosa 500 mM y EDTA 2 mM, en *buffer* Tris-HCl 40 mM pH 7.4.

6.2.2.2. Preparación de los biocatalizadores

En primer lugar se realizó una curva de crecimiento de la cepa *Escherichia coli* BL21 (ATCC 47092) en MDM, se tomaron alícuotas de 100 μ L a diferentes tiempos y se midió DO_{600nm} . Luego se cultivaron en 200 mL de MDM. En fase exponencial media (5h de crecimiento según curvas de crecimiento) se les adicionó ácido nalidíxico en concentración 40 μ g/ml de cultivo. Se mantuvieron a 37°C y 200 rpm de agitación durante dos horas. Una vez transcurrido el tiempo se adicionaron 0.4 vol. de *buffer* de agotamiento, se centrifugaron a 5000 rpm durante 15 minutos, se descartaron los sobrenadantes y los *pellets* fueron tratados con éter. Este último procedimiento se detalla a continuación.

Tratamiento de células con éter

Los *pellets* obtenidos se resuspendieron en 2 mL de medio básico y se agregó igual volumen de éter, agitándose suavemente por inversión durante 1 min, se separaron las fases formadas y se evaporó el éter de la fase acuosa por corriente de nitrógeno. A la suspensión de células obtenida se agregó la mitad de su volumen (1 mL) de medio básico y se colocó en un tubo de centrífuga conteniendo 4 mL del mismo medio, enriquecido con sacarosa 0.8 M. Se centrifugó a 7000 rpm durante 8 minutos, el pellet de células resultante se resuspendió en 1 mL de medio básico de manera tal de obtener 6×10^{10} células/mL, y se almacenaron a -20°C hasta utilizarse como biocatalizadores.

6.2.2.3. Biotransformación estándar

El medio de reacción fue: $MgCl_2$ 8 mM, ditioneitol (DTT) 40 mM, NADPH 0.96 mM, ATP 0.4 mM, uridina-5'-difosfato (UDP) 2 mM y 6.25×10^7 células pre-tratadas con éter en 0.125 ml de *buffer* heppes 40 mM, bajo las condiciones siguientes, pH 8.4, 30°C y 200 rpm. A los 15 minutos se detuvo la reacción por inactivación enzimática por calor en baño de agua a 100°C durante 1 minuto, y se almacenó a -20°C para su posterior análisis.

6.2.2.4. Análisis e identificación de productos

Cromatografía líquida de alta resolución con detector de masa (HPLC-MS)

El análisis e identificación de productos se realizó mediante HPLC-MS utilizando un equipo Finnigan LCQ Advantage Max, con inyector automático y detector UV arreglo de diodos y de masa en tandem, con interfase electrospray. Se utilizó una columna Thermo Hypersil GOLD C18 *encaped*, 50 mm x 2.1 mm, 3 μm y 175Å de poro. El sistema de desarrollo utilizado fue 5 minutos *buffer* 1,1,1,3,3,3-hexafluor-2-propanol (HFP) 0.4 M ajustado a pH 7.0 con trietilamina (HFPTEA)/Metanol (99/1 vol/vol), 2 minutos hasta HFPTEA/Metanol (95/5 vol/vol), 15 minutos HFPTEA/Metanol (95/5 vol/vol) con flujo 50 $\mu\text{L}/\text{min}$, a temperatura ambiente. Las condiciones de ionización para el análisis de masas fueron modo negativo, voltaje 3kV, temperatura del capilar 200°C y flujo de nitrógeno 12l/min.

6.3. Resultados y discusión

6.3.1. Preparación de los biocatalizadores

En base a datos bibliográficos que reportan la presencia de ribonucleótido reductasas (RNR) de clase I, en particular del tipo Ia, en bacterias del género *Escherichia* [1, 2], se procedió a evaluar 7 cepas de *Escherichia coli* del cepario de nuestro laboratorio como biocatalizadores, utilizando UDP comercial como sustrato, para la obtención de 2'-desoxiuridina 5'-difosfato (dUDP) (Figura 27). Debido a que la reducción mediante la vía de RNR requiere de un sistema de regeneración de cofactores, el uso de células enteras se planteó como una alternativa interesante.

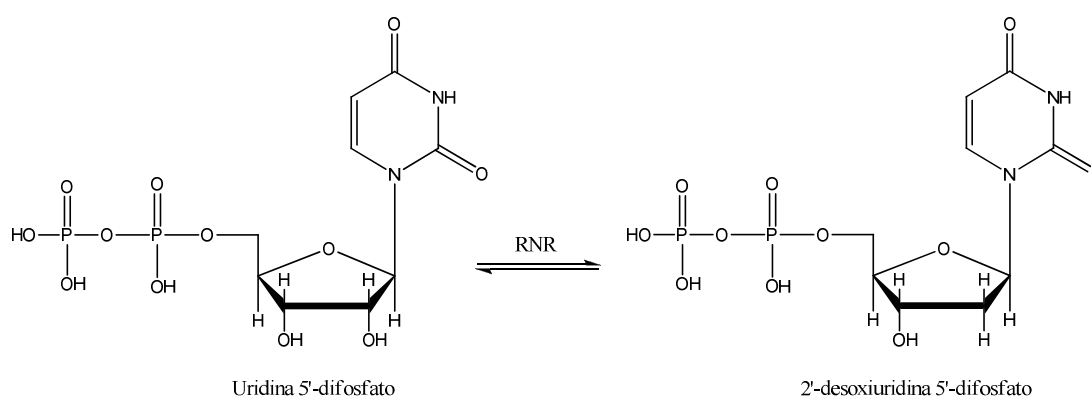


Figura 27: Reacción de reducción de UDP mediante ribonucleótido reductasas.

En primer lugar se realizó una curva de crecimiento de los microorganismos en el medio de crecimiento correspondiente (Figura 28), detallado como MDM en la sección 5.3.2.1. El objetivo de estos ensayos fue conocer el tiempo en el cual el crecimiento alcanza la fase exponencial media (F_{expm}) determinándose a las 5h. En dicha fase celular, tanto la síntesis de DNA como el contenido proteico aumentan exponencialmente, con lo cual el requerimiento de dNTPs es elevado y la vía de obtención de los mismos a través de RNR se encontraría activada [18].

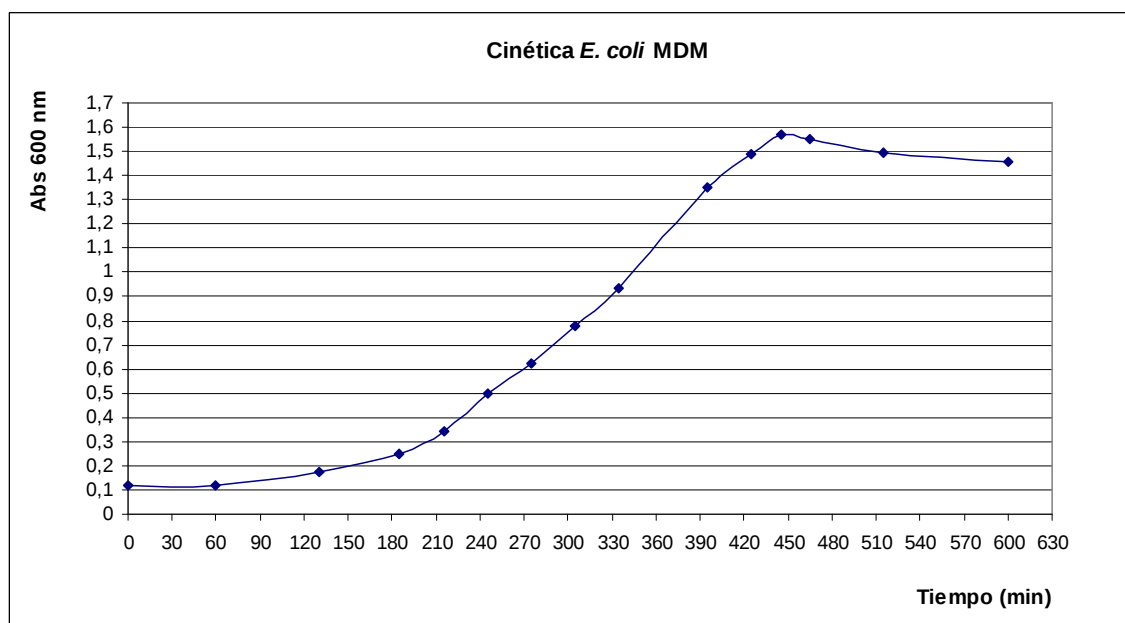


Figura 28: Cinética de crecimiento de *E. coli* BL21 en MDM.

De esta forma, los microorganismos se cultivaron en MDM y, a las 5h, se les agregó ácido nalidíxico. *Filpula & Fuchs* [17] demostraron que este compuesto actúa como un inductor de la enzima RNR de forma indirecta. Esto se debe a que es inhibidor de la síntesis de DNA provocando la formación de múltiples horquillas de replicación lo que genera una señal de mayores requerimientos de dNTPs induciendo así la producción de RNR. Una vez que la síntesis de DNA se inhibe, la división celular se detiene [19, 20].

Una vez transcurridas 2h de tratamiento con ácido nalidíxico, se le agregó al cultivo una solución salina denominada *buffer* de agotamiento. Este tratamiento se realizó por duplicado de modo de eliminar las sales en exceso que pueda contener el medio en el cual se cultivaron las células y además eliminar el ácido nalidíxico [21]. Posteriormente el *pellet* de células obtenidas se trató con éter para porar las células sin causar efectos negativos sobre la reacción biocatalizada de interés debido a que los microorganismos preservarían ciertas estructuras intracelulares esenciales para el funcionamiento de las RNR, lo cual no sucede si se tratan con algún otro agente como tolueno o se emplean extractos celulares

[18]. Finalmente se empleó un medio denominado medio básico el cual contiene espermidina, poliamina que estimula a la enzima RNA polimerasa.

Una vez obtenidos los biocatalizadores en forma de células poradas con éter, se procedió a ensayar las biotransformaciones que permiten la síntesis de dUDP.

6.3.2. Obtención de 2'-desoxiuridina 5'-difosfato

Para llevar a cabo la síntesis de dUDP se utilizó un medio de reacción rico en MgCl_2 , el cual otorga el ion Mg^{+2} requerido por RNR como cofactor enzimático [22, 23]. Además se emplearon cantidades pequeñas de ATP, como efector alostérico positivo [7], de NADPH como agente reductor del sistema RNR, así como ditiotreitól el cual participa en la regeneración de NADPH. Si bien la actividad máxima de las RNRs se presenta a pH 7.6, Warner [18] reportó que el pH óptimo para esta reacción mediante el uso de células pretratadas con éter es superior, siendo 8.4 el adecuado para esta biotransformación.

Una vez lograda la reacción se procedió a optimizar el método de detección de dUDP. Debido a que este compuesto no se comercializa, fue necesario un método específico, para lo cual se utilizó HPLC acoplado a detector de masas (HPLC-MS-SIM) [24]. En primer lugar, se realizaron inyecciones directas al equipo de detección de masas y se encontraron condiciones de ionización adecuadas utilizando un patrón de desoxiuridina 5'-trifosfato (dUTP) parcialmente degradado que contenía dUDP, logrando detectar los iones $(\text{M}-\text{H})^-$ de los 2 compuestos con masas de 466 y 387, respectivamente. A este último se le hizo un análisis de MS-MS y se pudo observar un ión $(\text{M}-\text{H})^-$ de 275 correspondiente a desoxirribosa 5-difosfato obtenida por pérdida de uracilo (Figura 29).

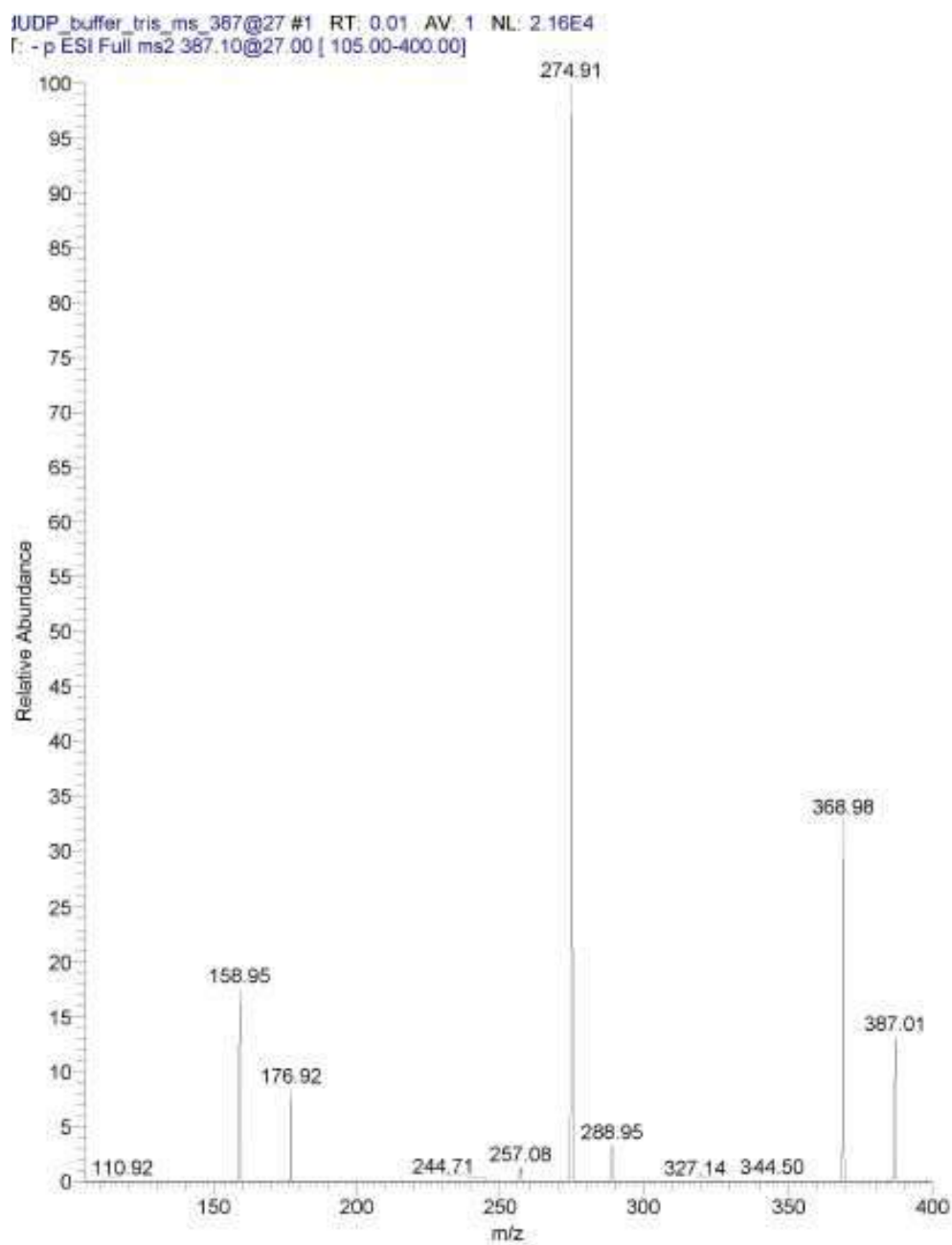


Figura 29: Análisis por MS-MS de un patrón conteniendo dUDP. Se observan los iones $(M-H)^-$ 388 correspondiente a dUDP y 275 correspondiente a desoxirribosa 5-difosfato.

Luego, de ese mismo patrón, se realizó el análisis por HPLC utilizando un sistema de apareamiento iónico con HFPTEA, logrando identificar 2 señales con Tr diferentes, 8.32 min y 12.10 min para dUDP y dUTP, respectivamente (Figura 30), y se verificó su identidad mediante el análisis por MS observando los iones $(M-H)^-$ correspondientes (Figuras 31 y 32, respectivamente).

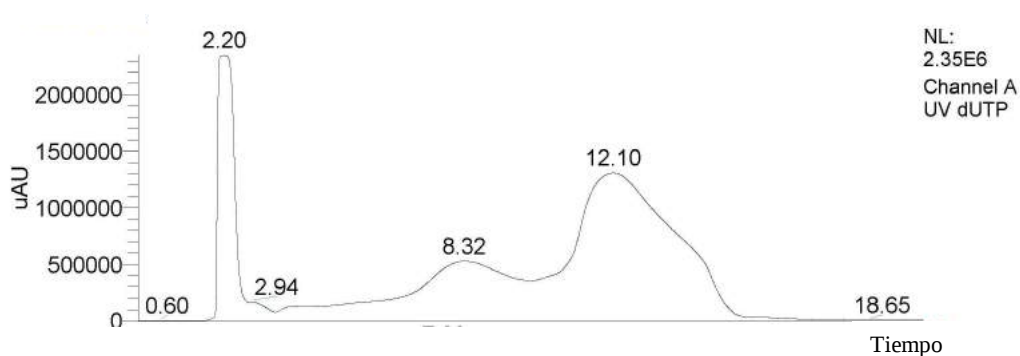


Figura 30: Análisis por HPLC de un patrón de dUTP parcialmente degradado conteniendo dUDP. Los picos con Tr 8.32 y 12.10 corresponden a dUDP y dUTP, respectivamente.

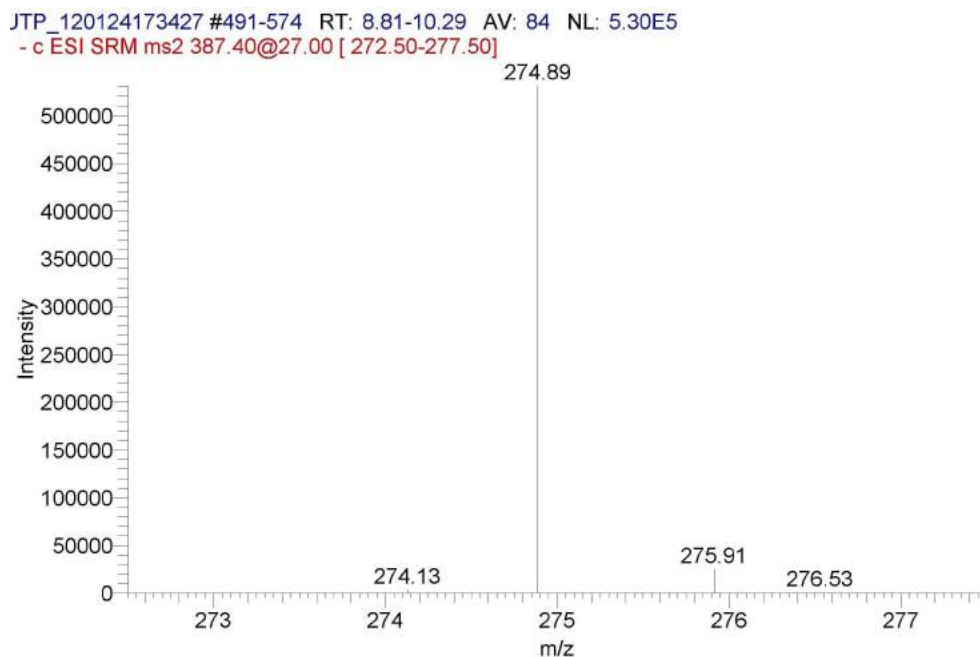


Figura 31: Análisis de MS-MS del pico obtenido por HPLC correspondiente a dUDP. El análisis se realizó mediante la búsqueda de iones (M-H)⁻ 387 y luego de los iones de m/z 275 correspondiente a desoxirribosa 5-difosfato.

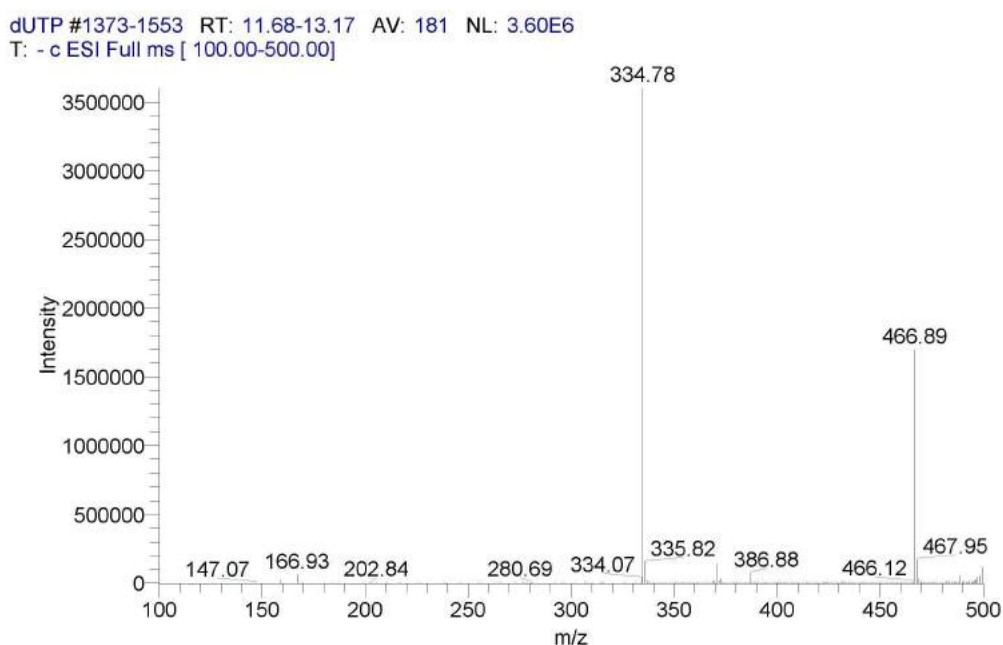


Figura 32: Análisis de MS del pico obtenido por HPLC correspondiente a dUTP. Se observa la presencia del ión (M-H)⁻ 466 del compuesto analizado.

