



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Máster

Métodos de caracterización cinética de
biocatalizadores heterogéneos a nivel de partícula
simple

*Kinetic characterization methods of heterogeneous
biocatalysts at single particle level*

Autor

Emilio Muñoz de la Peña Morales

Director

Fernando López Gallego

Máster en Ingeniería Biomédica

Escuela de Ingeniería y Arquitectura. Universidad de Zaragoza

2019



Escuela de
Ingeniería y Arquitectura
Universidad Zaragoza

Resumen

El uso de enzimas para catalizar reacciones químicas, conocido como biocatálisis, es una de las alternativas a otros procesos industriales tradicionales más prometedora, no sólo siendo una opción mucho más sostenible y ecológica, sino además abriendo la posibilidad de realizar un gran abanico de reacciones complejas en química orgánica de una manera mucho más sencilla. En este contexto, la inmovilización de dichas enzimas para que trabajen como un biocatalizador heterogéneo es una posibilidad para permitir su aplicación industrial, aumentando su estabilidad y permitiendo su reutilización y regeneración. En lo que se refiere a la biomedicina, la fabricación de biocatalizadores heterogéneos en el campo de los biomateriales es muy relevante, debido a su aplicación en biosensores que dependen de la unión de una enzima inmovilizada, así como en la liberación de fármacos y nanoterapia donde las enzimas inmovilizadas poseen un papel terapéutico. Si bien existen numerosas estrategias de inmovilización y fabricación de estos biocatalizadores heterogéneos, la falta de técnicas de caracterización espacio-temporal a un nivel microscópico impiden comprender plenamente el funcionamiento de la enzima dentro del microambiente del biocatalizador. Es aquí donde aparecen los estudios a nivel de partícula simple, cuyos resultados de enzimas dentro de una micropartícula se pueden extrapolar para comprender mejor su funcionamiento real de la enzima dentro del microambiente del biocatalizador. Sin embargo, aún siguen existiendo muchas limitaciones para analizar los datos obtenidos, por lo que se necesitan desarrollar nuevos métodos de análisis de imagen que permitan procesar los datos provenientes de los experimentos microscópicos.

En este trabajo se ha desarrollado un método de análisis de imagen de microscopía de fluorescencia que permite caracterizar cinéticamente el biocatalizador heterogéneo a nivel de partícula simple. Para ello, monitorizando la fluorescencia del interior de las micropartículas se han obtenido los cursos de reacción a nivel de partícula simple de las enzimas inmovilizadas en su interior. Esto ha sido posible debido al tipo de muestras analizadas, con enzimas dependientes de cofactores de nicotamida autofluorescentes en su forma reducida (NADH/NADPH), permitiendo asociar la fluorescencia con la concentración de cofactor, y por tanto con la actividad enzimática. Posteriormente, estos cursos de reacción enzimáticos han sido ajustados con una función Lambert W para calcular sus parámetros cinéticos. A lo largo de este trabajo se explican las diferentes fases llevadas a cabo para, partiendo de las imágenes iniciales de fluorescencia, obtener los parámetros cinéticos finales en las partículas del biocatalizador. Para este trabajo han sido analizadas muestras de diferentes sistemas enzimáticos donde las enzimas, co-inmovilizadas con los cofactores en micropartículas porosas, catalizaron distintas reacciones monitorizadas en el microscopio de fluorescencia. A partir de los resultados cinéticos de estas reacciones se ha obtenido información muy interesante sobre el efecto del tamaño de la partícula en la actividad enzimática según el tipo de sustrato utilizado. La herramienta de análisis de imagen a nivel de partícula simple desarrollada en este trabajo abre por tanto nuevas posibilidades para entender mejor el funcionamiento de sistemas enzimáticos inmovilizados. Esto puede ser de gran utilidad en el campo de los biomateriales, donde numerosas aplicaciones (biosensores, nanoterapia, liberación de fármacos...) están basadas en el acoplamiento de enzimas a materiales sólidos.

Tabla de contenidos

1	Introducción	7
1.1	Estudios a nivel de partícula simple de enzimas inmovilizadas	7
1.2	Introducción al caso de estudio: enzimas dependientes de cofactores	10
2	Objetivo general del trabajo	13
3	Metodología	15
3.1	Metodología experimental	16
3.2	Procesado de imagen con Image J	19
3.3	Corrección de gráficas iniciales	25
3.4	Cálculo de parámetros cinéticos a partir de gráficas de intensidad	30
4	Análisis de resultados	33
4.1	Efecto del tamaño de la partícula en los parámetros cinéticos	33
4.2	Efecto de la posición del píxel en la superficie interna de la partícula sobre los parámetros cinéticos	44
5	Conclusiones.....	51
6	Bibliografía.....	53

Tabla de figuras

Figura 1. Tipos principales de reciclaje de cofactores de nicotamida: dos sustratos acoplados (a) y dos enzimas acopladas (b) ²¹	10
Figura 2. Estrategia de Velasco et al. ²² para lograr la arquitectura del biocatalizador heterogéneo autosuficiente	12
Figura 3. Imágenes de microscopía de fluorescencia del primer y último instante temporal para el sistema 1 de reducción de NAD^+ , donde aumenta la fluorescencia (A); y para el sistema 2 de oxidación de NADPH, donde disminuye la fluorescencia (B).....	20
Figura 4. Identificación de los contornos a partir de la imagen original para el sistema 1 de reducción de NAD^+ (A) y el sistema 2 de oxidación de NADPH (B)	21
Figura 5. Partícula aislada del sistema 1 de reducción de NAD^+ con su contorno asociado (ROI) a diferentes instantes temporales.	22
Figura 6. Evolución temporal de la intensidad total de fluorescencia dentro de dos partículas del sistema 1 de reducción de NAD^+ (A) y el sistema 2 de oxidación de NADPH (B), donde cada punto de la gráfica corresponde a un instante o “frame” temporal.....	23
Figura 7. Esquema del procedimiento para descartar la fase de latencia inicial de un curso enzimático de reacción.	26
Figura 8. Procedimiento para corregir gráficas en cuya imagen de microscopio se hayan producido entradas de luz mantenidas en el tiempo.....	27
Figura 9. Acumulación de fluorescencia medida por el microscopio en diferentes píxeles del interior de la partícula.....	28
Figura 10. Esquema para obtener la unidad de volumen para cada píxel intraparticular	29
Figura 11. Resultados del código PCAT (valores de la derecha), donde la gráfica superior muestra el ajuste (línea roja) de los datos introducidos (aspas azules). En la gráfica inferior (color rosa) el código estima la bonanza del ajuste.....	31
Figura 12. Obtención de la velocidad inicial V_0 a partir de las gráficas de evolución de intensidad de fluorescencia volumétrica estableciendo como corte el 20% de $[S_0]$	32
Figura 13. Arriba, reducción de NAD^+ por la formiato deshidrogenasa, transformando ácido fórmico (1a) en CO_2 (2a). Debajo, intensidad de fluorescencia del cofactor al inicio y final de la reacción	34
Figura 14. Concentración máxima de cofactor $[S_0]$ frente al radio de partícula para el sistema de reducción de NAD^+ con FDH y ácido fórmico	34
Figura 15. Diferentes parámetros cinéticos frente al radio de partícula: V_0 (A), V_{max} (B), K_M (C) y V_{max}/K_M (D) para el sistema de reducción de NAD^+ con FDH y ácido fórmico	35

Figura 16. Arriba, oxidación de NADPH por la ceterreductasa, que transforma la 222-trifluoroacetofenona (1b) en 222-trifluoro-1-feniletanol (2b). Debajo, intensidad de fluorescencia del cofactor al inicio y final de la reacción.	36
Figura 17. Concentración máxima de cofactor $[S_0]$ frente al radio de partícula para el sistema de oxidación de NADPH con ceterreductasa y 222-trifluoroacetofenona	37
Figura 18. Diferentes parámetros cinéticos frente al radio de partícula: V_0 (A), V_{max} (B), K_M (C) y V_{max}/K_M (D) para el sistema de oxidación de NADPH con ceterreductasa y 222-trifluoroacetofenona	37
Figura 19. Arriba, oxidación de NADH por la alcohol deshidrogenasa, que transforma la acetona (1c) en isopropanol (2c). Debajo, intensidad de fluorescencia del cofactor al inicio y final de la reacción.	39
Figura 20. Concentración máxima de cofactor $[S_0]$ frente al radio de partícula para el sistema de oxidación de NADH con FDH y acetona.....	40
Figura 21. Diferentes parámetros cinéticos frente al radio de partícula: V_0 (A), V_{max} (B), K_M (C) y V_{max}/K_M (D) para el sistema de oxidación de NADH con ADH y acetona	40
Figura 22. Velocidad inicial (A) y velocidad máxima (B) frente a la concentración máxima de cofactor $[S_0]$ para el sistema de oxidación de NADH con ADH y acetona	40
Figura 23. Arriba, oxidación de NADPH por la alcohol deshidrogenasa, transformando el benzaldehído (1d) en alcohol benzílico (2d). Debajo, intensidad de fluorescencia del cofactor al inicio y final de la reacción.	42
Figura 24. Concentración máxima de cofactor $[S_0]$ frente al radio de partícula para el sistema de oxidación de NADH con FDH y benzaldehído.....	42
Figura 25. Diferentes parámetros cinéticos frente al radio de partícula: V_0 (A), V_{max} (B), K_M (C) y V_{max}/K_M (D) para el sistema de oxidación de NADH con ADH y benzaldehído	43
Figura 26. Velocidad inicial (A) y velocidad máxima (B) frente a la concentración máxima de cofactor $[S_0]$ para el sistema de oxidación de NADH con ADH y benzaldehído	43
Figura 27. Concentración máxima de cofactor $[S_0]$ frente a la distancia al centro de la partícula para el sistema de reducción de NAD^+ con FDH y ácido fórmico	45
Figura 28. Diferentes parámetros cinéticos frente a la distancia al centro de la partícula: V_0 (A), V_{max} (B), K_M (C) y V_{max}/K_M (D) para el sistema de reducción de NAD^+ con FDH y ácido fórmico	45
Figura 29. Concentración máxima de cofactor $[S_0]$ frente a la distancia al centro de la partícula para el sistema de oxidación de NADPH con ceterreductasa y trifluoroacetofenona	46
Figura 30. Diferentes parámetros cinéticos frente a la distancia al centro de la partícula: V_0 (A), V_{max} (B), K_M (C) y V_{max}/K_M (D) para el sistema de oxidación de NADPH con ceterreductasa y trifluoroacetofenona	47