Además, debido a que el dUDP generado en la reacción podría desfosforilarse por acción de fosfatasa [18], se analizó por HPLC una muestra patrón de dUMP el cual presentó un Tr de 5.20 min y, mediante el análisis por MS, se observó la presencia del ión (M-H)⁻: 306.9 correspondiente (Figuras 33 y 34, respectivamente).

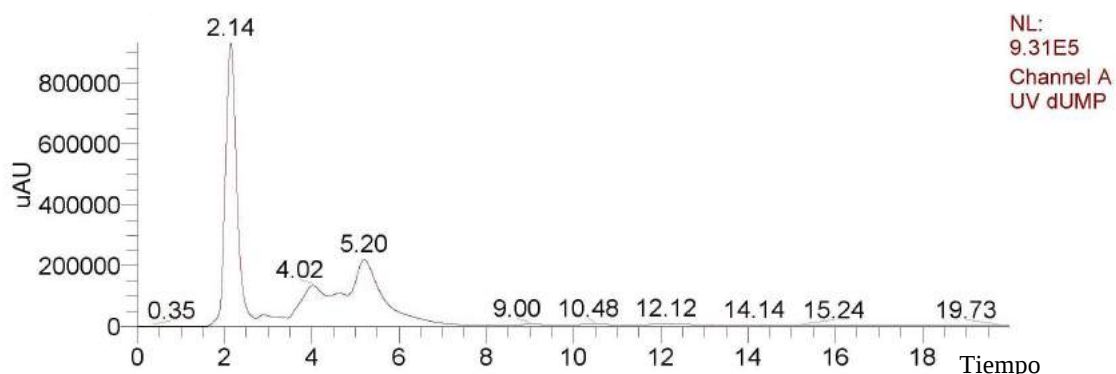


Figura 33: Análisis por HPLC de una muestra de dUMP. El pico obtenido a 5.20 min corresponde al compuesto analizado.

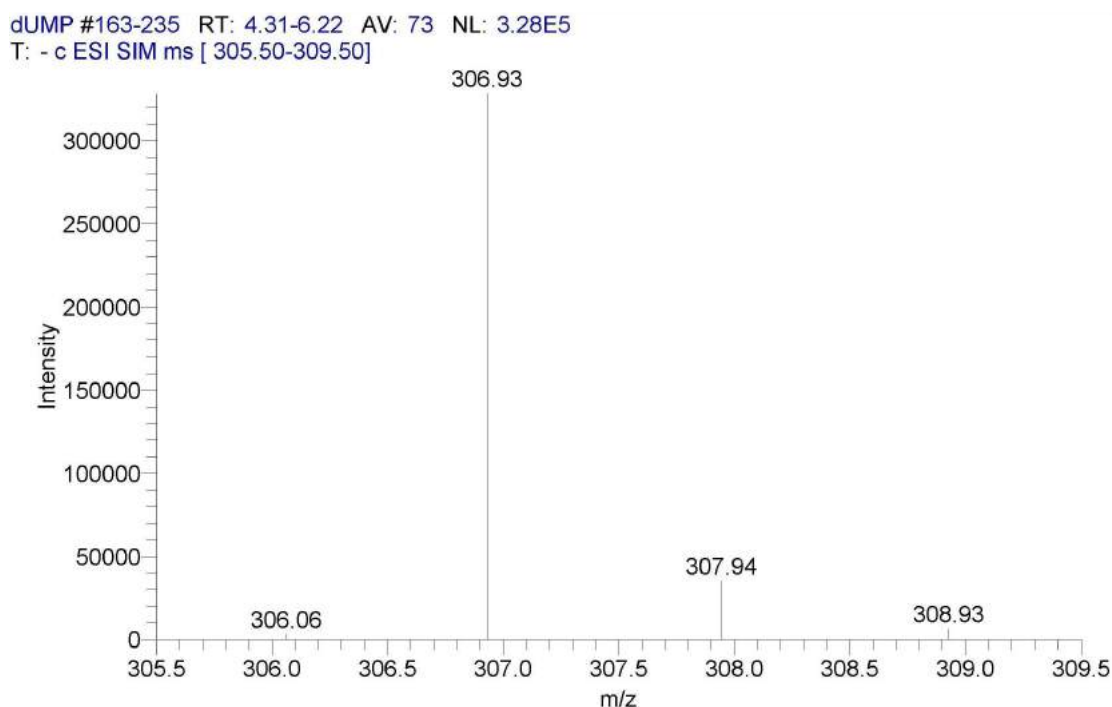


Figura 34: Análisis de MS del pico obtenido por HPLC correspondiente a dUMP. Se observa la presencia del ión (M-H)⁻ 306.9 correspondiente al mismo.

Una vez realizados estos análisis se analizó un tiempo cero de reacción conteniendo UDP, sustrato de la reacción de reducción estudiada, y se lo identificó mediante HPLC con un Tr de 19.3 min (Figura 35).

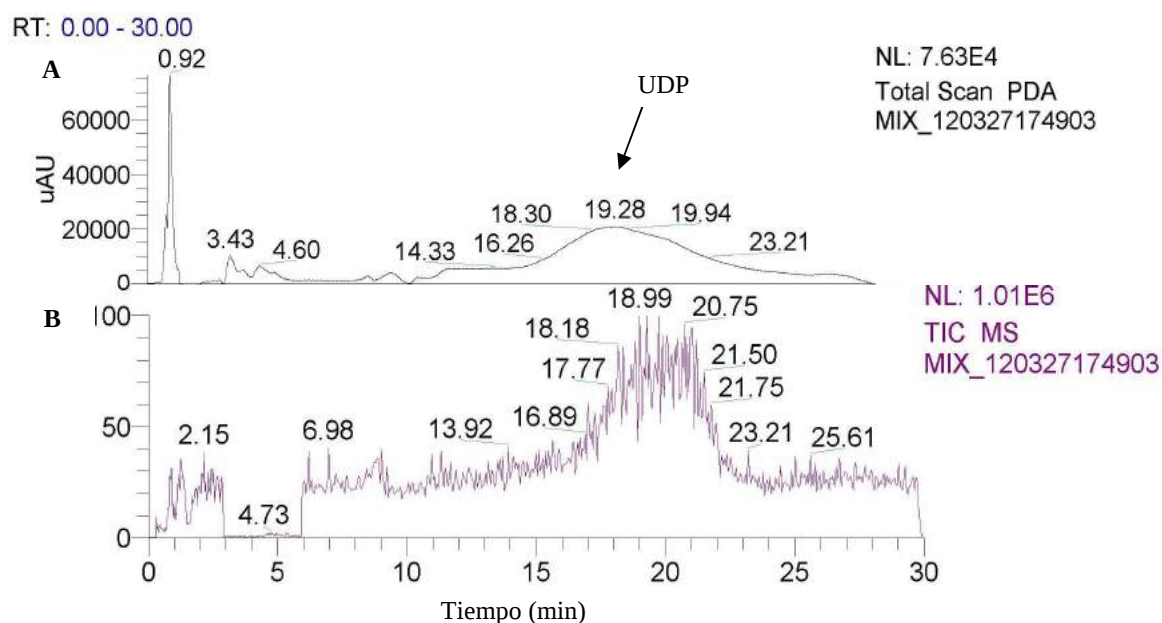


Figura 35: Análisis por HPLC-MS de la mezcla de reacción original (Tiempo cero).

A: Análisis por HPLC, UV-Visible, 254 nm.

B: Análisis de masas, iones totales.

Luego de la puesta a punto del sistema de detección, se procedió a evaluar las mezclas de reacción de las diferentes cepas de *E. coli* y no se logró detectar, en ningún caso, dUDP como producto. Se analizó además la presencia de dUMP obteniéndose nuevamente resultados negativos.

Debido a estos resultados no satisfactorios, se prosiguió con la segunda estrategia planteada en los Objetivos de esta Tesis para la obtención de desoxinucleósidos.

Sin embargo, en el momento final de escritura de este trabajo se detectó, con un análisis más detenido de los cromatogramas obtenidos mediante HPLC de la reacción

biocatalizada por la cepa de *E. coli* ATCC 23513, la presencia de un pico con Tr de 2.11 min. Debido a que en el patrón de dUMP también se detectó dicha señal, se evaluó la posibilidad de que correspondiera a desoxiuridina (dU). Utilizando el mismo sistema de desarrollo y detección que el usado anteriormente, se determinó que el patrón de dU posee Tr de 2.14, con lo cual ese subproducto de reacción podría estar presente en la mezcla, por lo que se comenzará con el análisis de HPLC-MS-MS de la misma de modo de poder identificar la naturaleza de ese producto y asegurar su identidad. En la Figura 36 se muestra el cromatograma de la mezcla de reacción obtenida con *E. coli* ATCC 23513.



Figura 36: Análisis por HPLC de una muestra obtenida con *E. coli* ATCC 23513, la cual podría contener dU como subproducto de reacción (Tr 2.11 min).

6.4. Conclusiones

En esta parte del trabajo se seleccionaron del cepario de nuestro laboratorio, 7 bacterias del género *Escherichia*, en particular de *Escherichia coli*, para ser evaluados como biocatalizadores para la síntesis de dUDP a partir de UDP.

Si bien no se logró reducir UDP utilizando células enteras, la síntesis de este compuesto, detallada en el capítulo anterior, resultó interesante ya que es empleado como precursor de síntesis de diversos productos como por ejemplo UDP-Glc y sus derivados, y su obtención mediante una metodología simple, como la desarrollada, resulta interesante. Así mismo, como se describió en los Capítulos 3 y 4, la obtención de UMP, ampliamente utilizado en la industria alimenticia como resaltador del sabor, resultó satisfactoria. A su vez se logró utilizar las mezclas de síntesis de UMP en reacciones consecutivas *one pot* para la obtención de UDP, proceso novedoso que no requiere ningún paso de purificación.

Actualmente se continúa con el estudio, mediante un análisis más profundo por HPLC-MS-MS, de la muestra de reacción obtenida con *E. coli* ATCC 23513, ya que se detectó un posible subproducto por HPLC que podría corresponder a desoxiuridina, indicando que ocurrió la reducción de UDP a dUDP.

Bibliografía

- [1] Kolberg, M.; Strand, K. R.; Graff, P.; Andersson, K. K. (2004). Structure, function, and mechanism of ribonucleotide reductases. *Biochemica et Biophysica Acta*, **1699**, 1-34.
- [2] Elledge, S. J.; Zhou, Z.; Allen, J. B. (1992). Ribonucleotide reductase: regulation, regulation, regulation. *Trends Biochem. Sci.*, **17**, 119–123.
- [3] Reichard, P. & Ehrenberg, A. Ribonucleotide reductase-a radical enzyme.(1983). *Science*, **221**, 514-519.
- [4] Eklund, H.; Eriksson, M.; Uhlin, U.; Nordlund, P.; Logan, D. (1997). Ribonucleotide reductase-structural studies of a radical enzyme. *Biol. Chem.*, **378**, 821–825.
- [5] Stubbe, J. & van der Donk, W. A. (1998). Protein Radicals in Enzyme Catalysis. *Chem. Rev.*, **98**, 705-762.
- [6] Sjöberg, B. M. (1995). Structure of ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Mol. Biol.*, **9**, 192-221.
- [7] Jordan, A.; Reichard, P. (1998). Ribonucleotide reductases. *Ann. Rev. Biochem.*, **67**, 71-98.
- [8] Högbom, M.; Andersson, M. E.; Nordlund, P. (2001). Crystal structures of oxidized dinuclear manganese centres in Mn-substituted class I ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*: carboxylate shifts with implications for O₂ activation and radical generation. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **6**, 315–323.
- [9] Logan, D. T.; Andersson, J.; Sjöberg, B. M.; Nordlund, P. (1999). A glycy radical site in the crystal structure of a class III ribonucleotide reductase. *Science*, **283**, 1499-1504.
- [10] Mulliez, E.; Fontecave, M.; Gaillard, J.; Reichard, P. (1993). An iron-sulfur center and a free radical in the active anaerobic ribonucleotide reductase of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **268**, 2296-2299.
- [11] Duboc-Toia, C.; Hassan, A. K.; Mulliez, E.; Ollagnier-de Choudens, S.; Fontecave, M.; Leutwein, C.; Heider, J. (2003). Very high-field EPR study of glycy radical enzymes. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 38-39.
- [12] Koc, A.; Mathews, C. K.; Wheeler, L. J.; Gross, M. K.; Merrill, G. F. (2006). Thioredoxin is required for deoxyribonucleotide pool maintenance during S phase. *J. Biol. Chem.*, **281**, 15058-15063.
- [13] Uhlin, U.; Eklund, H. (1994). Structure of ribonucleotide reductase protein R1. *Nature*, **370**, 533–539.

- [14] Eliasson, R.; Pontis, E.; Jordan, A.; Reichard, P. (1996). Allosteric regulation of the third ribonucleotide reductase (NrdEF enzyme) from enterobacteriaceae. *J. Biol. Chem.*, **271** , 26582-26587.
- [15] Kunz, B. A. (1988). Mutagenesis and deoxyribonucleotide pool imbalance. *Mutat. Res.*, **200**, 133–147.
- [16] Meuth, M. (1989). The molecular basis of mutations induced by deoxyribonucleoside triphosphate pool imbalances in mammalian cells". *Exp. Cell Res.*, **181**, 305–316.
- [17] Filpula, D. & Fuchs, J. (1977). Regulation of ribonucleoside diphosphate reductase synthesis in *Escherichia coli*: Increased enzyme synthesis as a result of inhibition of deoxyribonucleic acid synthesis. *J. Bacteriol.*, **130**, 107-113.
- [18] Warner, H. (1973). Properties of ribonucleoside diphosphate reductase in nucleotide-permeable cells. *J. Bacteriol.*, **115**, 18–22.
- [19] Donachie, W. D. (1969). Control of cell division in *Escherichia coli*: experiments with thymine starvation. *J. Bacteriol.*, **100**, 260–268.
- [20] Inouye, M.; Pardee, A. B. (1970). Changes of membrane proteins and their relation to deoxyribonucleic acid synthesis and cell division of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **245**, 5813-5819.
- [21] Denhardt, D. T. & Sinsheimer, R. L. (1965). The Process of Infection with Bacteriophage ϕ X174. III. Phage maturation and lysis after synchronized infection. *J. Mol. Biol.*, **12**, 641-646.
- [22] Larsson, A. & Reichard, P. (1966). Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides. IX. Allosteric effects in the reduction of pyrimidine ribonucleotides by the ribonucleoside diphosphate reductase system of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **241**, 2533-2539.
- [23] Larsson, A. & Reichard, P. (1966). Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides. X. Reduction of purine ribonucleotides; allosteric behavior and substrate specificity of the enzyme system from *Escherichia coli*. *B. J. Biol. Chem.*, **241**, 2540-2549.
- [24] Apffel, A.; Chakel, J. A.; Fischer, S.; Lichtenwalter, K and Hancock, W. S. (1997). Analysis of oligonucleotides by HPLC-Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Anal. Chem.*, **69**, 1320-1325.

CAPÍTULO 7

Obtención de 2-desoxirribosa 5-fosfato mediante el uso de células enteras con actividad DERA y síntesis de desoxinucleósidos

7.1. Introducción

La síntesis química de 2-desoxirribonucleósidos puede producirse mediante diferentes métodos de glicosidación directa, los cuales suelen generar problemas de selectividad en la formación del enlace glicosídico. Una metodología que permite evitar esta problemática utiliza reacciones biocatalizadas por células o enzimas a partir de desoxirribofuranosa 1-fosfato. Dado que este intermediario de síntesis presenta baja estabilidad, la obtención de su precursor 5-fosfato resulta interesante. Si bien la preparación química de estas furanosas 5-fosfato generalmente presenta dificultades asociadas al esquema de protección-desprotección de los grupos hidroxilos de la furanosa, la obtención enzimática implica la utilización de agentes donores de grupos fosfato caros como por ejemplo ATP o fosfoenolpiruvato. Así, la búsqueda de nuevos biocatalizadores capaces de producir desoxirribosa 5-fosfato utilizando metodologías rentables y ambientalmente limpias resulta actualmente un desafío interesante.

7.1.1. Nucleósido fosforilasas: enzimas involucradas en las vías de recuperación de nucleósidos

La ruptura de la unión glicosídica en nucleósidos es un mecanismo fosforolítico catalizado por enzimas del grupo de las glicosiltransferasas – no Leloir- y está involucrado

en las rutas de salvataje celular. Estas vías economizan el gasto energético cuando los precursores apropiados se encuentran disponibles. Estos procesos utilizan bases purínicas y pirimidínicas como precursores para la producción de nucleótidos, por lo que proveen una alternativa para su síntesis de novo [1]. Por otra parte, los productos secundarios obtenidos en las rutas de salvataje celular actúan como fuentes de carbono, nitrógeno y energía (vía conversión de la ribosa, intermediario que puede ingresar a la ruta de las pentosas fosfato y glicólisis).

Naturalmente, las nucleósido fosforilasas (NPs, del inglés *nucleoside phosphorylases*) catalizan la fosforólisis reversible de la unión glicosídica tanto de ribo- como desoxirribonucleósidos de purinas (Pu) y pirimidinas (Py), en presencia de fosfato inorgánico. Este es un proceso en el cual la unión glicosídica C-N se escinde por un ión fosfato, generando la base libre y ribosa 1-fosfato (Rib1P). El estudio de los procesos que involucran estas enzimas demostró que en la fosforólisis enzimática de la unión glicosídica participan dos tipos de enzimas, unas específicas para purinas (purín nucleósido fosforilasas, PNPs) y otras específicas para pirimidinas, como pirimidín fosforilasas (PyNPs) [2]. Posteriormente, se demostró que uno de los productos de la fosforólisis es la Rib1P [3] siendo el fosfato inorgánico el que ataca la posición C1 de la ribosa del nucleósido, descartando la idea de que la ruptura de la unión glicosídica se realiza a través de una reacción de hidrólisis (Figura 37).

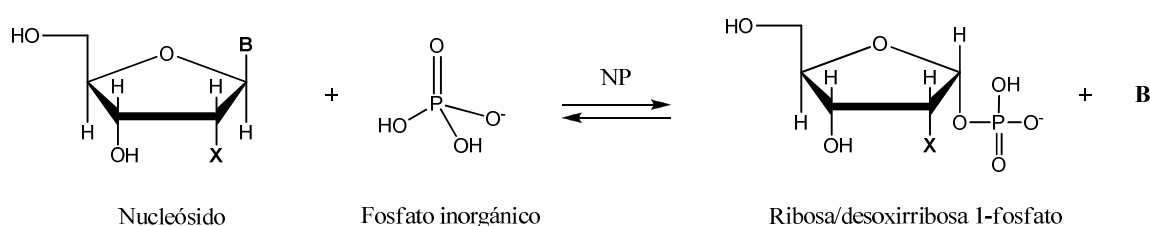


Figura 37: Fosforólisis reversible de nucleósidos catalizada por nucleósido fosforilasas (NP).

X: OH (ribonucleósidos) o H (desoxirribonucleósidos); B: base purínica o pirimidínica.

Este mecanismo, confirmado por *Kalckar* [3], demuestra que las NPs son enzimas de la familia de las transferasas. Se encontraron PyNPs y PNP [4] ampliamente distribuidas en procariotas, levaduras y organismos superiores. Dado que las NPs poseen un rol trascendental en el metabolismo de nucleótidos, son requeridas para el funcionamiento celular normal. Por ello, se propusieron inhibidores específicos de NPs, usualmente nucleósidos modificados, que pueden ser útiles como quimioterapéuticos [5].

Si bien, como se mencionó anteriormente, estas enzimas catalizan una reacción reversible, *in vivo*, la fosforólisis se encuentra altamente favorecida por sobre la reacción de síntesis debido al acoplamiento con otras rutas metabólicas. Sin embargo, en ausencia de otras rutas acopladas, el equilibrio termodinámico se ve desplazado hacia la síntesis del nucleósido en el caso de las PNP, aunque no para las PyNPs. Por esta razón, la combinación de ambas enzimas posibilita la generación de nucleósidos purínicos a partir de nucleósidos pirimidínicos, lo que se conoce como transglicosidación. La Figura 38 representa la reacción de transglicosidación para la obtención de adenosina (Ado) a partir de uridina (Uri) y adenina (Ade). Esta estrategia ha sido ampliamente desarrollada por nuestro grupo de investigación para preparar nucleósidos de base modificada, empleando tanto enzimas aisladas como células enteras [6-10].

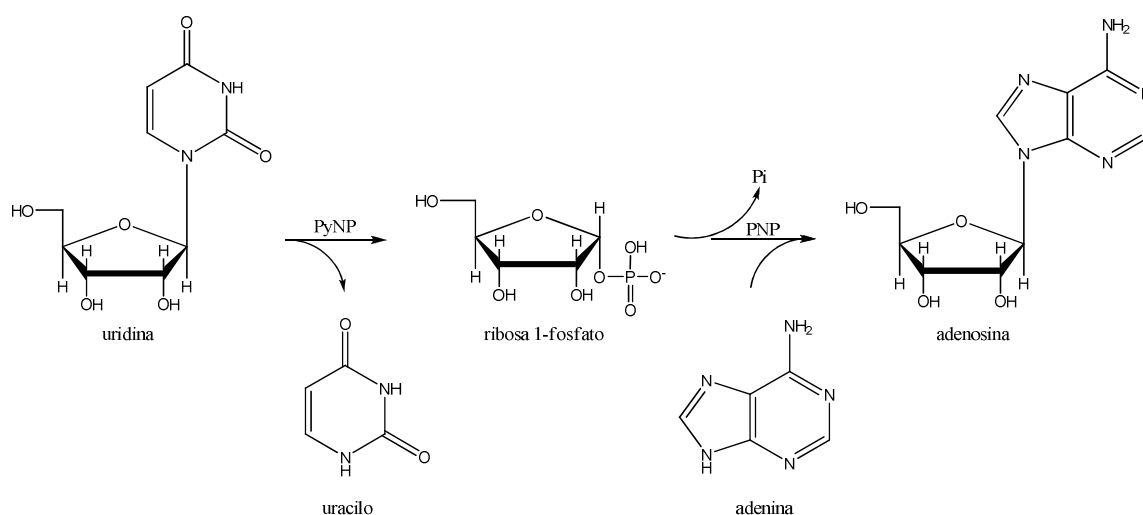


Figura 38: Síntesis de nucleósidos purínicos a partir de nucleósidos pirimidínicos (transglicosidación).

A pesar de la baja homología en la secuencia entre NPs de distintos orígenes, los estudios estructurales demuestran que estas enzimas podrían dividirse en dos grandes familias según el plegamiento que presentan. Por una parte las NP-1, que presentan una estructura cuaternaria trimérica o hexamérica y aceptan como sustratos nucleósidos purínicos (PNP) y algunos pirimidínicos como por ejemplo uridina (Uridín fosforilasa (UP)). Por otra parte, las NP-2 muestran una estructura cuaternaria dimérica y aceptan Td y Uri en organismos inferiores (Timidín fosforilasa -TP- y PyNP, respectivamente).

Por otra parte, se reportó el uso de otras enzimas que rompen la unión nucleosídica. Entre ellas, las nucleósidos hidrolasas como por ejemplo, la inosinasa, uridín nucleosidasa, 5'-2-metiloadenosina/S-adenosilhomocisteína nucleosidasa, AMP nucleosidasa y NAD⁺ nucleosidasa.

Otro tipo de enzimas son las *N*-desoxirribosiltransferasas que catalizan la transferencia de bases purínicas y pirimidínicas entre nucleósidos en un único paso y utilizan residuos específicos de la enzima como nucleófilos que rompen la unión glicosídica [11]. Sin embargo, en ausencia de una base aceptora secundaria, las *N*-desoxirribosiltransferasas también muestran un mecanismo hidrolítico secundario. Otras enzimas utilizan pirofosfato para la ruptura de la unión glicosídica, tales como la adenina fosforribosiltransferasa, hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa, nicotinamida fosforribosiltransferasa.

Cuando la transglicosidación es aplicada a la síntesis de nucleósidos purínicos modificados en la estructura del azúcar, necesariamente el análogo pirimidínico debe estar disponible. Una alternativa para evitar dicha limitación consiste en emplear furanosas 1-fosfato como materiales de partida [12]. Debido a que la síntesis química de dichos compuestos es difícil y la estabilidad de los mismos es muy baja [13], esta estrategia no resulta conveniente. Una opción atractiva es preparar furanosas 5-fosfato para luego convertirlas en furanosas 1-fosfato utilizando la enzima fosfopentomutasa (PPM, del inglés *phosphopentomutase*) (Figura 39). En particular, es posible preparar dNs a partir de 2-

desoxirribosa 5-fosfato (dR5P) y la acción combinada de dos enzimas, PPM y una nucleósido fosforilasa [8].

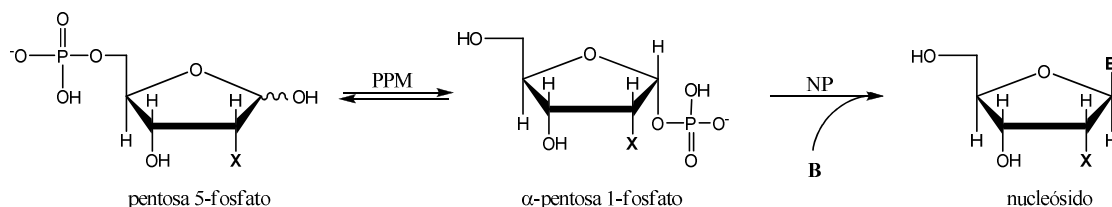


Figura 39: Síntesis de nucleósidos mediante el uso conjunto de PPM y una NP.

NP: nucleósido fosforilasa; PPM: fosfopentomutasa; **B**: base purínica o pirimidínica o análogos;
X: OH: ribosa; H: desoxirribosa.

7.1.2. Fosfopentomutasa

La enzima fosfopentomutasa cataliza la migración del grupo fosfato de la posición 5 hacia la posición 1 con la configuración α -anomérica necesaria para la subsiguiente reacción con una NP (Figura 39). PPM es una metaloenzima [14], dependiente de Mn^{+2} [15] y activada por glucosa 1,6-difosfato.

Esta enzima fue originalmente sobreexpresada en conjunto con timidín fosforilasa (TP) por *Valentin-Hansen et al.* [16]. *Barbas & Wong* [17] establecieron que PPM de *E. coli* acepta como sustrato dR5P, ribosa 5-fosfato (Rib5P) y arabinosa 5-fosfato (Ara5P) pero no 2,3-didesoxirribosa 5-fosfato (ddR5P). *Owerkerk et al.* [18] utilizaron PPM para sintetizar ^{15}N y ^{13}C timidina y 2'-desoxiuridina. Recientemente, *Taverna-Porro et al.* [19] reportaron la síntesis quimioenzimática de dR5P, Rib5P y Ara5P con el objetivo de evaluar la producción de nucleósidos naturales y modificados mediante el uso de una PPM de *E. coli* BL21 sobreexpresada. Si bien la síntesis química de azúcares 5-fosfato fue adecuada, la búsqueda de nuevas estrategias biocatalíticas resulta muy interesante. Una de las

alternativas más atractivas corresponde al uso de aldolasas. A continuación se realiza una breve descripción de las características de este tipo de enzimas.

7.1.3. Aldolasas

Las aldolasas, enzimas pertenecientes a la familia de las liasas, catalizan la unión reversible y estereoespecífica de un compuesto de uno a tres carbonos conteniendo un grupo carbonilo (dador nucleofílico) con un aldehído (aceptor electrofílico) [20], reacción conocida como condensación aldólica. Se las agrupa según su dependencia respecto del sustrato dador; este puede ser dihidroxiacetona fosfato (DHAP) (grupo I), piruvato o fosfoenolpiruvato (grupo II), acetaldehído (grupo III) o glicina (grupo IV) [20]. Además, se las clasifica según su mecanismo de acción; aquellas que forman un intermediario Base de Schiff se consideran de tipo I, mientras que aquellas otras que poseen un átomo de Zn^{+2} en su sitio activo son de tipo II. Los mecanismos de reacción se muestran en las Figuras 40 y 41, respectivamente.

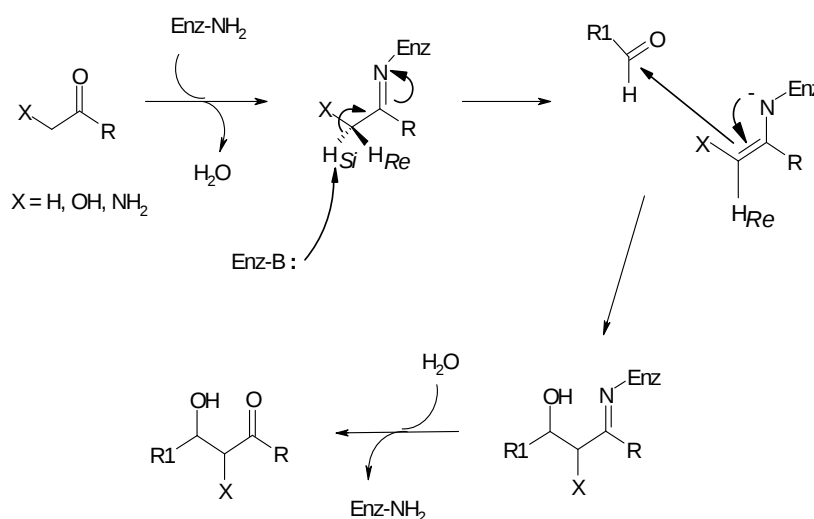


Figura 40: Mecanismo de reacción de una aldolasa de tipo I.

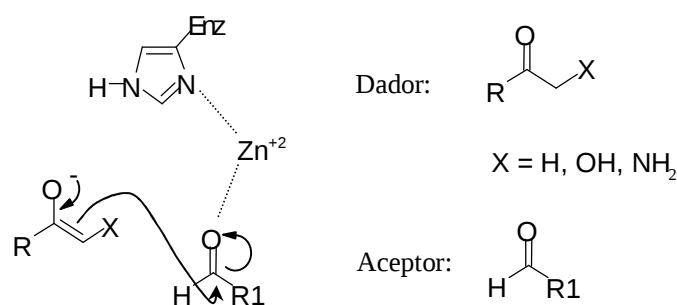


Figura 41: Mecanismo de reacción de una aldolasa de tipo II.

En general, las aldolasas poseen alta especificidad por la molécula dadora y baja especificidad por la molécula aceptora. Por esta razón, estas enzimas permiten obtener diversos compuestos variando preferencialmente el sustrato aceptor. Además, las aldolasas toleran una amplia variedad de sustratos no naturales y, en la mayoría de los casos, la estereoselectividad de la reacción resulta altamente predecible [21].

Las aldolasas intervienen principalmente en el metabolismo de carbohidratos y, debido a que la glucólisis y la gluconeogénesis, son una *conditio sine qua non* para la viabilidad celular, diversos organismos poseen estas enzimas. Se identificaron un gran número de microorganismos portadores de aldolasas, lo que facilita la disponibilidad y el aislamiento de estas enzimas para su uso como biocatalizadores [22]. A continuación se describen brevemente las características de los grupos de aldolasas así como su aplicación en biotransformaciones.

7.1.3.1. Grupo I

Entre las aldolasas que pertenecen al grupo I, la fructosa 1,6-difosfato (FDP) aldolasa (EC 4.1.2.13) posee la mayor utilidad sintética. Esta enzima cataliza la adición aldólica reversible de dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y G3P para formar FDP. Se aislaron un gran número de FDP aldolasas de tipo I y II a partir de una extensa variedad de organismos

procariotas y eucariotas. En particular, las FDP aldolasas de músculo de conejo (*rabbit muscle aldolase*, o RAMA) y de *E. coli*, de tipo I y tipo II respectivamente, se estudiaron ampliamente y se hallan disponibles comercialmente. A pesar de tener un pequeño grado de homología, FDP aldolasa de *E. coli* y RAMA poseen casi la misma especificidad por sustrato dador [21]. Por su parte, RAMA presenta alta especificidad por DHAP pero muy baja para el sustrato aceptor, de modo que pudieron utilizarse 75 aldehídos estructuralmente muy distintos al sustrato natural y aún así todos los productos tienen la misma configuración absoluta en los nuevos centros quirales, (3S,4R)-*treo* [21]. Debido a la baja especificidad por el sustrato aceptor que presenta RAMA, esta enzima resulta de gran utilidad para la síntesis de una variedad de carbohidratos y de sus análogos [23-26].

Los requerimientos para el sustrato dador son mucho más estrictos. Como únicas variantes a DHAP, se encontraron algunas con una sustitución del grupo hidroxilo, en el carbono adyacente al grupo fosfato, por un grupo metilo y la sustitución del grupo fosfato por un grupo arseniato. De todas formas, la velocidad de reacción se ve reducida en un orden de magnitud [20]. Dado que la DHAP disponible comercialmente es costosa, se diseñaron una gran variedad de estrategias para su obtención [27].

Además de FDP aldolasa, en el metabolismo de carbohidratos, se destacan otras tres aldolasas diastereocomplementarias dependientes de DHAP: *L*-fuculosa 1-fosfato (Fuc1P) aldolasa (EC 4.1.2.17), *L*-ramnulosa 1-fosfato (Rha1P) aldolasa (EC 4.1.2.19) y tagatosa 1,6-difosfato (TDP) aldolasa. De esta forma, es posible generar todos los estereoisómeros posibles de un diol a partir de la condensación de DHAP y un aldehído [21]. *Liu et al.* [24] y *Durrwachter et al.* [28] utilizaron Fuc1P aldolasa y Rha1P aldolasa en la síntesis de cetosas 1-fosfato poco comunes, así como también en la síntesis de aza y desoxiaza azúcares. Dado que se observó que el producto de reacción de TDP aldolasa presenta la configuración esperada y únicamente con su sustrato natural, esta enzima carece de utilidad sintética a menos que sea modificada por ingeniería de proteínas para tal fin [21].

7.1.3.2. Grupo II

Las aldolasas más estudiadas de este grupo son la ácido *N*-acetilneurámico (NeuAc) aldolasa (EC 4.1.3.3) y la 3-desoxi-*D*-mano-2-octulosonato (KDO) aldolasa (EC 4.1.2.23).

La NeuAc aldolasa cataliza la adición reversible de piruvato y *N*-acetilmanosamina (ManNAc) para formar NeuAc (o más comúnmente denominado ácido siálico). NeuAc aldolasa ha sido aislada de bacterias y animales y, en ambos casos, es de tipo I. Esta enzima tiene una absoluta especificidad por su dador natural, piruvato, pero una especificidad baja en cuanto al aldehído aceptor [21].

La síntesis de NeuAc es poco interesante debido a que se lo ha aislado de la leche de vaca. Sin embargo, la producción de análogos de NeuAc es de gran interés ya que sus derivados cumplen un papel importante en el reconocimiento bioquímico en mamíferos [26]. En particular, los ácidos polisiálicos están involucrados en la adhesión celular y en la comunicación intercelular en bacterias y tejidos de mamíferos. *Spalstein et al.* [29] y *Nagy et al.* [30] reportaron la producción de poliacrilamidas con grupos sialósidos en la posición *alfa* y con polímeros de sialósidos, respectivamente. Estas se emplean como inhibidores de la aglutinación de eritrocitos por la acción del virus de la influenza [21].

KDO y su forma activada, CMP-KDO, son azúcares intermediarios en la biosíntesis de la porción de lípido A de los lipopolisacáridos (LPS) de las bacterias gram-negativas. Por tal razón, la producción de análogos KDO reviste gran interés debido a su potencial función inhibitoria en la síntesis de LPS o de la proteína de unión a LPS [21].

La KDO aldolasa condensa *D*-arabinosa con piruvato para rendir KDO. Se ha descubierto que la KDO aldolasa de *Aureobacterium barkerei* acepta un gran número de sustratos, incluyendo triosas, tetrasas, pentosas y hexosas.

7.1.3.3. Grupo III

La 2-desoxirribosa 5-fosfato aldolasa (DERA) es la única enzima que pertenece al grupo III y utiliza como sustrato dador un aldehído, acetaldehído. Esta aldolasa fue el

biocatalizador implicado, en forma de células enteras, en el presente trabajo por lo cual será posteriormente descripta en mayor detalle.

7.1.3.4. Grupo IV

La treonina aldolasa, principal enzima de este grupo, cataliza la condensación aldólica reversible entre glicina y acetaldehído para rendir treonina. Tanto la *D*- como la *L*-treonina aldolasa son conocidas y ambas generan centros quirales con absoluta estereoselectividad [31]. En general, estas enzimas se utilizan en la resolución de β -hidroxi- α -aminoácidos [32]. Se reportaron muy pocos ejemplos de su empleo en reacciones de formación de uniones C-C. Entre ellos, se destacan la preparación de intermediarios de síntesis de micestericina D, un potente inmunosupresor [33] y la obtención de β -hidroxi- α -aminoácidos utilizados para la producción de hexapéptidos miméticos de ARN [34]. En ambos casos se ha utilizado *L*-treonina aldolasa (EC 4.1.2.5) de *Candida humicola*.

7.1.4. DERA: 2-desoxirribosa 5-fosfato aldolasa

La 2-desoxirribosa 5-fosfato aldolasa (DERA) (EC 4.1.2.4) *in vivo*, cataliza la condensación reversible de gliceraldehído 3-fosfato (G3P) y acetaldehído, para generar 2-desoxirribosa 5-fosfato (dR5P) [35] (Figura 42).

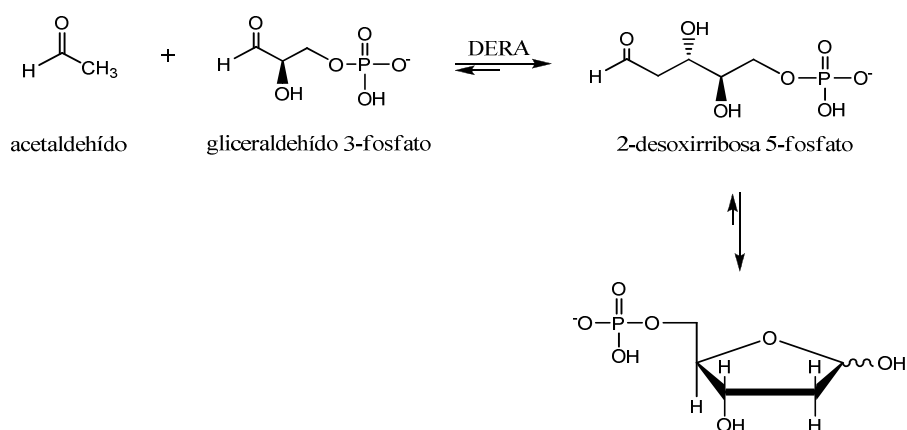


Figura 42: Reacción catalizada *in vivo* por DERA.

La reacción de condensación catalizada por DERA entre su sustrato aceptor natural, G3P, y un dador aldehídico no natural, como propanal, acetona y fluoracetona [21], permite obtener desoxirribosas 2-sustituídas (Figura 43), siempre con configuración *S* en el carbono quiral generado. Estos compuestos son intermediarios clave para la síntesis de nucleósidos.

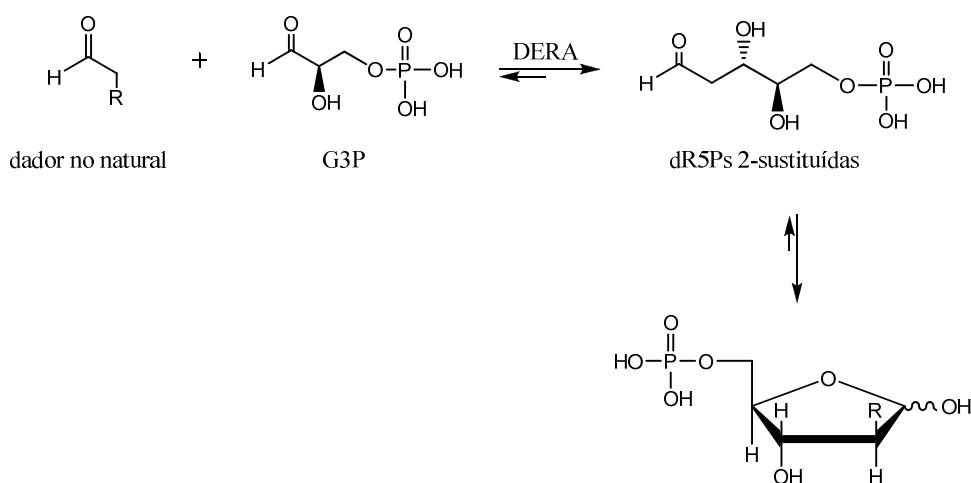


Figura 43: Reacción de síntesis de desoxirribosas 2-sustituídas catalizada por DERA.