Figura 31. Concentración máxima de cofactor $[S_0]$ frente a la distancia al centro de la partícula para el sistema de oxidación de NADH con ADH y acetona 48

Figura 32. Diferentes parámetros cinéticos frente a la distancia al centro de la partícula: V_0 (A), V_{max} (B), K_M (C) y V_{max}/K_M (D) para el sistema de oxidación de NADH con ADH y acetona . 48

Figura 33. Concentración máxima de cofactor $[S_0]$ frente a la distancia al centro de la partícula para el sistema de oxidación de NADH con ADH y benzaldehído 49

Figura 34. Diferentes parámetros cinéticos frente a la distancia al centro de la partícula: V_0 (A), V_{max} (B), K_M (C) y V_{max}/K_M (D) para el sistema de oxidación de NADH con ADH y benzaldehído 50

1 Introducción

1.1 Estudios a nivel de partícula simple de enzimas inmovilizadas

1.1.1 Biocatálisis

Las reacciones químicas que se producen de forma espontánea normalmente requieren mucho tiempo en producirse, ya que tienen que hacer frente a enormes requerimientos de energía. Esta es la razón de la existencia de los catalizadores, moléculas que aceleran dichas reacciones disminuyendo en gran medida sus barreras de energía para que se puedan completar. En la naturaleza los catalizadores esenciales son las enzimas, unas proteínas encargadas tanto de procesos catabólicos como anabólicos del metabolismo celular fundamentales para la existencia de la vida. Debido a su origen y composición, las enzimas poseen unas propiedades únicas de las que carecen los catalizadores químicos: trabajan en condiciones fisiológicas, son biocompatibles y biodegradables, pueden catalizar gran cantidad de reacciones complejas y su selectividad es mucho mayor^{1,2}.

La biocatálisis se define como el uso de enzimas para catalizar una determinada reacción química. El origen del uso de enzimas como catalizadores se remonta varios milenios atrás, para la elaboración de numerosos alimentos mediante fermentación (pan, vino, queso)^{1,3}. Sin embargo, el sentido moderno de la biocatálisis aplicada a la industria comienza a finales del siglo pasado con el avance de la biología molecular. Este avance ha permitido aislar enzimas para ser usadas en diferentes aplicaciones, como pueden ser la síntesis de componentes químicos no naturales, la fabricación de fármacos y su uso en terapia médica^{1,4,5}. La biocatálisis ha demostrado ser una tecnología ecológica, sostenible y eficiente, que ha ido paulatinamente sustituyendo diferentes procesos químicos a nivel industrial en las últimas décadas, y por tanto su desarrollo y evolución es fundamental si se quiere reducir el impacto humano en nuestro planeta^{1,3,6}.