Ogawa *et al.* [36] reportaron la síntesis de dR5P a partir de DHAP y acetaldehído, empleando células de *Klebsiella pneumoniae* con actividad triosa fosfato isomerasa (TPI) y DERA. Basándose en la publicación anterior, Horinouchi *et al.* [37] lograron producir dR5P a partir de glucosa, acetaldehído y ATP. Para ello, clonaron y sobreexpresaron el gen que codifica para DERA de *K. pneumoniae* en una cepa de *E. coli* con actividad fosfatasa negativa y utilizaron dichas células como biocatalizador. Más tarde, este mismo grupo de investigadores se basó en el metabolismo fermentativo de las levaduras para desarrollar una estrategia que permitiera regenerar ATP en forma económica a partir de glucosa en simultáneo con la acumulación de FDP. Luego, utilizaron dicho intermediario preparado enzimáticamente, como material de partida para la síntesis de dR5P mediante la biotransformación diseñada anteriormente [38].

Asimismo, las reacciones secuenciales catalizadas por DERA permiten sintetizar productos complejos y polifuncionales utilizando materiales de partida económicos en forma rápida e integrada. Cuando acetaldehído, o un derivado de éste, es el sustrato aceptor, la condensación con otra molécula de acetaldehído da lugar al correspondiente β -hidroxi aldehído. Luego, este compuesto interviene en una segunda reacción aldólica con otra molécula dadora de acetaldehído para finalmente rendir β,δ -dihidroxi aldehído. La reacción en cadena es terminada en este nivel de la cascada debido a la formación de un hemiacetal estable, el cual no posee un grupo aldehído libre y por tanto no puede actuar como aceptor en la reacción aldólica [23] (Figura 44).

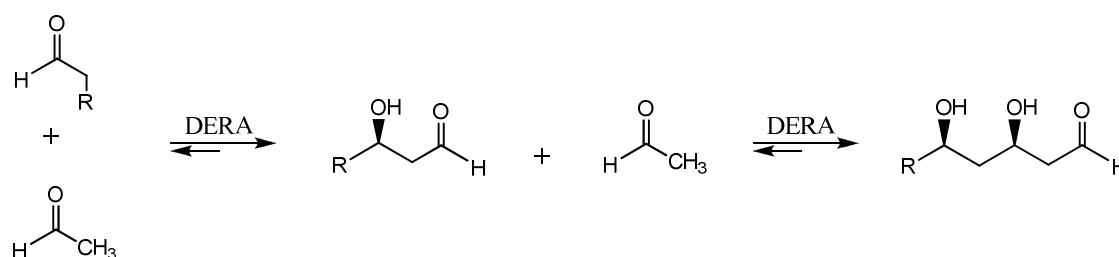


Figura 44: Reacción secuencial catalizada por DERA.

Gijzen [39] y *Wong* [40] desarrollaron en forma eficiente reacciones secuenciales catalizadas por DERA para obtener cadenas laterales quirales de compuestos denominados estatinas. Estos son inhibidores de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) reductasa, una enzima que disminuye los niveles de colesterol. Dichos compuestos tienen valores de venta en el mercado mundial de aproximadamente US\$ 20 billones. Entre ellos se destacan atorvastatina y rosuvastatina, comercializados por Pfizer y AstraZeneca como “Lipitor” y “Crestor”, respectivamente [41].

Wong et al. [40] informaron la aplicación de un microorganismo recombinante conteniendo DERA en la síntesis de una variedad de análogos de azúcar, tio-azúcares, y precursores de glicolípidos, demostrando que la enzima es capaz de aceptar una variedad de sustratos.

7.1.4.1. Estructura

Valentin-Hansen *et al.* [42] secuenciaron el gen que codifica DERA de *E. coli* K12 y determinaron que el monómero de dicha proteína posee un peso molecular de 28 kDa y consiste en 259 residuos aminoácidos. Luego, Barbas *et al.* [35] subclonaron y sobreexpresaron el gen de DERA de *E. coli* K12 en *E. coli* EM2929. Actualmente, tanto DERA de *E. coli* K12 como de *Lactobacillus plantarum* se hallan disponible comercialmente. Esta última posee 215 aminoácidos y tiene un peso molecular de 23 kDa.

En general, las aldolasas tienen estructura multimérica [43, 44]. Originalmente se reportó la existencia de DERA tanto como monómero o dímero en solución [42]. Estudios recientes confirmaron que la enzima se halla en forma monomérica en *buffer* Tris-HCl-EDTA, mientras que en *buffer* fosfato se la encuentra en forma dimérica [45].

7.1.4.2. Organización génica

El operón *deo* contiene cuatro genes estructurales que codifican enzimas involucradas en el catabolismo de nucleósidos. Dichos genes son *deoC*, *deoA*, *deoB* y *deoD*, codificantes de DERA, PyNP, PPM y PNP, respectivamente [46] (Figura 45). La transcripción de los cuatro genes a partir de los promotores adyacentes P1 y P2 es inducida por dR5P y reprimida por la proteína *deoR*. Por otra parte, la transcripción a partir de P2 depende del complejo CRP/cAMP, es estimulada por citidina o adenosina y regulada negativamente por la proteína *cytR*. Por último, la transcripción a partir de P3 es inducida por inosina o guanosina y reprimida por una proteína desconocida [16].

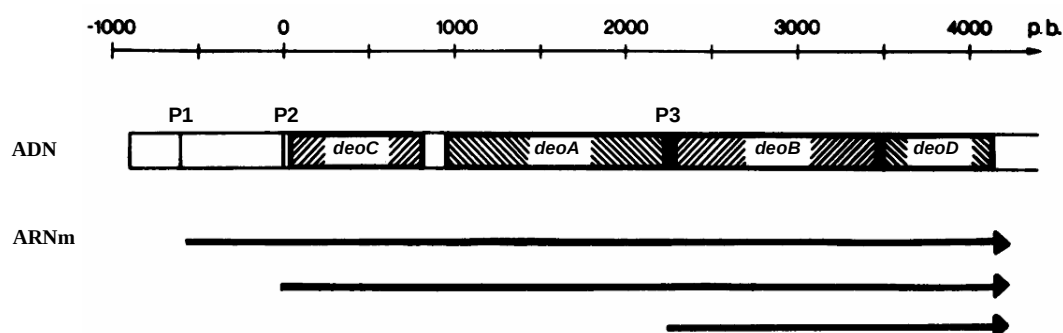


Figura 45: Estructura del operón *deo*. [42] Valentin-Hansen, P.; Hammer, K.; Love Larsen, J. E.; Svendsen, I. (1984). *Nucleic Acids Research*, **12**, 5211-5224.

Se demostró que bacterias como *L. plantarum* [47], *E. coli* [48], *Salmonella typhimurium* [49] y *Bacillus cereus* [50] pueden utilizar 2-desoxirribosa libre exógena como fuente de carbono y energía por acción de permeasas, seguida por la fosforilación mediada por la enzima 2-desoxirribosa kinasa para rendir dR5P y por la subsiguiente descondensación catalizada por DERA [49].

Por otra parte es importante destacar que la síntesis química de pentosas y desoxipentosas 5-monofosfato requiere varios pasos de protección y deprotección utilizando generalmente condiciones que deben ser estrictamente controladas y solventes tóxicos. La importancia de encontrar nuevos biocatalizadores para la producción de dR5P radica en que las rutas de síntesis de ésta utilizan como materias primas compuestos de bajo costo comercial, como por ejemplo glucosa, y condiciones suaves de reacción generando productos enantioméricamente puros.

En esta parte del trabajo se describe el *screening* jerárquico empleado para encontrar células enteras bacterianas que contienen DERA, con el fin de ser empleadas como biocatalizadores para preparar DR5P utilizando reactivos económicos. Las mezclas de reacción obtenidas se acoplaron a la síntesis de desoxinucleósidos empleando las enzimas PPM y nucleósido fosforilasas según la estrategia planteada en el actual Capítulo.

7.2. Materiales y Métodos

7.2.1. Materiales

Todos los productos empleados fueron de calidad analítica. Los sustratos y reactivos y la enzima timidín-fosforilasa (TP) fueron de Sigma-Aldrich. Las drogas para los medios de cultivo fueron de Anedra, Britania y Sigma-Aldrich. La enzima fosfopentomutasa (PPM) fue cedida gentilmente por Taverna-Porro, M., INGEBI, CONICET. Los solventes utilizados para el análisis cuali-cuantitativo, el revelado y para HPLC fueron de Sintorgan, Biopack y Carlo Erba, respectivamente.

7.2.2. Metodología

7.2.2.1. *Screening* de microorganismos que contienen DERA

7.2.2.1.1. *Screening* primario

Los microorganismos (109 cepas) fueron cultivados en medio líquido de inducción (MI) con la siguiente composición (p/v): KH_2PO_4 0.1%, K_2HPO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03%, extracto de levadura 0.01%, NH_4Cl 0.2% y 2-desoxirribosa (DR) 0.3% (esterilizada por filtración), en agua, y bajo las condiciones siguientes pH 7.0, 28°C y 200 rpm. El inóculo se realizó a partir de un stock almacenado a -80°C. Se consideraron positivos aquellos cultivos en los que se observó turbidez como indicador de crecimiento bacteriano respecto de un control negativo sin inóculo luego de 48h de crecimiento.

7.2.2.1.2 *Screening* secundario

Las microorganismos se cultivaron en presencia de 200 mM de acetaldehído en medio de cultivo líquido y a la temperatura (T) y tiempo de crecimiento óptimos (t) para cada uno

de ellos, de acuerdo a la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, del inglés *American Type Culture Collection*), según se detalla a continuación: *Aeromonas* (T: 30°C, t: 1 día), *Pseudomonas* (T: 26°C, t: 1 día), *Bacillus* (T: 30°C, t: 1 día), *Achromobacter* (T: 30°C, t: 2 días), *Citrobacter* (T: 37°C, t: 1 día), *Enterobacter* (T: 37°C, t: 1 día), *Klebsiella* (T: 37°C, t: 2 días), *Escherichia* (T: 37°C, t: 1 día), *Proteus* (T: 37°C, t: 1 día), *Xanthomonas* (T: 26°C, t: 1 día), *Cellulomona* (T: 30°C, t: 1 día), *Staphylococcus* (T: 37°C, t: 1 día), *Micrococcus* (T: 30°C, t: 1 día), *Agrobacterium* (T: 26°C, t: 2 días) y *Serratia* (T: 26°C, t: 5 días) se crecieron en medio Luria Broth (LB); *Erwinia* (T: 30°C, t: 1 día) y *Arthrobacter* (T: 26°C, t: 2 días) en Medio II; *Corynebacterium* (T: 30°C, t: 2 días) y *Brevibacterium* (T: 30°C, t: 2 días) en medio *Corynebacterium*; *Lactobacillus* (T: 37°C, t: 1 día) en MRS broth (oxoid CM359); *Streptomyces* (T: 28°C, t: 5 días) en medio *Streptomyces*, mientras que *Nocardia* (T: 30°C, t: 1 día) en medio YEME (agar Bennett). En el Anexo I se muestra en detalle la composición de los medios de crecimiento para cada microorganismo.

Del mismo modo que para el *screening* primario, se consideraron positivos aquellos cultivos en los que se observó turbidez como indicador de crecimiento bacteriano respecto de un control negativo sin inóculo luego de 48h de crecimiento.

7.2.2.2. Preparación de los biocatalizadores

Las cepas seleccionadas en la etapa anterior fueron crecidas en medio líquido y en las condiciones óptimas, detalladas anteriormente, hasta fase exponencial media. Luego, se tomó un volumen equivalente al 10% (v/v) del volumen de MI a utilizarse (250 mL) y se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos. El pellet de células fue utilizado como inóculo en MI. Estos subcultivos fueron mantenidos a 28°C y 200 rpm durante aproximadamente 20h. Luego, se centrifugaron en las condiciones descriptas anteriormente, se descartaron los sobrenadantes y las células húmedas enteras fueron utilizadas como biocatalizadores.

7.2.2.3. Biotransformaciones

7.2.2.3.1. Preparación de DR5P a partir de gliceraldehído 3-fosfato (MR1)

La mezcla de reacción compuesta por biocatalizador 15% (p/v), *D-L* gliceraldehído 3-fosfato 98.7 % (p/v), acetaldehído 200 mM y *buffer* Tris-HCl 200 mM pH 9 (en 1 mL de volumen final) se agitó a 200 rpm y 28°C durante 3h. Las mezclas se centrifugaron a 11000 rpm por 3 minutos y se analizaron los sobrenadantes por CCD.

7.2.2.3.2. Preparación de DR5P a partir de glucosa (MR2)

La mezcla de reacción estándar compuesta por biocatalizador 12.5% (p/v), glucosa 500 mM, MgSO₄·7H₂O 15 mM, adenosina 5'-trifosfato (ATP) 15 mM, xileno 1% (v/v), acetaldehído 200 mM y *buffer* fosfato de potasio 100 mM pH 7.5 (en 1 mL de volumen final) se agitó a 200 rpm y 28°C durante 3h. Las mezclas se centrifugaron a 11000 rpm por 3 minutos y los sobrenadantes se analizaron por CCD.

La biotransformación optimizada involucró la adición de 0.4% (v/v) de Tween-20 (MR2-T).

Para el ensayo de obtención de desoxinucleósidos la mezcla de reacción se liofilizó utilizando un equipo Freezone 4.5 LABCONCO, y se resuspendió en 1 mL de *buffer* Tris-HCl 80 mM pH 8.0.

7.2.2.3.3. Preparación de DR5P a partir de fructosa 1,6-difosfato (MR3)

La mezcla de reacción compuesta por biocatalizador 13% (p/v), acetaldehído 400 mM, xileno 1% (v/v), fructosa 1,6-difosfato 50% (v/v) de una solución obtenida según *Horinouchi et al.* [38] (procedimiento detallado a continuación), en agua destilada (1 mL de

volumen final) se agitó a 200 rpm y 28°C durante 3h. Las mezclas se centrifugaron a 11000 rpm por 3 minutos y los sobrenadantes se analizaron por CCD.

Preparación de FDP:

- a) Autolisado de levadura: Se trató levadura comercial 33% (p/v) con tolueno 16% (v/v) en buffer fosfato 176 mM pH 7 durante 1h a 37°C, sin agitación. Se centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante y las células de levadura obtenidas se usaron como autolisado para obtener FDP.
- b) Producción de FDP: Se incubó el autolisado de levadura 60% (p/v) con glucosa 1100 mM, KH_2PO_4 375 mM, K_2HPO_4 375 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 30 mM y AMP 15 mM a 37°C durante 7h, sin agitación. Se centrifugó la mezcla y el sobrenadante se empleó como fuente de FDP.

7.2.2.3.4. Preparación de DR5P a partir dihidroxiacetona fosfato (MR4)

La mezcla de reacción compuesta por biocatalizador 15% (p/v), dihidroxiacetona fosfato 98.7 mM, acetaldehído 200 mM y agua destilada (en 1 mL de volumen final) se agitó a 200 rpm y 28°C durante 3h. Las mezclas se centrifugaron a 11000 rpm por 3 minutos y los sobrenadantes se analizaron por CCD.

7.2.2.3.5. Biotransformaciones con detergentes

Se agregó a MR1 0.4% (v/v) de surfactante Tritón X-100 ó Nonidet P-40 y se continuó con el procedimiento de la biotransformación estándar.

7.2.2.3.6. Síntesis de desoxinucleósidos

El medio de reacción para la obtención de desoxinucleósidos (timidina, Td; desoxiuridina, dU; 5-bromo 2'-desoxiuridina, 5BrdU) consistió en: MnCl_2 1mM, β -

mercaptoetanol 0.2 M, base pirimidínica 6 mM, PPM 0.15 mL (de una solución 0.32 mg/mL), TP 25 µL (de un stock de 1.4 KU/mL) y 0.25 mL de la solución de dR5P obtenida previamente, en 1 mL de volumen final en buffer Tris-HCl 80 mM pH 8.0, 45°C y 160 rpm. Se tomaron alícuotas a diferentes tiempos, se agregó 17% (v/v) HCl 2N para detener la reacción y cada muestra se centrifugó a 10000 rpm por 3 minutos. Los sobrenadantes se almacenaron a -20°C para su posterior análisis.

7.2.2.4. Métodos analíticos

Cromatografía en capa delgada (CCD)

La detección de los productos de reacción se llevó a cabo mediante CCD, utilizando placas de aluminio de silica gel 60F₂₅₄. Para el caso de dR5P y dR se empleó n-butanol/isopropanol/H₂O 3:12:4 (v/v/v) como fase móvil. dR5P y dR (R_fs: 0.25 y 0.64, respectivamente) se detectaron usando anisaldehído 1% (v/v) y H₂SO₄ 2% (v/v) en ácido acético como manchas púrpuras, a 100°C. Por otra parte, la detección de productos desoxinucleosídicos se llevó a cabo utilizando CH₂Cl₂:MeOH 90:10 (v/v) como fase móvil y el revelado se realizó por UV.

Análisis cuantitativo

El análisis cuantitativo de dR5P se llevó a cabo mediante un método colorimétrico según *Burton* [51]. Para ello, se disolvió 1.5 g de difenilamina en 98.5 mL de ácido acético glacial y 1.5 mL de ácido sulfúrico concentrado (solución 1). Por otra parte, se preparó 500 µL de una solución 16 mg/mL de acetaldehído (solución 2). Luego, se mezclaron 20 mL de la solución 1 y 100 µL de la solución 2 para formar el reactivo. Se realizó una curva de calibración tomando 100 µL de reactivo y 50 µL de muestras patrón de 5 a 95 µg/mL de dR5P. Las mezclas se incubaron a 30°C durante 20h y se midió absorbancia a 600 nm con un lector de microplacas Rayto RT-2100C. Las muestras incógnitas fueron tratadas de la misma forma que las muestras patrón.

La cuantificación de nucleósidos y nucleótidos de adenina se realizó mediante HPLC utilizando un equipo Gilson con detector UV (254 nm), inyector automático y columna GraceSmart, C18 fase reversa, 150 mm x 4.6 mm, 5 µm. Se utilizó 12 minutos de *buffer* TEAA 100 mM pH 7.0/ACN (97/3 vol/vol) con flujo 0.9 mL/min, a temperatura ambiente.

Para el análisis y cuantificación de desoxinucleósidos se utilizó agua/metanol (90/10 vol/vol) por 15 minutos, con flujo 0.9 mL/min, a temperatura ambiente. La Tabla 27 muestra los tiempos de retención de las bases pirimidínicas utilizadas y sus respectivos desoxinucleósidos.

Base	Tr (min)	2'-desoxinucleósido	Tr (min)
uracilo	2.74	2'-desoxiuridina	4.53
5-bromouracilo	5.61	5-bromo 2'-desoxiuridina	12.11
timina	4.96	timidina	8.51

Tabla 27: Tiempos de retención de bases y sus desoxinucleósidos.

7.3. Resultados y discusión

7.3.1. Búsqueda de biocatalizadores

Con el objetivo de hallar microorganismos con actividad DERA, se llevaron a cabo dos *screenings* consecutivos sobre el cepario perteneciente a nuestro laboratorio.

7.3.1.1. *Screening* primario

DERA es una enzima perteneciente al metabolismo de desoxirribosa (dR) con lo cual, al cultivar los microorganismos en un medio mínimo con dR como fuente de carbono y energía, su crecimiento indica la inducción de las enzimas de dicho metabolismo, incluyendo DERA [49, 52]. De las 96 cepas que componen la colección de bacterias, se hallaron 41 capaces de crecer en medio de inducción MI, el cual contiene dR como única fuente de carbono (Tabla 28).

Microorganismo	Código ATCC	Microorganismo	Código ATCC
<i>Achromobacter cycloclastes</i>	333*	<i>Erwinia carotovora</i>	33260
<i>Aeromonas hydrophila</i>	15467	<i>Erwinia carotovora</i>	15713
<i>Aeromonas hydrophila</i>	13442	<i>Escherichia coli</i>	4157
<i>Aeromonas punctata</i>	14486	<i>Lactobacillus acetotolerans</i>	43578
<i>Aeromonas salmonicida</i>	14174	<i>Lactobacillus plantarum</i>	20174 #
<i>Aeromonas salmonicida</i>	19261	<i>Micrococcus luteus</i>	9341
<i>Aeromonas salmonicida</i>	33658	<i>Micrococcus luteus</i>	4057*
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	4067*	<i>Norcardia asteroides</i>	19247
<i>Arthrobacter oxydans</i>	14359	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	17588
<i>Bacillus cereus</i>	11778	<i>Serratia macescens</i>	14041
<i>Bacillus cereus</i>	10876	<i>Serratia rubidaea</i>	27593

<i>Bacillus thermoglucosidasius</i>	43742	<i>Streptomyces baldaccii</i>	27429
<i>Brevibacterium linens</i>	9175	<i>Streptomyces blastmyceticus</i>	19731
<i>Brevibacterium linens</i>	9172	<i>Streptomyces cattleya</i>	35852
<i>Cellulomonas celulans</i>	27402	<i>Streptomyces griseus</i>	23921
<i>Corynebacterium ammoniagenes</i>	19350	<i>Streptomyces griseostramineus</i>	19768
<i>Enterobacter aerogenes</i>	13048	<i>Streptomyces sp.</i>	11238
<i>Enterobacter cloacae</i>	4214*	<i>Streptomyces sp.</i>	27448
<i>Enterobacter cloacae</i>	960*	<i>Thermoactinomyces candidus</i>	27868
<i>Enterobacter cloacae</i>	4502*	<i>Xanthomonas fragariae</i>	33239
<i>Enterobacter cloacae</i>	13047		

Tabla 28: Microorganismos seleccionados en el screening primario. *Código de la Colección Española de Cultivos Tipo. # Código de la colección *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* (DSM).

7.3.1.2. Screening secundario

Las biotransformaciones propuestas demandan altas concentraciones de acetaldehído, el sustrajo dador, para favorecer la reacción de condensación catalizada por DERA por sobre la de descondensación. Debido a que los compuestos de esta naturaleza presentan elevada citotoxicidad, resultó necesario hallar microorganismos que puedan tolerar las condiciones de dichas biotransformaciones.

Las cepas bacterianas seleccionadas en la etapa inicial de *screening* se crecieron en sus condiciones óptimas y en presencia de acetaldehído 200 mM. Los resultados fueron analizados con el mismo criterio utilizado en el *screening* primario, encontrándose, entre los 41 candidatos, 8 microorganismos positivos (Tabla 29).

Microorganismo	Código ATCC
<i>Streptomyces griseostramineus</i>	19768
<i>Streptomyces griseus</i>	23921
<i>Streptomyces baldacii</i>	27429
<i>Streptomyces cattleya</i>	35852
<i>Streptomyces sp.</i>	11238
<i>Erwinia carotovora</i>	33260
<i>Erwinia carotovora</i>	15713
<i>Lactobacillus plantarum</i>	14917

Tabla 29: Microorganismos seleccionados en el *screening* secundario.

7.3.2. Biotransformación utilizando gliceraldehído 3-fosfato como material de partida

En primera instancia, y con el fin de estudiar la reacción con el sustrato aceptor natural de DERA, se usó G3P como material de partida. Los ocho microorganismos seleccionados en el *screening* secundario se evaluaron como biocatalizadores utilizando las condiciones descriptas en Materiales y Métodos como MR1, siendo G3P y acetaldehído los materiales de partida.

En la primera reacción estudiada para la síntesis de dR5P, se obtuvieron resultados positivos utilizando *Erwinia carotovora* ATCC 33260 como biocatalizador. Con esta cepa se realizó una cinética de reacción tomando diferentes tiempos y se encontró que 3h era el tiempo óptimo para obtener mayor conversión de dR5P. Luego de ese tiempo se observó disminución en la cantidad del producto de reacción debido al metabolismo celular.

Luego, se ensayaron las 7 cepas restantes y se observó que *Streptomyces griseus*, *Lactobacillus plantarum* y *Erwinia carotovora* ATCC 15713 fueron capaces de producir

dR5P. Para el caso de las cepas de *Streptomyces* restantes, se detectó dR en la mezcla de reacción (Tabla 30) debido, probablemente, a la acción de fosfatasas celulares.

Microorganismo	Material de partida G3P	
	Presencia de dR	dR5P (mM)
<i>Streptomyces griseostramineus</i>	+	-
<i>Streptomyces griseus</i>	-	7.5
<i>Streptomyces baldacii</i>	+	-
<i>Streptomyces cattleya</i>	+	-
<i>Streptomyces sp.</i>	+	-
<i>Erwinia carotovora</i> ATCC 33260	-	10.1
<i>Erwinia carotovora</i> ATCC 15713	-	9.9
<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	7.8

Tabla 30: Resultados obtenidos con todos los biocatalizadores ensayados utilizando MR1.

7.3.3. Biotransformaciones a partir de glucosa como material de partida

Dado que G3P es un compuesto de alto valor comercial así como un metabolito de la glucólisis, se propuso utilizar otros intermediarios glucolíticos de menor costo [37], como glucosa, para generar *in situ* G3P (Figura 46). De esta manera, los microorganismos seleccionados en el *screening* secundario se ensayaron como biocatalizadores utilizando las condiciones descritas en Materiales y Métodos como MR2. Esta mezcla de reacción contiene ATP y MgSO_4 en cantidades catalíticas con el fin de favorecer la síntesis de G3P a partir de glucosa. Se agregó xileno como agente porante de modo de favorecer el ingreso de ATP a las células.

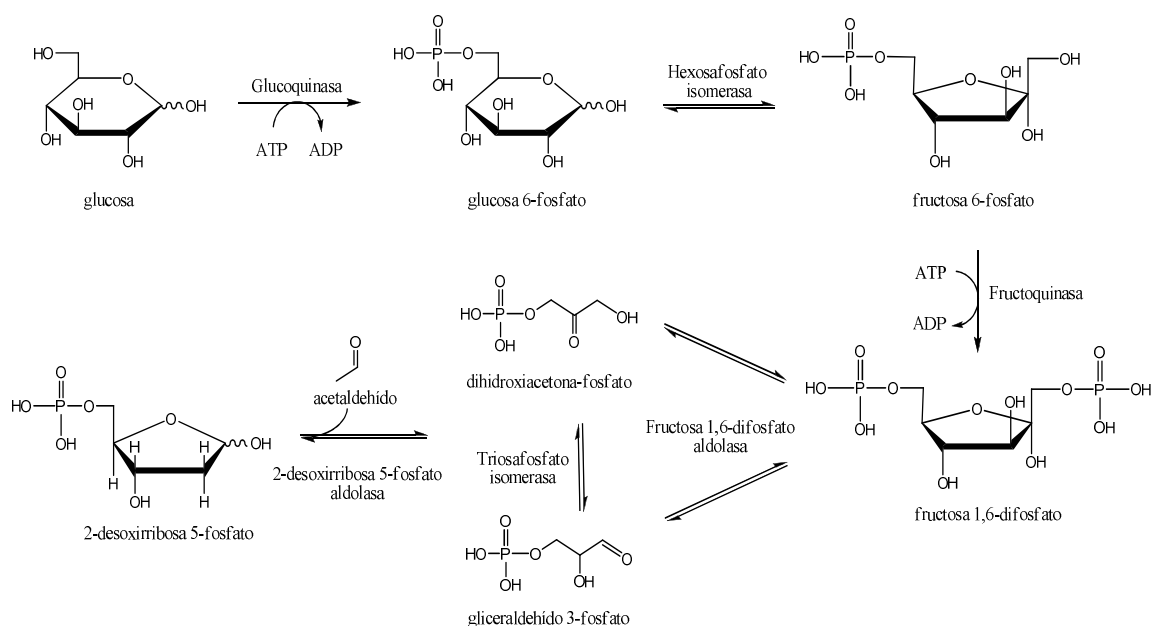


Figura 46: Camino metabólico de formación de dR5P. Se muestra la generación de *D*-gliceraldehído 3-fosfato a partir de glucosa así como de otros intermediarios glucolíticos.

El análisis cualitativo por CCD (Tabla 31) mostró que *E. carotovora* ATCC 33260 fue la única cepa capaz de producir solo dR5P. *E. carotovora* ATCC 15713 produjo dR5P así como dR y para el caso de *Streptomyces griseostamineus* solo se detectó presencia de dR probablemente debido a la actividad fosfatasa celular, como para el caso de MR1. Tanto la glucosa como los intermediarios generados en el metabolismo de la misma pueden formar parte de otros procesos metabólicos, lo cual podría explicar los resultados negativos obtenidos para las cepas restantes.

Microorganismo	Material de partida	
	Glucosa	
	Presencia de dR	dR5P (mM)
<i>Streptomyces griseostramineus</i>	+	-
<i>Streptomyces griseus</i>	-	-
<i>Streptomyces baldacii</i>	-	-
<i>Streptomyces cattleya</i>	-	-
<i>Streptomyces sp.</i>	-	-
<i>Erwinia carotovora</i> ATCC 33260	-	8.6
<i>Erwinia carotovora</i> ATCC 15713	+	17.4*
<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	-

Tabla 31: Resultados obtenidos con todos los biocatalizadores ensayados utilizando MR2.

*Suma de dR y dR5P.

7.3.4. Biotransformaciones a partir de fructosa 1,6-difosfato

Con el objetivo de evaluar otro intermediario glicolítico como material de partida para generar G3P *in situ* (Figura 46), se llevó a cabo un proceso sencillo y rápido de obtención de FDP [38]. Si bien el sustrato inicial de este proceso es glucosa, las levaduras de pan generan, a través de un proceso fermentativo, FDP en buenas concentraciones utilizando fosfato inorgánico como dador de fosfato y sin la necesidad de agregar ATP, como sí ocurre con MR2. De este modo, la mezcla de reacción conteniendo FDP a partir de levadura de pan se utilizó directamente como material de partida para la biotransformación con los microorganismos seleccionados en el *screening* secundario, utilizando las condiciones descriptas como MR3 en la metodología de este Capítulo. Dado que FDP, G3P y DHAP forman parte de un *pool* metabólico (Figura 47), el consumo de G3P catalizado por DERA produce un desplazamiento del flujo metabólico hacia una mayor descondensación de FDP.

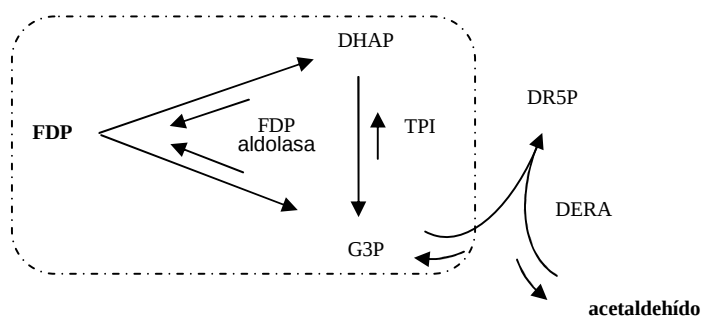


Figura 47: Reacciones metabólicas implicadas en la biotransformación a partir de FDP. En negrita se señalan los sustratos de la biotransformación y recuadrado se muestra el *pool* de metabolitos glicolíticos.

Microorganismo	Material de partida	
	FDP	
	Presencia de dR	dR5P (mM)
<i>Streptomyces griseostramineus</i>	-	-
<i>Streptomyces griseus</i>	-	9.8
<i>Streptomyces baldaccii</i>	-	3.5
<i>Streptomyces cattleya</i>	-	6.4
<i>Streptomyces sp.</i>	-	-
<i>Erwinia carotovora</i> ATCC 33260	-	9.7
<i>Erwinia carotovora</i> ATCC 15713	-	4.7
<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	7.1

Tabla 32: Resultados obtenidos con todos los biocatalizadores ensayados utilizando MR3.

Se identificaron seis cepas positivas para la síntesis de dR5P las cuales no presentaron producción de dR (Tabla 32). Esto último podría deberse a la presencia de inhibidores de fosfatasas contenidos en la mezcla de reacción proveniente de la reacción con levadura para la obtención de FDP. Según datos bibliográficos [53], las levaduras que son sometidas a

algún tipo de estrés, como la modificación de su membrana celular por medio de agentes porantes como el tolueno, producen varios compuestos mediante una serie de reacciones en cascada en respuesta a ese estrés, siendo una de esas moléculas el glicerol fosfato, que es un inhibidor de fosfatasas [54].

7.3.5. Biotransformaciones a partir de dihidroxiacetona fosfato

Si bien el alto costo y la baja estabilidad de DHAP no justifican su uso en biotransformaciones a mediana y gran escala, se consideró interesante llevar a cabo la producción de dR5P con dicho sustrato a fin de comparar los resultados obtenidos con éste y otros materiales de partida. En dicho contexto, sólo se evaluaron dos microorganismos, los que lograron producir dR5P en todas las biotransformaciones anteriores: *Erwinia carotovora* ATCC 33260 y *Erwinia carotovora* ATCC 15713 (Tabla 33). Como se esperaba, ambos produjeron dR5P debido a que el equilibrio de la reacción de isomerización catalizada por triosafosfato isomerasa (TPI) se halla desplazado hacia G3P (Figura 47).

Microorganismo	Material de partida	
	DHAP	
	Presencia de dR	dR5P (mM)
<i>Erwinia carotovora</i> ATCC 33260	-	10.5
<i>Erwinia carotovora</i> ATCC 15713	-	7.2

Tabla 33: Resultados obtenidos con todos los biocatalizadores ensayados utilizando MR4.

7.3.6. Comparación de los resultados obtenidos en las diferentes biotransformaciones

En resumen, las cepas de *Erwinia carotovora* fueron los biocatalizadores más versátiles debido a que generaron dR5P a partir de todos los sustratos ensayados, alcanzando concentraciones mayores a 4.5 mM. En la Tabla 34 se muestra un resumen de los resultados obtenidos.

Microorganismo	Síntesis biocatalizada de dR5P utilizando diferentes materiales de partida							
	G3P (MR1)		Glucosa (MR2)		FDP (MR3)		DHAP (MR4)	
	Presencia de dR	dR5P (mM)	Presencia de dR	dR5P (mM)	Presencia de dR	dR5P (mM)	Presencia de dR	dR5P (mM)
<i>Streptomyces griseostramineus</i>	+	-	+	-	-	-	N/D	N/D
<i>Streptomyces griseus</i>	-	7.5	-	-	-	9.8	N/D	N/D
<i>Streptomyces baldaccii</i>	+	-	-	-	-	3.5	N/D	N/D
<i>Streptomyces cattleya</i>	+	-	-	-	-	6.4	N/D	N/D
<i>Streptomyces sp.</i>	+	-	-	-	-	-	N/D	N/D
<i>Erwinia carotovora</i> ATCC 33260	-	10.1	-	8.6	-	9.7	-	10.5
<i>Erwinia carotovora</i> ATCC 15713	-	9.9	+	17.4*	-	4.7	-	7.2
<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	7.8	-	-	-	7.1	N/D	N/D

Tabla 34: Resumen de los resultados obtenidos con todos los biocatalizadores ensayados en cada medio de reacción.

N/D: No determinado. *Suma de dR y dR5P

Para las reacciones biocatalizadas a partir de G3P, sustrato natural de DERA, es evidente que todos los microorganismos ensayados produjeron en algún momento dR5P, sin embargo para el caso de las cepas del género *Streptomyces*, a excepción de *S. griseus*, la acción rápida de fosfatasa no permitió obtener en producto de interés pero sí dR.

En el caso de las reacciones biocatalizadas a partir de glucosa, precursor de G3P, solo tres cepas fueron positivas para la obtención de dR5P, las dos cepas de *Erwinia*, *E. carotovora* ATCC 33260 y 15713, así como *Streptomyces griseostramineus*, aunque estos dos últimos fueron positivos para dR. El resultado negativo para el resto de los microorganismos podría atribuirse a que, como se mencionó anteriormente, tanto la glucosa

como los intermediarios generados en el metabolismo de la misma, pueden formar parte de otros procesos metabólicos y encontrarse disponibles en menor medida para continuar con el camino de síntesis de dR5P.

Para las reacciones a partir de FDP se encontraron mayormente resultados positivos para la síntesis de dR5P. Esto se debe a que FDP es un precursor directo de G3P, con lo cual los microorganismos positivos para MR1 también lo fueron para este medio. Sin embargo no se obtuvo dR como producto en ninguno de los casos lo cual podría deberse a la presencia de inhibidores de fosfatasa celulares provenientes del medio de reacción con levaduras, como se mencionó anteriormente. Para el caso de *Streptomyces griseostromineus* y *Streptomyces sp.* ese medio de reacción no solo produce inhibición de las fosfatasas sino que también produciría algún tipo de inhibición sobre la actividad de DERA ya que no se detectó dR5P.

Finalmente y como se esperaba, los ensayos realizados a partir de DHAP con las dos cepas de *Erwinia* resultaron positivos.

Considerando el costo de los materiales de partida y la sencillez de las condiciones experimentales, la glucosa (MR2) fue el precursor de G3P elegido para la biotransformación y *E. carotovora* ATCC 33260 fue seleccionado como el biocatalizador adecuado para estudiarlo con mayor detalle.

Paralelamente a los ensayos realizados y con el objetivo de encontrar las condiciones óptimas de la biotransformación en MR2, se evaluó la influencia del tiempo de inducción en MI, así como el tiempo óptimo de reacción, utilizando el biocatalizador seleccionado. Para ello, *E. carotovora* ATCC 33260 se cultivó en su medio óptimo de crecimiento y se subcultivó en MI. La incidencia del tiempo de inducción sobre la producción de DERA se ensayó a 0, 12, 24, 48 y 72h. Posteriormente y con el fin de identificar el tiempo de reacción óptimo, cada fracción se usó como biocatalizador usando las condiciones MR2 y se tomando muestras a 0.5, 1, 2, 3 y 4h. Mediante el análisis por CCD y posterior cuantificación de dR5P (Figura 48), se determinó que las células inducidas por 12h y 24h lograron generar mayores conversiones del producto. La inducción durante 12h permitió

alcanzar 6.2 mM mientras que con 24h de inducción las células generaron 8.6 mM de dR5P, siendo 3h el tiempo óptimo de reacción en ambos casos. Los tiempos de reacción correspondientes a las 0.5h y 2h no mostraron presencia de producto y para el caso de las 4h de reacción la conversión fue prácticamente igual a la obtenida a las 3h, para todos los los tiempos de inducción.

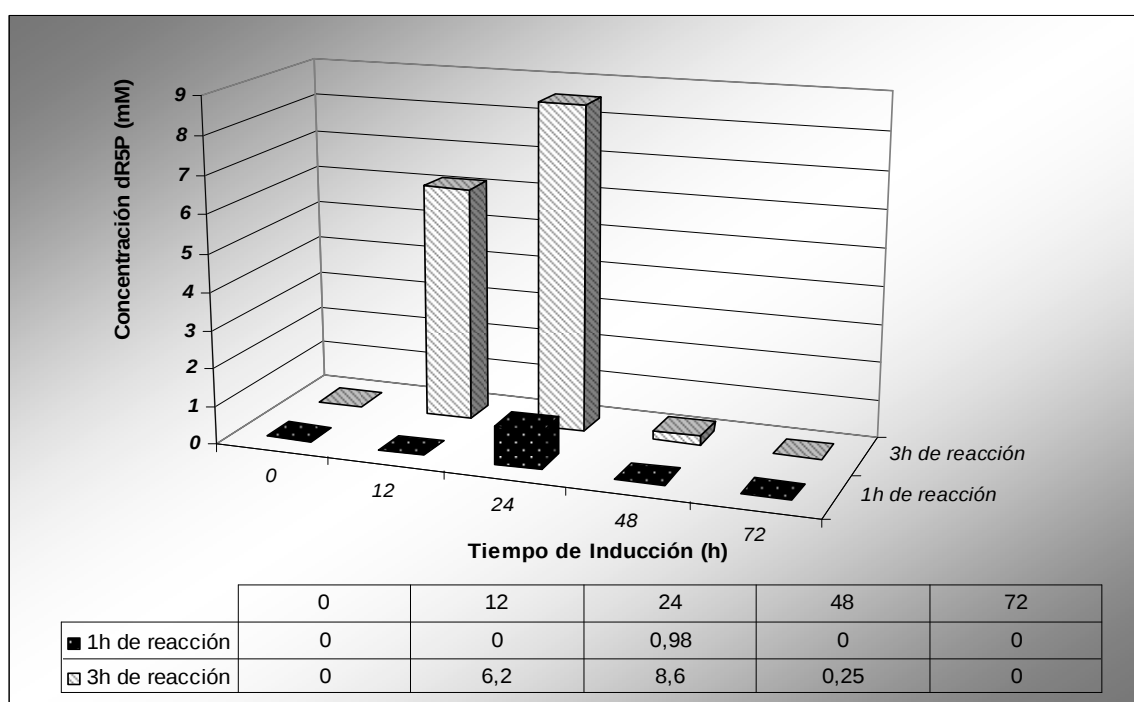


Figura 48: Incidencia del tiempo de inducción y reacción en la obtención de dR5P, utilizando *E. carotovora* ATCC 33260 en condiciones de MR2.

Se ha reportado el uso de condiciones de MR2 y MR3 utilizando células recombinantes de *E. coli* 10B5, fosfatasa-negativa, que expresan DERA de *Klebsiella pneumoniae* [37]. Utilizando dicho biocatalizador obtuvieron 6.3 mM de dR5P a partir de MR2, valor menor al obtenido en este trabajo utilizando microorganismos salvajes.

7.3.7. Biotransformaciones con detergentes

Con el objetivo de incrementar los rendimientos obtenidos, se evaluó la incidencia del uso de otros agentes porantes de modo de favorecer el ingreso de ATP a las células y poder alcanzar dicho objetivo.

La desorganización de membranas biológicas mediante el uso de surfactantes ha sido ampliamente estudiada en procesos biotecnológicos con células enteras de microorganismos con el objetivo de facilitar tanto la incorporación de los sustratos a la célula como la salida de los productos de interés [36]. En el caso de las bacterias gram negativas, estos compuestos son empleados para liberar proteínas del espacio periplásmico o bien para incrementar la permeabilidad de la membrana citoplasmática. Particularmente, para este último fin suelen utilizarse detergentes no iónicos, dado que su acción es menos agresiva respecto de los surfactantes iónicos.

Como se mencionó anteriormente, MR2 fue considerado como el medio modelo para la biotransformación de interés. En éste, la presencia de ATP es necesaria para promover la oxidación de la glucosa por la vía glicolítica. Por ello, el agregado de xileno permite no sólo que dicho compuesto pueda ingresar a las células, sino también que dR5P pueda liberarse al medio de reacción. En consecuencia, con el objetivo de maximizar la incorporación de ATP a las células, se procedió a estudiar el efecto del agregado de detergentes no iónicos a MR2. Para tal fin, *Horinouchi et al.* [37] reportaron el uso de polioxietilenlaurilamina, surfactante empleado en la industria textil oriental, en biotransformaciones con microorganismos recombinantes. Dado que la accesibilidad de dicho compuesto es limitada, se optó por utilizar como alternativa otros detergentes no iónicos del tipo de los polioxietilenos, entre los cuales se encuentran Tween-20, Tritón X-100 y Nonidet P-40. El análisis cualitativo permitió determinar que *Erwinia carotovora* ATCC 33260 fue capaz de producir dR5P en presencia de cada uno de los detergentes ensayados. El análisis cuantitativo posterior mostró que Tween-20 y Nonidet P-4 fueron capaces de incrementar la permeabilidad de ATP alcanzando rendimientos mayores respecto al control sin detergentes (Tabla 35).

Detergente	dR5P (mM)
Ninguno	8.6
Tween-20	14.1
Tritón X-100	6.5
Nonident P-40	10.6

Tabla 35: Resultados obtenidos con *E. carotovora* ATCC 33260 en condiciones de MR2 mediante el agregado de diferentes detergentes.

7.3.7.1. Análisis de la incorporación de ATP a las células por HPLC

Se estudió la incorporación de ATP a las células mediante la cuantificación por HPLC de dicho compuesto y de sus productos de desfosforilación, ADP y AMP, en el medio de reacción.

En todas las biotransformaciones evaluadas se detectó además ADP, AMP, adenosina y adenina, tanto en presencia como en ausencia de detergente (Figuras 49, 50 y 51).

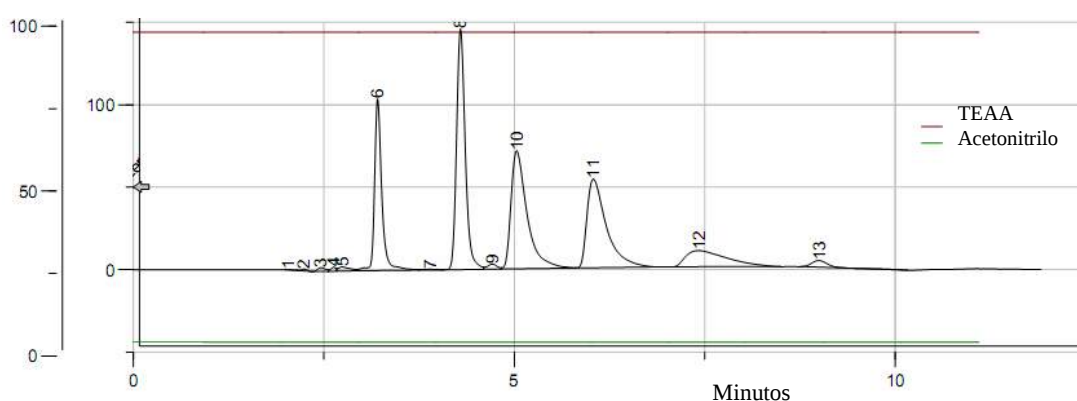


Figura 49: Análisis de la biotransformación estándar (sin detergentes) con *Erwinia carotovora* ATCC 33260 en MR2. Asignación de picos: 6, adenina; 8, adenosina; 10, AMP; 11, ADP; 12, ATP.

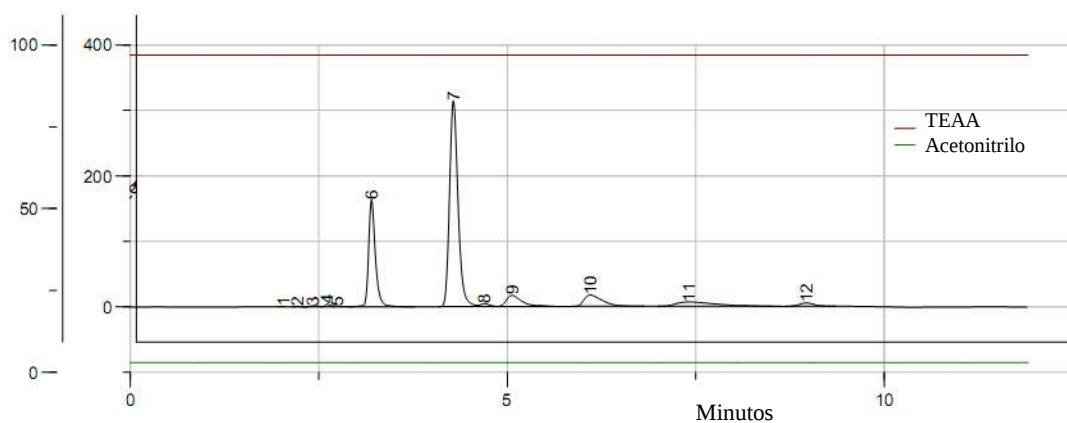


Figura 50: Análisis de la biotransformación con *Erwinia carotovora* ATCC 33260 en MR2 con Nonidet P-40. Asignación de picos: 6, adenina; 7, adenosina; 9, AMP; 10, ADP; 11, ATP.

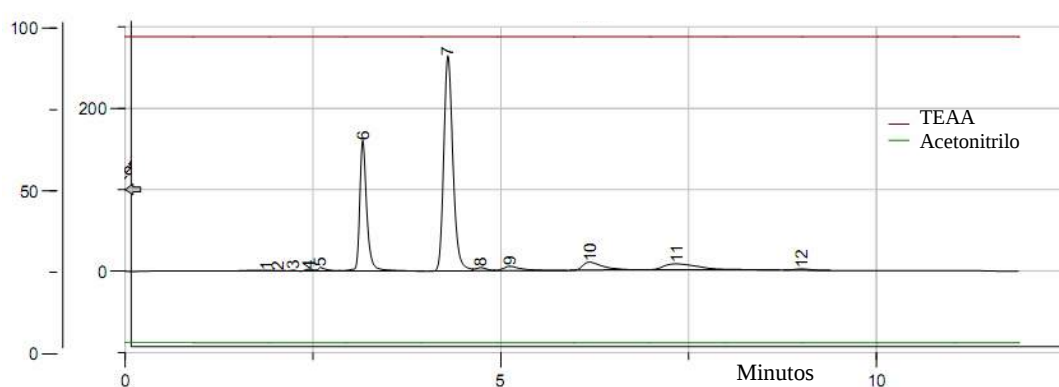


Figura 51: Análisis de la biotransformación con *Erwinia carotovora* ATCC 33260 en MR2 con Nonidet P-40. Asignación de picos: 6, adenina; 7, adenosina; 9, AMP; 10, ADP; 11, ATP.

En las Tablas 36, 37 y 38 se muestran las áreas relativas de ATP en las biotransformaciones ensayadas.

Compuesto	Tr (min)	Área
adenina	3.21	1162756
adenosina	4.29	1932138
AMP	5.03	1759317
ADP	6.04	1609450
ATP	7.42	626181

Tabla 36: Análisis de la biotransformación estándar mediante HPLC.

Compuesto	Tr (min)	Área	Área relativa (%) [#]
adenina	3.20	1.721.437	148
adenosina	4.28	4.127.781	214
AMP	5.06	456.336	26
ADP	6.10	513.633	32
ATP	7.41	444.133	71

Tabla 37: Análisis de la biotransformación con Tween-20 mediante HPLC. [#] Se tomó como 100% el área de cada compuesto calculada en la biotransformación estándar.

Compuesto	Tr (min)	Área	Área relativa (%) [#]
adenina	3.16	1.787.256	154
adenosina	4.30	3.761.584	195
AMP	5.12	169.246	10
ADP	6.18	313.290	19
ATP	7.33	412.946	66

Tabla 38: Análisis de la biotransformación con Nonidet P-40 mediante HPLC. [#] Se tomó como 100% el área de cada compuesto calculada en la biotransformación estándar.

El análisis de las áreas relativas permitió determinar que el área de ATP en todas las biotransformaciones evaluadas fue menor respecto a la condición estándar. Este hecho concuerda con la acción porante de los detergentes permitiendo un mayor ingreso de ATP a las células, recuperando en el sobrenadante una concentración menor respecto a las condiciones sin detergentes. Además, se estableció que las áreas correspondientes a adenosina y adenina fueron mayores en las biotransformaciones en las que se empleó surfactantes. El incremento en el área de estos dos compuestos pudo deberse a la acción de dos tipos de enzimas, en primer lugar las fosfatasa, que por desfosforilación generan ADP,

AMP y finalmente adenosina, y en segundo lugar, las nucleósido fosforilasas que generan adenina como producto. Estas observaciones permitieron evidenciar que el agregado de surfactantes al medio de reacción estándar efectivamente incrementó la entrada de ATP a las células.

Cabe mencionar que la mezcla de reacción de la biotransformación con Tritón X-100 no fue analizada debido a que se observó turbia y no se logró obtener una solución adecuada para analizar mediante HPLC. Este hecho y el bajo rendimiento de dR5P obtenido sugieren que las células no sólo sufrieron el efecto porante sino que hubo pérdida de viabilidad celular y consecuentemente una pérdida de la actividad enzimática.

Debido a los resultados satisfactorios obtenidos con *Erwinia carotovora* ATCC 33260 en la producción de DR5P, se evaluó utilizar la mezcla que contiene dicho producto en condiciones de MR2-T (MR2 con el agregado de Tween-20), en una próxima etapa de síntesis de desoxinucleósidos (dNs).

7.3.8. Síntesis de desoxinucleósidos a partir de bases pirimidínicas y 2-desoxirribosa 5-fosfato

La síntesis de timidina fue reportada previamente por nuestro grupo de investigación [19] utilizando como sustrato dR5P sintetizada quimioenzimáticamente, y como biocatalizadores, PPM de *E. coli* sobreexpresada y aislada y timidín fosforilasa (TP) comercial. En esta parte del trabajo se utilizó, como estrategia alternativa de obtención dNs, la mezcla de reacción obtenida en la primera parte de este Capítulo a partir de células enteras con actividad DERA conteniendo dR5P, acoplando las enzimas PPM y TP.

En el primer intento de llevarlo a cabo, se utilizó dR5P obtenida a partir de glucosa en condiciones de MR2-T. En este primer ensayo los resultados fueron negativos. Los factores que podrían haber determinado estos resultados serían: la cantidad de fosfato proveniente del *buffer* de la mezcla de reacción que contiene dR5P, que inhibiría la actividad enzimática

de PPM; o el acetaldehído remanente en dicha mezcla que podría causar la inhibición de las enzimas del proceso.

En base a estas observaciones y para confirmar el posible efecto inhibitorio del fosfato inorgánico presente en la mezcla utilizada sobre PPM, se procedió a ensayar las reacciones utilizando una mezcla similar a la obtenida mediante la biotransformación con sustratos comerciales (sin acetaldehído). Para ello se disolvió dR5P comercial 14.1 mM en *buffer* fosfato 100 mM pH 7.5. Se realizó una dilución de modo de obtener una concentración de Pi de 25 mM, aproximadamente, lo que generó en la mezcla una concentración final de dR5P de 3.5 mM. Cabe destacar que la mezcla también presentó adenina, adenosina, AMP, ADP y ATP en las cantidades correspondientes al análisis realizado previamente. Luego se adicionó timina y las enzimas PPM y TP en *buffer* Tris-HCl 80 mM pH 8.0. El análisis cualitativo determinó la presencia de timidina con un máximo de rendimiento, 2.97 mM, a las 2h de reacción. De esta manera se determinó que la concentración de Pi proveniente de la mezcla de dR5P sintetizada biocatalíticamente y diluida, no estaría causando efectos negativos sobre la reacción de obtención de timidina.

Por otro lado, para confirmar el efecto inhibitorio del acetaldehído sobre las enzimas involucradas en el camino de síntesis propuesto, se utilizó dR5P obtenida con *Erwinia carotovora* ATCC 33260 en condiciones de MR1 el cual contenía gliceraldehído 3-fosfato como material de partida, acetaldehído y *buffer* Tris-HCl. Luego de 4h de reacción, no se observó presencia de timidina. En función de esto se propuso que las enzimas, PPM y TP estaban siendo inactivadas por el acetaldehído remanente. Para comprobarlo, se evaporó el acetaldehído al vacío utilizando un equipo *Speedback*. Se ensayó nuevamente la síntesis de timidina y se obtuvieron resultados positivos, observándose la presencia de producto a partir de los 20 minutos y un máximo a las 2h de reacción. Estos resultados confirmaron que el acetaldehído actuó como inhibidor de las enzimas del proceso.

De esta manera se procedió a ensayar la síntesis de timidina con la mezcla proveniente de la reacción en condiciones de MR2-T, previa liofilización. El sólido resultante se resuspendió en *buffer* Tris- HCl 80 mM pH 8.0 y se adicionó a la solución

conteniendo timina y las enzimas PPM y TP. Luego del análisis cualitativo se observó la presencia de timidina y posteriormente, el análisis cuantitativo determinó la obtención de 0.85 mM de timidina (85% de rendimiento respecto a dR5P). *Horinouchi et al.* [55] reportaron la síntesis de desoxiinosina a partir de adenina y una mezcla similar a MR3, utilizando células recombinantes de *E. coli* 10B5, fosfatasa-negativa, que expresan DERA de *Klebsiella pneumoniae*, PPM y PNP, logrando 9.9 mM de desoxiinosina (80.2% de rendimiento respecto a dR5P).

Debido a los resultados satisfactorios obtenidos con timina, se evaluó la síntesis de 5-desoxiuridina y 5-bromodesoxiuridina (Figura 52) a partir de las correspondientes bases pirimidínicas, PPM y TP como biocatalizadores y la mezcla previamente sintetizada conteniendo dR5P a partir de MR2-T. Los tiempos de reacción que arrojaron los mejores resultados fueron 2.25h y 0.75h, respectivamente.

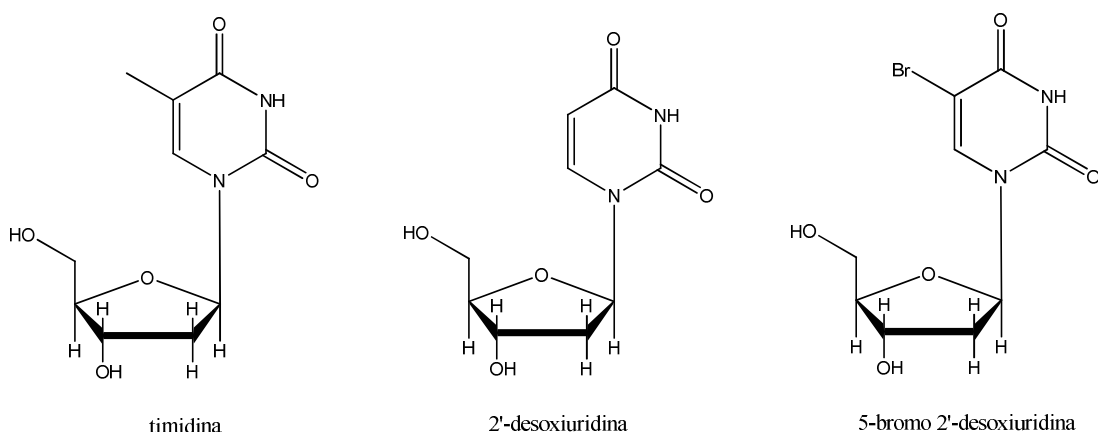


Figura 52: Desoxinucleósidos preparados mediante el uso combinado de PPM y TP.

Los resultados obtenidos con timina (2h de reacción), uracilo y 5-bromouracilo se muestran en la Figura 53, a diferentes temperaturas y utilizando también un control con dR5P comercial. *Taverna-Porro et al.* [19] mostraron que PPM presenta actividad óptima a 45°C, sin embargo la diferencia en los rendimientos obtenidos en estas biotransformaciones

a distintas temperaturas es mínima. Se puede observar además que para las reacciones llevadas a cabo a 45°C con dR5P sintetizada, las conversiones se asemejan a la que utilizan dR5P comercial, indicando que la mezcla sintetizada puede ser empleada en esta biotransformación sin inconvenientes. Los resultados obtenidos indican que la TP es más específica de pirimidinas 5-sustituidas como lo demostraron anteriormente *Rogert et. al.* [56] utilizando células enteras que contienen NPs.

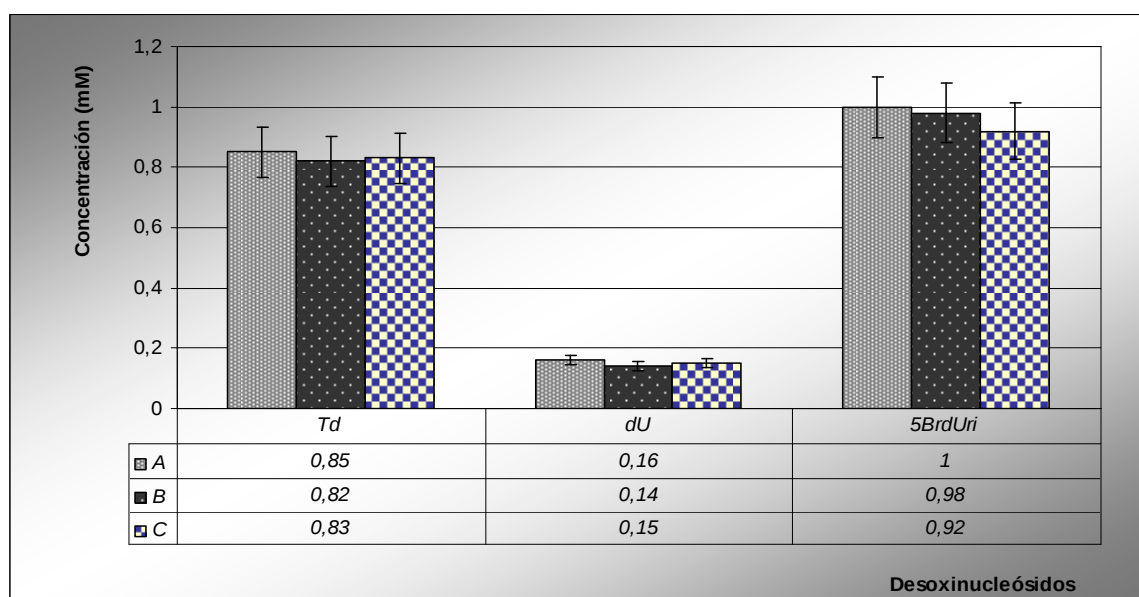


Figura 53: Rendimientos de desoxinucleósidos obtenidos mediante el uso de dR5P sintetizada con *Erwinia carotovora* ATCC 33260, PPM y TP comercial. **A:** reacción llevada a cabo a 45°C y dR5P sintetizada; **B:** reacción a 37°C y dR5P sintetizada; **C:** reacción a 45°C y dR5P comercial (control). **Td:** Timidina; **dU:** 2'-desoxiuridina; **5BrdUri:** 5-bromo-2'-desoxiuridina.

Error +/-5%.

7.4. Conclusiones

En esta parte del trabajo se logró identificar, a través de dos *screenings* consecutivos realizados sobre la colección de bacterias del laboratorio, ocho microorganismos con potencial actividad DERA capaces de producir dR5P, pertenecientes a los géneros *Streptomyces*, *Erwinia*, *Bacillus* y *Lactobacillus*.

Los microorganismos hallados se utilizaron como biocatalizadores para llevar a cabo biotransformaciones que permitieran preparar dR5P a partir del sustrato natural de DERA, G3P, y de otros materiales más económicos que generen dicho compuesto *in situ*. Como era de esperarse, las biotransformaciones realizadas a partir de G3P (MR1) y de DHAP (MR4) permitieron obtener los mejores rendimientos. De todas formas, el costo elevado de ambos compuestos y la baja estabilidad de los últimos, hace que su uso en biotransformaciones preparativas carezca de practicidad. En los casos en que se empleó FDP (MR3) se logró producir buenas cantidades de dR5P. Si bien se debió realizar una etapa preliminar de obtención de FDP a partir de glucosa, en ésta se logró reciclar ATP en forma económica y eficiente. Por esta razón, los resultados obtenidos en las biotransformaciones a partir de FDP resultaron económicamente satisfactorios. Por último, se verificó que el uso de glucosa como material de partida (MR2) y de *Erwinia carotovora* ATCC 33260 como biocatalizador permitió obtener dR5P con una concentración similar a las biotransformaciones realizadas con FDP.

El agregado de los detergentes Tween-20 y Nonidet P-40 a la biotransformación con glucosa y con *Erwinia carotovora* ATCC 33260 dio lugar a una mayor producción de dR5P. Dado que en la etapa de síntesis del dN no se requiere dR5P pura, esta alternativa de producción es compatible con el objetivo final de las biotransformaciones desarrolladas.

Finalmente, debido a que *Erwinia carotovora* ATCC 33260 fue el único biocatalizador que logró sintetizar exclusivamente dR5P a partir de todos los materiales ensayados, se lo consideró el mejor biocatalizador para la obtención del producto de interés. Además, cabe destacar que la actividad DERA de *Erwinia carotovora* ATCC

33260 así como de *Streptomyces griseus*, *Streptomyces baldacii*, *Streptomyces cattleya* y *Erwinia carotovora* ATCC 15713 no habían sido reportadas hasta el momento.

En un paso posterior, se utilizó la mezcla de reacción proveniente de la biotransformación con *Erwinia carotovora* ATCC 33260 en MR2-T para sintetizar desoxinucleósidos. Luego de optimizar las condiciones de reacción, se logró obtener 0.85 mM de timidina utilizando timina como sustrato y como biocatalizadores PPM y TP, correspondiente al 85% de rendimiento respecto a dR5P. Esta biotransformación se extendió a la síntesis de 2-desoxinucleósidos de uracilo y 5-bromouracilo, obteniéndose resultados positivos.

En conclusión, en esta parte del trabajo se obtuvieron resultados satisfactorios debido a que se logró producir DR5P en forma exitosa, utilizando células enteras de microorganismos novedosos como biocatalizadores y materiales de partida económicos. Las mezclas de reacción obtenidas pueden utilizarse para la producción final de dNs sin la necesidad de complejos pasos de purificación a excepción de la evaporación del acetaldehído remanente.

Bibliografía

- [1] Pugmire, M. J.; Ealick, S. E. (2002). Structural analyses reveal two distinct families of nucleoside phosphorylases. *Biochem. J.*, **361**, 1-25.
- [2] Levene, P. A. and Medigreceanu, F. (1911). On nucleases. *J. Biol. Chem.*, **9**, 65–83.
- [3] Kalckar, H. M. (1945). Enzymatic synthesis of a nucleoside. *J. Biol. Chem.*, **158**, 723–724.
- [4] Bzowska, A.; Kulikowska, E.; Sughar, D. (2000). Purine nucleoside phosphorylases: properties, functions, and clinical aspects. *Pharmacol. Ther.*, **28**, 349-425.
- [5] Andricopulo, A. D.; Yunes, R. A. (2001). Structure-activity relationships for a collection of structurally diverse inhibitors of purine nucleoside phosphorylase. *Chem. Pharm. Bull.*, **49**, 10-17.
- [6] Trelles, J. A.; Valino, A. L.; Runza, V.; Lewkowicz, E. S.; Iribarren, A. M. (2005). Screening of catalytically active microorganisms for the synthesis of 6-modified purine nucleosides. *Biotechnol. Lett.*, **27**, 759-763.
- [7] Lewkowicz, E.; Martínez, N.; Rogert, M. C.; Porro, S.; Iribarren, A. M. (2002). An improved microbial synthesis of purine nucleosides. *Biotechnol. Lett.*, **22**, 1277-1280.
- [8] Bentancor, L.; Trelles, J. A.; Nobile, M.; Lewkowicz, E. S.; Iribarren, A. M. (2004). Benzimidazole as deazapurine analogue for microbial transglycosylation. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **29**, 3-7.
- [9] Medici, R.; Lewkowicz, E.; Iribarren, A. M. (2006). Microbial synthesis of 2,6 diaminopurine nucleosides. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **39**, 40-44.
- [10] Lewkowicz, E. S.; Iribarren, A. M. (2006). Nucleoside phosphorylases. *Curr. Org. Chem.*, **10**, 1197-1215.
- [11] Short, S. A., Armstrong, S. R., Ealick, S. E. and Porter, D. J. (1996). Active site amino acids that participate in the catalytic mechanism of nucleoside 2'-deoxyribosyltransferase. *J. Biol. Chem.* **271**, 4978–4987.
- [12] Komatsu, H.; Araki, T. (2003). Chemo-enzymatic synthesis of 2',3'-dideoxy-3'-fluoro- β -D-guanosine via 2,3-dideoxy-3-fluoro- α -D-ribose 1-phosphate. *Tetrahedron Lett.*, **44**, 2899–2901.
- [13] (a) MacDonald, D. L.; Fletcher, H. G. Jr. (1962). 2-Deoxy-D-ribose. VIII. Synthesis of the anomeric 2-Deoxy-D-ribofuranose 1-Phosphates. *J. Am. Chem. Soc.*, **84**, 1262-1265; (b) Friedkin, M.; Kalckar, H. M. (1950). Desoxyribose-1-phosphate: I. The phosphorolysis and resynthesis of purine desoxyribose nucleoside. *J. Biol. Chem.*, **184**, 437–448.

- [14] Bonney, R. J.; Weinfeld, H. (1970). Regulation of thymidine metabolism in *Escherichia coli* K-12: optimal conditions for the assay of 1,5-phosphodeoxyribomutase in ultrasonic extracts. *J. Bacteriol.*, **103**, 650–655.
- [15] Galperin, M. Y.; Bairoch, A.; Koonin, E. V. (1998). A superfamily of metalloenzymes unifies phosphopentomutase and cofactor-independent phosphoglycerate mutase with alkaline phosphatases and sulfatases. *Prot. Sci.*, **7**, 1829–1835.
- [16] Valentin-Hansen, P.; Hammer, K.; Love Larsen, J. E.; Svendsen, I. (1984). The internal regulated promoter of the deo operon of *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res.*, **12**, 5211–5224.
- [17] Barbas, C. F., III; Wong, C.-H. (1991). Overexpression and substrate specificity studies of phosphodeoxyribomutase and thymidine phosphorylase. *Bioorg. Chem.*, **19**, 261–269.
- [18] Ouwerkerk, N.; Steenweg, M.; de Ruijter, M.; Brouwer, J.; van Boom, J. H.; Lugtenburg, J. and Raap, J. (2002). One-pot two-step enzymatic coupling of pyrimidine bases to 2-deoxy-*D*-ribose-5-phosphate. A new strategy in the synthesis of stable isotope labeled deoxynucleosides. *J. Org. Chem.*, **67**, 1480–1489.
- [19] Taverna-Porro, M.; Bouvier, L. A.; Pereira, C. A.; Montserrat, J. M.; Iribarren, A. M. (2008). Chemoenzymatic preparation of nucleosides from furanoses. *Tetrahedron Lett.*, **49**, 2642–2645.
- [20] Faber, K. (1997) *Biotransformations in Organic Chemistry*, Springer.
- [21] Wong, C. H.; Whitesides, G. M. (1994). *Enzymes in Synthethic Organic Chemistry*, Tetrahedron Organic Chemistry Series, Vol 12. Baldwin, J. E.; Manus, P. D. (Eds.). Pergamon, UK.
- [22] Fessner, W. D.; Helaine, V. (2001). Biocatalytic synthesis of hydroxylated natural products using aldolases and related enzymes. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **12**, 574–586.
- [23] Townsend, L. B. & Tipson, R. S. (1986). *Nucleic acid chemistry*. Townsend, L. B. & Tipson, R. S. (Eds.). Wiley, New York.
- [24] Liu, K. K. C.; Kajimoto, T.; Chen, L.; Zhong, Z.; Ichikawa, Y.; Wong, C. H. (1991). Use of dihydroxyacetone phosphate dependent aldolases in the synthesis of deoxyazasugars. *J. Org. Chem.*, **56**, 6280–6289.
- [25] Ziegler, T.; Straub, A.; Effenberger, F. (1988). Enzym-katalysierte synthese von 1-desoxymannojirimycin, 1-desoxynojirimycin und 1,4-didesoxy-1,4-imino-*D*-arabinitol. *Angew. Chem.*, Int. Ed. Engl., **27**, 716–717.
- [26] Schultz, M.; Waldmann, H.; Kunz, H.; Vogt, W. (1990). *Liebigs. Ann. Chem.*, **1990**, 1019–1024.

- [27] Schümperli, M.; Pellaux, R.; Panke, S. (2007). Chemical and enzymatic routes to dihydroxyacetone phosphate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **75**, 33-45.
- [28] Durrwachter, J. R.; Wong, C. H.. (1988). Fructose 1,6-diphosphate aldolase-catalyzed stereoselective synthesis of C-alkyl and N-containing sugars: thermodynamically controlled C-C bond formations. *J. Org. Chem.*, **53**, 4175-4181.
- [29] Spalstein, M.; Whitesides, G. M. (1991). Polyacrylamides bearing pendant .alpha.-sialoside groups strongly inhibit agglutination of erythrocytes by influenza virus. *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 686-687.
- [30] Nagy, J.; Bednarski, M. (1991). *Tetrahedron Lett.*, **32**, 3953-3956.
- [31] Seoane, G. (2000). Enzymatic C-C bond-forming reactions in organic synthesis. *Curr. Org. Chem.*, **4**, 283-304.
- [32] Herbert, R. B.; Wilkinson, B.; Ellames, G. J.; Kunec, E. K. (1993). Stereospecific lysis of a range of β -hydroxy- α -amino acids catalysed by a novel aldolase from *Streptomyces amakusaensis*. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 205-206.
- [33] Shibata, K.; Shingu, K.; Vassilev, V.; Nishide, K.; Fujita, T.; Node, M.; Kajimoto, T.; Wong, C. H. (1996). Kinetic and thermodynamic control of L-threonine aldolase catalyzed reaction and its application to the synthesis of mycetericin D. *Tetrahedron Lett.*, **37**, 2791-2794.
- [34] Miura, T.; Fuji, M.; Shingu, K.; Koshimizu, I.; Naganoma, J.; Kajimoto, T.; Ida, Y. (1998) Application of L-threonine aldolase catalyzed reaction for the preparation of a peptidic mimetic of RNA: A leading compound of Vero-toxin inhibitor. *Tetrahedron Lett.*, **39**, 7313-7316.
- [35] Barbas, C. F., III; Wang, Y.-F.; Wong, C.-H. (1990). Deoxyribose-5-phosphate aldolase as a synthetic catalyst. *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 2013-2014.
- [36] Ogawa, J.; Saito, K.; Sakai, T.; Horinouchi, N.; Kawano, T.; Matsumoto, S.; Sasaki, M.; Mikami, Y.; Shimizu, S. (2003). Microbial production of 2-deoxyribose 5-phosphate from acetaldehyde and triosephosphate for the synthesis of 2'-deoxyribonucleosides. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **67**, 933-936.
- [37] Horinouchi, N.; Ogawa, J.; Sakai, T.; Kawano, T.; Matsumoto, S.; Sasaki, M.; Mikami, Y.; Shimizu, S. (2003). Construction of deoxyriboaldolase-expressing *Escherichia coli* and its application to 2-deoxyribose 5-phosphate synthesis from glucose and acetaldehyde for 2'-deoxyribonucleoside production. *Appl Environ Microbiol.*, **69**, 3791-3797.
- [38] Horinouchi, N.; Ogawa, J.; Saito, K.; Sakai, T.; Kawano, T.; Matsumoto, S.; Sasaki, M.; Mikami, Y.; Shimizu, S. (2006). Efficient production of 2-deoxyribose 5-phosphate from glucose

and acetaldehyde by coupling reaction of the alcoholic fermentation system of baker's yeast and deoxyriboaldolase-expressing *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 1371-1378.

[39] Gijzen, H. J. M.; Wong, C. H. (1994). Unprecedented asymmetric aldol reactions with three aldehyde substrates catalyzed by 2-deoxyribose-5-phosphate aldolase. *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 8422-8423.

[40] Wong, C-H.; Garcia-Junceda, E.; Chen, L.; Blanco, O.; Gijzen, H. J. M.; Steensma, D. H. (1995). Recombinant 2-deoxyribose-5-phosphate aldolase in organic synthesis: use of sequential two-substrate and three-substrate aldol reactions. *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 3333-3339.

[41] Greenberg, W. A.; Varvak, A.; Hanson, S. R.; Wong, K.; Huang, H.; Chen, P.; Burk, M. J. (2004). Development of an efficient, scalable, aldolase-catalyzed process for enantioselective synthesis of statin intermediates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 5788-5793.

[42] Valentin-Hansen, P.; Boëtius, F.; Hammer-Jespersen, K.; Svendsen, I. (1982). The primary structure of *Escherichia coli* K12 2-deoxyribose 5-phosphate aldolase. Nucleotide sequence of the deoC gene and the amino acid sequence of the enzyme. *Eur J Biochem.*, **125**, 561-566.

[43] Littlechild, J. A. & Watson, H. C. (1993). A data-based reaction mechanism for type I fructose bisphosphate aldolase. *Trends Biochem. Sci.*, **18**, 36-39.

[44] Blom, N. & Sygusch, J. (1997). Product binding and role of the C-terminal region in class I D-fructose 1,6-bisphosphate aldolase. *Nat. Struct. Biol.*, **4**, 36-39.

[45] Stura, E. A.; Ghosh, S.; Garcia-Junceda, E.; Chen, L.; Wong, C. H.; Wilson, I. A. (1995). Crystallization and preliminary crystallographic data for class I deoxyribose-5-phosphate aldolase from *Escherichia coli*: an application of reverse screening. *Proteins Struct. Funct. Genet.*, **22**, 67-72.

[46] Robertson, B. C.; Jargiello, P.; Blank, J.; Hoffee, P. A. (1970). Genetic regulation of ribonucleoside and deoxyribonucleoside catabolism in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.*, **102**, 628-635.

[47] Pricer, W. E.; Horecker, B. L. (1960). Deoxyribose aldolase from *Lactobacillus plantarum*. *J. Biol. Chem.*, **235**, 1292-1298.

[48] Mollgaard, H.; Neuhaard, J. (1983). Biosynthesis of deoxythymidine triphosphate. *Metabolism of nucleotides, nucleosides and nucleobases in microorganisms*, 149-201. In: Munch-Peterson, A. (Ed.). Academic Press, London.

- [49] Hoffee, P. A. (1974). 2-deoxyribose gene-enzyme complex in *Salmonella typhimurium*. I. Isolation and enzymatic characterization of 2-deoxyribose-negative mutants. *J. Bacteriol.*, **95**, 449-457.
- [50] Mura, U.; Sgarrella, F.; Ipata, P. L. (1978). Utilization of exogenous purine compounds in *Bacillus cereus*. Translocation of the ribose moiety of inosine. *J. Biol. Chem.*, **235**, 7905-7909.
- [51] Burton, K. (1956). A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem J.*, **62**, 315-323.
- [52] Sgarrella, F.; Poddie, F. P.; Meloni, M. A.; Sciola, L.; Pippia, P.; Tozzi, M. G. (1997). Channelling of deoxyribose moiety of exogenous DNA into carbohydrate metabolism: role of deoxyriboaldolase. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*, **117**, 253-257.
- [53] Folch-Mallol, J. L.; Garay-Arroyo, A.; Lledías, F.; Covarrubias Robles, A. A. (2004). La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Internacional de Microbiología*, **46**, 24-46.
- [54] Protease and Phosphatase Inhibitors: <http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=555B3262-5056-8A76-4EA5-57A875C0B771>
- [55] Horinouchi, N.; Ogawa, J.; Kawano, T.; Sakai, T.; Saito, K.; Sasaki, M., et al. (2006). Biochemical retrosynthesis of 2'-deoxyribonucleosides from glucose, acetaldehyde and a nucleobase. *Appl. Microbiol. and Biotechnol.*, **71**, 615-621.
- [56] Rogert, M. C.; Trelles, J.; Porro, S.; Lewkowicz, E.; Iribarren, A. M. (2002). Microbial Synthesis of Antiviral Nucleosides Using *Escherichia coli* BL21 as Biocatalyst. *Biocatal. Biotransform.*, **20**, 347-351.

Conclusiones finales

En este trabajo de Tesis Doctoral se lograron desarrollar metodologías que involucran el uso de células enteras de microorganismos como biocatalizadores, aplicadas a la obtención de desoxirribonucleósidos y desoxirribonucleótidos.

En primer lugar, se utilizaron células de *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC 19350, una cepa mutante derivada de ATCC 6872, para la obtención de UMP a partir de dos sustratos económicos, ácido orótico y uracilo. Ensayando diferentes biotransformaciones se obtuvo, a partir de ácido orótico, una conversión máxima de UMP de 23% a las 2h de reacción y 50% a partir de uracilo a las 24h. Si bien las conversiones de UMP obtenidas en esta Tesis no superan resultados anteriores, el uso de *C. ammoniagenes* ATCC 19350 como biocatalizador para su síntesis no había sido previamente reportado así como tampoco el uso de uracilo como sustrato en un sistema biocatalizado por cepas de ese género.

En segundo lugar, se estudió el uso de células enteras de bacterias del género *Enterobacteria* con actividad NSAP. Se seleccionaron dos microorganismos, *Raoultella planticola* ATCC 33531 y *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, con los cuales se lograron obtener dUMP, TMP y AraAMP así como diversos azúcares fosfato (dR5P, Rib5P, Glc6P, Glad3P y DHAP). Además se ensayaron dos microorganismos recombinantes, los cuales contenían las NSAPs de cada una de las bacterias mencionadas anteriormente, logrando reducir notablemente los tiempos de reacción para todos los compuestos evaluados. La síntesis de estos compuestos, utilizando células enteras de los microorganismos seleccionados, no había sido reportada previamente originando una publicación científica.

En tercer lugar se logró obtener UDP utilizando una metodología sencilla que implica el uso de extracto de levadura comercial y UMP como sustrato, logrando 52% de conversión a los 90 minutos de reacción. Este sistema se aplicó además a la síntesis de otros nucleósidos difosfato como TDP, CDP, IDP, GDP, FAraADP y AraADP. Además, en esta parte del trabajo se utilizaron las mezclas obtenidas en los Capítulos 3 y 4, conteniendo

UMP, en reacciones consecutivas *one pot* sin necesidad de purificar dicho compuesto. Estas metodologías no han sido reportadas anteriormente con lo cual se ha comenzado con la preparación de una publicación.

Por otra parte, se intentó sintetizar dUDP utilizando células enteras poradas de *E. coli* salvajes a partir de UDP. En nuestro caso, se tuvieron indicios de la presencia de dU, probablemente proveniente de la desfosforilación total de dUDP, por lo cual, y fuera del alcance de esta Tesis, se continuará con el estudio de esta reacción.

Finalmente, como estrategia alternativa para la obtención de desoxinucleósidos, se seleccionaron microorganismos salvajes conteniendo DERA, capaces de producir dR5P, a partir de sustratos económicos. En particular se encontró que las cepas *Erwinia carotovora* ATCC 33260, *Erwinia carotovora* ATCC 15713, *Streptomyces griseus* ATCC 23921, *Streptomyces baldacii* ATCC 27429 y *Streptomyces cattleya* ATCC 35852, generaron dR5P satisfactoriamente, siendo su actividad DERA no reportada hasta el momento. Además *Erwinia carotovora* ATCC 33260 fue el único biocatalizador que logró sintetizar exclusivamente DR5P a partir de todos los sustratos ensayados con lo cual se lo consideró el mejor biocatalizador para la obtención de dicho producto. Con este microorganismo salvaje se obtuvo 14.1 mM de dR5P utilizando Tween-20 como agente porante y glucosa (500 mM) como precursor de G3P, resultados que dieron origen a una publicación científica.

Finalmente, se empleó la mezcla conteniendo dR5P, obtenida con *Erwinia carotovora* ATCC 33260 como biocatalizador, previa evaporación del acetaldehído remanente, para la síntesis de Td, dU y 5BrdUri. Para ello se utilizaron las enzimas PPM y TP obteniéndose 0.85 mM de Td, 0.16 mM de dU y 1 mM de 5BrdUri (85%, 16% y 100% de rendimiento en relación a dR5P, respectivamente). Hasta donde conocemos, no existen en bibliografía informes sobre el uso de cepas salvajes para la obtención de los desoxirribonucleósidos mencionados.

En este trabajo de Tesis Doctoral he logrado cumplir con los objetivos planteados siendo mi intención que estos resultados constituyan un aporte al área de la Biocatálisis y

que sienten bases para investigaciones futuras. Asimismo, la labor realizada me ha permitido consolidar mi formación profesional y académica, aplicando además parte de los conocimientos adquiridos desenvolviéndome como docente dentro del Área Química.

Parte de los resultados obtenidos en esta Tesis dieron origen a las siguientes publicaciones:

“Selection of a New Whole Cell Biocatalyst for the Synthesis of 2-Deoxyribose 5-Phosphate”

Ana L. Valino, Martín A. Palazzolo, Adolfo M. Iribarren & Elizabeth Lewkowicz.

Appl. Biochem. Biotechnol., 2012. **166**, 300–308. DOI 10.1007/s12010-011-9425-6

“Comparative study on phosphotransferase activity of acid phosphatases from *Raoultella planticola* and *Enterobacter aerogenes* on nucleosides, sugars and related compounds”

Rosario Médici, Juan I. Garaycochea, Ana L. Valino, Claudio A. Pereira, Elizabeth S. Lewkowicz and Adolfo M. Iribarren. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, aceptado para su publicación en agosto de 2013. DOI 10.1007/s00253-013-5194-1

“One pot multienzyme synthesis of pyrimidin deoxynucleosides from cheap natural starting materials”

Ana L. Valino, Adolfo M. Iribarren and Elizabeth S. Lewkowicz. *En preparación*.

Perspectivas

En base a los resultados obtenidos se plantean las siguientes actividades futuras:

- Continuar con el análisis de las mezclas de reacción para la síntesis de dUDP, en particular de la obtenida con *E. coli* ATCC 23513, para confirmar si hubo reacción de reducción debido a que se detectó la presencia de un producto que podría tratarse de desoxiuridina. En caso afirmativo se realizará una nueva puesta a punto de la biotransformación y se evaluará la reproducibilidad de los ensayos. Además, se plantea la posibilidad de aislar y purificar la enzima ribonucleótido reductasa de dicha bacteria debido a la complejidad que implica la preparación de las células para esta biotransformación.

- Clonar y expresar las enzimas DERA de las dos cepas de *Erwinia carotovora*, con las que se logró sintetizar dR5P, en un sistema adecuado y con actividad fosfatasa negativa, en particular de la cepa ATCC 15713 con la cual se obtuvo 17.4 mM de una mezcla de dR y dR5P.

- Utilizar la mezcla que contiene dR5P sintetizada en este trabajo para la obtención de otros desoxinucleósidos pirimidínicos de modo de obtener una variedad interesante de estos compuestos. Los mismos podrían utilizarse para la síntesis biocatalizada de los correspondientes desoxinucleósidos 5'-mono y difosfato mediante las metodologías planteadas en esta Tesis.

Abreviaturas

ACN	Acetonitrilo
Ade	Adenina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ado	Adenosina
ADP	Adenosina 5'-difosfato
AMP	Adenosina 5'-monofosfato
AraA	Adeninarabinósido
AraADP	Adeninarabinósido 5'-difosfato
AraAMP	Adeninarabinósido 5'-monofosfato
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
AZT	3'-azido-3'-desoxitimidina
5BrdU	5-bromo-2'-desoxiuridina
BufS	<i>Buffer</i> de agotamiento
CCD	Cromatografía en capa delgada
CDP	Citidina 5'-difosfato
CG	Cromatografía gaseosa
CLAP	Cromatografía líquida de alta performance
CMP	Citidina 5'-monofosfato
CMPK	Citidina 5'-monofosfato quinasa
DERA	2-desoxirribosa 5-fosfato aldolasa
dGTP	2'-desoxiguanosina 5'-trifosfato
DHA	Dihidroxiacetona
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
dNs	Desoxinucleósidos
dNTPs	Desoxinucleósidos 5'-trifosfato

dNXPs	Desoxinucleósidos 5'-(mono, di, tri)fosfato
dR	Desoxirribosa
dR1P	Desoxirribosa 1-fosfato
dR5P	Desoxirribosa 5-fosfato
dTTP	2'-desoxitimidina 5'-trifosfato
dU	2'-desoxiuridina
dUDP	2'-desoxiuridina 5'-difosfato
dUMP	2'-desoxiuridina 5'-monofosfato
dUTP	2'-desoxiuridina 5'-trifosfato
EDTA	(Ethylenediaminetetra-acetic acid) ácido etilendiamino tetra-acético
FADH	Flavín adenina dinucleótido (reducido)
FAraADP	Fludarabina 5'difosfato
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FDP	Fructosa 1,6-difosfato
Fuc1P	Fuculosa 1-fosfato
G3P	Gliceraldehído 3-fosfato
G6PDesh	Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa
GDP	Guanosina 5'-difosfato
Glad	Gliceraldehído
Glc	Glucosa
Glc6P	Glucosa 6-fosfato
GOD	Glucosa oxidasa
GRAS	<i>Generally recognized as safe</i>
GTP	Guanosina 5'-trifosfato
h	Horas
HFP	1,1,1,3,3,3-hexafluor-2-propanol
HFPTEA	1,1,1,3,3,3-hexafluor-2-propanol trietilamina
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A
HPLC	High permormance liquid chromatography

HPLC-MS	High performance liquid chromatography/Mass spectrometry
IDP	Inosina 5'-difosfato
IMP	Inosina 5'-monofosfato
Ino	Inosina
KDO	3-desoxi- <i>D</i> -mano-2-octulosonato
LPS	Lopopolisacáridos
ManNAc	<i>N</i> -acetilmanosamina
Min	Minutos
MFM	Metanofosfonato de metilo
MR	Medio de reacción
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido (reducido)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (reducido)
NDP	Nucleósidos 5'-difosfato
NeuAc	(<i>N</i> -acetylneuraminic acid) ácido <i>N</i> -acetilneuramínico
NMP	Nucleósidos 5'-monofosfato
NMPKs	Nucleósido 5' monofosfato quinasas
NP _s	Nucleósido fosforilasas
NSAP _s	(Non-specific acid phosphatases) Fosfatasas ácidas no específicas
ODCasa	Orotidina 5'-monofosfato descarboxilasa
OMP	Orotidina 5' monofosfato
OPRTasa	Orotato fosforribosiltransferasa
PCR	Polimerase Chain Reaction
Pi	Fosfato inorgánico
<i>p</i> NPP	(<i>p</i> -nitrophenylphosphate) <i>p</i> -nitrofenilfosfato
PNP _s	Purín nucleósido fosforilasas
POESA	Polioxietilen estearilamina
PPi	Pirofosfato

PPM	Fosfopentomutasa
PPRTasa	Pirimidín fosforribosiltransferasa
PRPP	5-fosforribosil-1-pirofosfato
Pu	Purina
Py	Pirimidina
PyNPs	Pirimidín nucleósido fosforilasas
RAMA	(rabbit muscle aldolase) aldolasa de músculo de conejo
Rib	Ribosa
Rib1P	Ribosa 1-fosfato
Rib5P	Ribosa 5-fosfato
Ribu5P	Ribulosa 5-fosfato
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RNR	Ribonucleótido reductasa
RTPR	Ribonulceótido trifosfato reductasa
SAM	S-adenosilmetionina
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia humana
Td	Timidina
TDP	Timidina 5'-difosfato
TEAA	Acetato de trietilamonio
TMP	Timidina 5' monofosfato
TMPK	Timidina 5' monofosfato quinasa
TP	Timidín fosforilasa
TPI	Triosa fosfato isomerasa
Tr	Tiempo de retención
UDP	Uridina 5'-difosfato
UMP	Uridina 5'-monofosfato
UMPK	Uridina 5'-monofosfato quinasa

Ura	Uracilo
Uri	Uridina
VHB	Virus de hepatitis B
VHC	Virus de hepatitis C
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana

Anexo I

Microorganismos utilizados y sus correspondientes medios de cultivo

Microorganismo	Código CECT	Código ATCC	Medio de crecimiento
<i>Acetobacter</i> sp.	944	-	44
<i>Aeromonas hydrophila</i>	839	7966	2
<i>Aeromonas hydrophila</i>	4221	15467	1
<i>Aeromonas hydrophila</i>	4225	13442	1
<i>Aeromonas hydrophila</i>	4226	13136	1
<i>Aeromonas punctata</i>	4223	14486	20
<i>Aeromonas salmonicida</i>	896	27013	1
<i>Aeromonas salmonicida</i>	4238	19261	1
<i>Aeromonas salmonicida</i>	894	33658	1
<i>Aeromonas salmonicida</i>	4235	14174	1
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	4067	-	2
<i>Arthrobacter oxydans</i>	386	14358	2
<i>Arthrobacter oxydans</i>	387	14359	2
<i>Bacillus cereus</i>	131	10876	1
<i>Bacillus cereus</i>	193	11778	1
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	49	12976	1
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	47	10149	1
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	43	12980	1
<i>Bacillus thermoglucosidasius</i>	4038	43742	96
<i>Brevibacterium helvolum</i>	73	19239	3
<i>Brevibacterium linens</i>	69	9172	3
<i>Brevibacterium linens</i>	76	9175	3
<i>Cellulomonas celulans</i>	3050	27402	LB
<i>Chromobacterium violaceum</i>	23421	-	LB
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	863	25405	1

<i>Citrobacter freundii</i>	401	8090	1
<i>Citrobacter koseri</i>	856	27156	1
<i>Corynebacterium ammoniagenes</i>	72	19350	3
<i>Enterobacter aerogenes</i>	684	13048	1
<i>Enterobacter cloacae</i>	4214	-	1
<i>Enterobacter cloacae</i>	960	-	1
<i>Enterobacter cloacae</i>	4502	-	1
<i>Enterobacter cloacae</i>	194	13047	1
<i>Enterobacter gergoviae</i>	857	33028	1
<i>Erwinia amylovora</i>	222	29850	2
<i>Erwinia carotovora</i>	314	33260	33
<i>Erwinia carotovora</i>	225	15713	33
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	509	-	33
<i>Escherichia coli</i>	877	13005	1
<i>Escherichia coli</i>	731	23513	1
<i>Escherichia coli</i>	105	23231	1
<i>Escherichia coli</i>	45	4157	1
<i>Escherichia coli</i>	433	-	1
<i>Escherichia coli</i>	100	12407	1
<i>Escherichia coli</i> BL 21	-	47092	LB
<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	5015	-	2
<i>Klebsiella</i> sp.	367	-	1
<i>Lactobacillus acetotolerans</i>	4019	43578	8
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	362	9224	8
<i>Lactobacillus alimentaris</i>	570	29643	8
<i>Lactobacillus animalis</i>	4060	35046	8
<i>Lactobacillus plantarum</i>	20174 [#]		8
<i>Micrococcus luteus</i>	241	9341	LB
<i>Micrococcus luteus</i>	4057	-	LB
<i>Norcardia corynebacterioides</i>	420	14898	1
<i>Norcardia asteroides</i>	3051	19247	56
<i>Proteus mirabilis</i>	4101	14153	1
<i>Proteus rettgeri</i>	171	-	1
<i>Proteus rettgeri</i>	865	29944	1

<i>Proteus rettgeri</i>	4557	-	1
<i>Proteus vulgaris</i>	174	6380	1
<i>Proteus vulgaris</i>	4077	6896	1
<i>Proteus vulgaris</i>	165	9484	1
<i>Pseudomonas putida</i>	324	12633	2
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	930	17588	2
<i>Pseudomonas syringae</i>	126	10862	1
<i>Raoutella planticola</i>	843	33531	1
<i>Serratia marcescens</i>	977	14041	2
<i>Serratia marcescens</i>	159	10759	1
<i>Serratia rubidaea</i>	868	27593	1
<i>Staphylococcus aureus spaurens</i>	567	-	LB
<i>Staphylococcus capitis</i>	233	27840	LB
<i>Streptomyces badius</i>	3275	39117	118
<i>Streptomyces baldaccii</i>	3249	27429	118
<i>Streptomyces baldaccii</i>	3256	23615	118
<i>Streptomyces blastmyceticus</i>	3257	19731	118
<i>Streptomyces cattleya</i>	3278	35852	118
<i>Streptomyces cetonii</i>	3276	-	118
<i>Streptomyces flavogriseus</i>	3129	33331	118
<i>Streptomyces fradiae</i>	3231	21096	118
<i>Streptomyces griseostramineus</i>	3273	19768	118
<i>Streptomyces griseus</i>	3116	23921	118
<i>Streptomyces halstedii</i>	3328	19770	118
<i>Streptomyces mobaraensis</i>	3263	27441	118
<i>Streptomyces netropsis</i>	3248	-	118
<i>Streptomyces phaeochromogenes</i>	3308	-	118
<i>Streptomyces sp.</i>	3322	27448	118
<i>Streptomyces sp.</i>	3145	11238	118
<i>Thermoactinomyces candidus</i>	3219	27868	20
<i>Thermoactinomyces thalpophilus</i>	3318	14570	56
<i>Thermomonospora alba</i>	3324	-	56
<i>Thermomonospora sp.</i>	3323	-	56
<i>Xanthomonas campestris</i>	95	13951	1

<i>Xanthomonas campestris</i>	4480	11645	1
<i>Xanthomonas fragariae</i>	549	33239	33
<i>Xanthomonas translucens</i>	4643	19319	1

CECT: Colección Española de Cultivos Tipo; ATCC: American Type Culture Collection. #Código de la colección Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ).

Composición de los medios de cultivo

- Medio LB

Bactotripton	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
Agua destilada	1 L
pH: 7.5 con NaOH	

- Medio 1. Agar nutritivo I

Extracto de carne	5 g
Peptona	10 g
NaCl	5 g
Agua destilada	1 L
pH: 7.2	

- Medio 2. Agar nutritivo II

Extracto de carne	1 g
Extracto de levadura	2 g
Peptona	5 g
NaCl	5 g
Agua destilada	1 L

pH: 7.2

- Medio 3. Agar *Corynebacterium*

Peptona caseína	10 g
Extracto de levadura	5 g
Glucosa	5 g
NaCl	5 g
Agua destilada	1 L

pH: 7.2

- Medio 8. Mrs. Broth (Oxoid CM 359)

- Medio 20. Triptone Soya Agar (Oxoid CM 131)

Triptona	15 g
Peptona de soja	5 g
NaCl	5 g
Agua destilada	1 L

pH: 7.3

- Medio 33. YDC

Extracto de levadura	10 g
Glucosa	20 g
CaCO ₃	20 g
Agua destilada	1 L

pH: 7.2

- Medio 44. Yeast Glucosa Agar for *Acetobacter*

Glucosa	100 g
Extracto de levadura	10 g
CaCO ₃	20 g

Agua destilada 1 L

- Medio 56. YEME (Bennett's Agar) (ISP medium 2)

Glucosa 4 g
Extracto de levadura 4 g
Extracto de malta 10 g
Agua destilada 1 L
pH: 7.2

- Medio 96. *Bacillus thermoglucosidasius* medium

Almidón soluble 10 g
Peptona 5 g
Extracto de carne 3 g
Extracto de levadura 3 g
 $K_2H_2PO_4$ 3 g
Agua destilada 1 L
pH: 7.0

- Medio 118. *Streptomyces* medium

Glucosa 4 g
Extracto de levadura 4 g
Extracto de malta 10 g
 $CaCO_3$ 2 g
Agua destilada 1 L

pH: 7.2 con KOH antes de adicionar el agar (usar papel indicador).

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a mi Directora de Tesis, la Dra. Elizabeth Lewkowiz, *Eli*, ¿por qué? por muchos motivos, por aceptarme hace ya muchos años en su grupo de trabajo como seminarista, por ser un referente excelente desde todo punto de vista, profesional y personal, por ser una persona maravillosa que me ha enseñado demasiado en este camino de ciencia y de vida, por toda su paciencia conmigo y su confianza, por sus alientos constantes y sus sonrisas dulces. Podría agradecer mucho más, lo resumo en un ¡*Eli*, gracias por TODO! En segundo lugar agradezco al Dr. Adolfo Iribarren, *Ado*, por haberme dado la oportunidad de integrar su grupo de investigación, y recorro al agradecimiento por su paciencia y su buena onda siempre, por saber comprender mis horarios no tan extendidos en el laboratorio y por alentarme constantemente a alcanzar los objetivos.

No puedo dejar de agradecer a *todos mis amigos y compañeros de ruta*, con quienes he compartido centenares de días, desde mis comienzos como seminarista, experimento tras experimento, mate tras mate. Sin ellos no sé si hubiera logrado hacer la mitad de mi trabajo, porque entre todos me han ayudado y mucho, tomando muestras en distintos horarios solo porque somos compañeros de grupo, y porque muchas veces, desde ese compañerismo, se han generado amistades maravillosas. A *TODOS* los que pasaron por el laboratorio hace ya tiempo, ¡gracias por el tiempo compartido y por los que vendrán! En particular agradezco a *Ro*, por nuestras interminables charlas de vida y discusiones sobre resultados en aquellos momentos juntas, gracias por nuestra amistad hermosa, infinita y nunca limitada por la distancia. A *Esteban*, mi amigo cordobés, con quien compartí miles de preguntas, molestándolo cada vez que podía y él siempre colaborando conmigo, un ser único con quien también compartí los momentos más lindos y también difíciles de estos últimos años, ¡gracias! A *Tincho*, mi niño querido, por haberme enseñado que puedo guiar a alguien en su trabajo, por la buena onda, cariño y ánimo constante, gracias por haber contribuido, y mucho, con la realización de esta Tesis. A mis compañeros de estos últimos años, *Juani*,

Pao, Lucas, Bele y Juli, gracias por aguantar mi desorden en el laboratorio, y por todas las charlas y mates diarios, que voy a extrañar mucho.

No puedo olvidar a *Bruno y Guada*, los encargados de soportar molestias múltiples, todos los días y a toda hora, gracias por estar siempre bien dispuestos, con sol o con lluvia para ir al droguero y asistir con lo necesario para el trabajo.

A todos los que se me haría interminable mencionar pero que han tenido palabras de aliento y mucha buena onda conmigo, creo que esto engloba a la gran parte de las personas que trabaja en estos queridos pasillos del Departamento de Ciencia y Tecnología.

A mis profesores de carrera que han sembrado en mí el amor por mi trabajo.

A todos mis alumnos de Química Orgánica porque junto a ellos me encontré con una de las pasiones de mi vida, la docencia.

Agradezco por supuesto a mis amigas de la vida, a *Jime, Cintia, Caro y Nanu*, hermosas personas que he conocido en mi paso por la Universidad, con quienes compartimos horas de cursada y hoy, horas de vida. ¡!!!Las quiero, gracias por el aguante!!!!

Obviamente agradezco infinitamente a mi familia, principalmente a mi *mamá* y a mi *papá*, por estar siempre a mi lado, por el apoyo en todos los momentos, gracias por ser los padres maravillosos que son y los abuelos más dulces de la vida. A *Marce* por los años compartidos, por lo logrado juntos, por todo lo que aprendí a su lado y por haberme regalado el milagro maravilloso de mis dos hijas. A mis hermanos, *Juaner y Damián* simplemente por quererme tanto. A mis abuelos, *Mario y Mari* que con sus ochenta y tantos años no pasaron ni un día sin preocuparse y preguntar cómo iba todo. A mis tíos, *Oscar y Patricia*, por el amor y la dulzura de su compañía. A mi *suegra*, que me ha ayudado con el cuidado de mi pequeña cuando llegaba en horarios no pautados y por esas comidas deliciosas que sabe preparar con tanto amor. A mi *suegro, cuñadas, tíos y primos* por el afecto. A mis *sobrinos* por sus abrazos de oso tan dulces y llenos de amor. A mis

amigos *Vero* y *Gabi* por compartir conmigo a sus bellos hijos *Li* y *Lu*, por las orejas prestadas y los momentos vividos juntos. A todos mis amigos de la vida, ¡gracias por la compañía!

El agradecimiento más grande es para mi hija *Bianca* que supo acompañarme en estos siete años de su vida, comprendiendo la falta de tiempo y las horas de juego reducidas. Agradezco su paciencia conmigo y sus enseñanzas, porque ella me ha enseñado una de las tareas más difíciles en mi vida, la de ser madre. Gracias por esos hermosos besos, abrazos, sonrisas, charlas y amor puro. Te amo con toda mi alma.

Finalmente agradezco a *Dios* por toda la gracia que le ha dado a mi vida, por mi pequeñita hija *Julia* que con sus poquitos meses me completa el alma con sus hermosas sonrisas y caricias; por todas las personas maravillosas que ha puesto en mi camino, por ellos tengo el valor de seguir adelante y de trabajar, todos los días, por ser una mejor persona.