1.1.2 Inmovilización de enzimas

Una de las posibilidades para la biocatálisis es el uso de enzimas solubles aisladas⁷. Sin embargo, si se utilizan enzimas solubles aisladas como catalizador aparecen las limitaciones de la biocatálisis homogénea: se requiere una purificación del producto y su reutilización es muy compleja^{7,8}. Además, las enzimas han evolucionado en el interior de las células, por lo que están hechas para trabajar en condiciones fisiológicas. Esto hace que mantener su estabilidad sea muy complicado si las condiciones de los procesos químicos donde actúan son demasiado extremas⁹. Una de las soluciones más antiguas para evitar los problemas de estabilidad y solubilidad enunciados anteriormente ha sido la inmovilización de las enzimas en materiales sólidos⁷. De esta forma, las enzimas trabajan como biocatalizadores heterogéneos, que pueden recuperarse para ser reutilizados y así mantener su actividad durante largos periodos de tiempo, además de facilitar la recuperación de productos y aumentar la estabilidad de la enzima. Sin embargo, la inmovilización de enzimas sobre materiales sólidos también posee limitaciones, como los problemas en el transporte másico, la existencia de gradientes internos y la pérdida de

propiedades de la enzima por efecto de la propia inmovilización^{8,10}. En lo que se refiere a la biomedicina, dentro del campo de los biomateriales la fabricación de biocatalizadores es muy relevante, debido principalmente a dos de sus ramas principales: por un lado, en el caso de los biosensores muchos de ellos dependen de la unión de enzimas que se encuentran inmovilizadas en la superficie sólida del sensor; por otro lado, en los campos de liberación de fármacos y nanoterapia se encuentran muchos ejemplos de enzimas inmovilizadas que tienen un papel terapéutico.

1.1.3 Biocatalizadores heterogéneos autosuficientes

Una de las opciones que permite la biocatálisis es la posibilidad de simular rutas metabólicas propias de organismos celulares, mediante cascadas de reacciones catalizadas por sistemas multi-enzimáticos en las que se obtienen los mismos productos químicos biológicos pero bajo condiciones no fisiológicas, permitiendo así su aplicación a nivel industrial. Esta estrategia, conocida como biocatálisis de sistemas, se basa en el uso de la biología más simple para conseguir la química más compleja¹¹⁻¹³. Sin embargo, vuelven a aparecer los problemas de la solubilidad y estabilidad de enzimas, por lo que su correcta inmovilización es fundamental para lograr unas condiciones de trabajo industriales además de permitir su reutilización y facilitar la recuperación de productos. Hablamos ahora de los sistemas de biocatálisis heterogéneos, donde los sistemas enzimáticos se organizan en la superficie del material simulando la organización de los procesos metabólicos dentro de las células vivas^{11,14}. Sin embargo, muchas de estas enzimas requieren la presencia de un cofactor para ser activas, por lo que es fundamental que se tenga en cuenta en el diseño del biocatalizador heterogéneo.

A partir de las numerosas posibilidades que permite la inmovilización enzimática, se pueden integrar sistemas biológicos que incluyen enzimas y cofactores en una superficie sólida. De esta forma se puede obtener un biocatalizador heterogéneo autosuficiente que actúe como una célula metabólica artificial capaz de realizar reacciones complejas en cascada. Estos sistemas son autosuficientes debido a que únicamente requieren añadir de forma exógena el sustrato, mientras que todos sus elementos activos se incorporan en la fase sólida facilitando su reutilización. Para que el biocatalizador heterogéneo autosuficiente funcione correctamente, los cofactores inmovilizados deben estar activos y accesibles para las enzimas inmovilizadas. Además de ello se necesita mantener los cofactores en la fase sólida para evitar su lixiviación. Sin embargo, es muy complicado lograr una óptima inmovilización de enzimas y cofactor que permita su reutilización, debido principalmente a los problemas anteriormente explicados como el transporte másico o la existencia de gradientes internos¹¹.

1.1.4 Caracterización de biocatalizador heterogéneo

Para intentar entender los problemas propios de los biocatalizadores heterogéneos es necesario comprender mejor los procesos de inmovilización y de funcionamiento de la enzima dentro del material poroso. Uno de los aspectos más importantes para una correcta optimización del biocatalizador es su caracterización espacio-temporal a nivel microscópico. Es decir, si se consigue comprender cómo las enzimas trabajan dentro de la microestructura del biocatalizador su fabricación sería mucho más efectiva⁷.

Sin embargo, actualmente la mayoría de estudios de caracterización se basan únicamente en parámetros a nivel macroscópico^{15,16}. Estos parámetros promedio no tienen en cuenta la heterogeneidad de la muestra, enmascarando el funcionamiento espacio-temporal de la enzima y el ambiente intraparticular del biocatalizador en el que trabaja. Por tanto, para mejorar su diseño se deberían conocer los efectos de la superficie sólida sobre la enzima y su funcionamiento a un nivel microscópico⁷.

1.1.5 Estudios a nivel de partícula simple

Una de las formas de obtener esta caracterización microscópica del biocatalizador heterogéneo serían los estudios con resolución espacio-temporal a nivel de partícula simple. Es decir, si se estudia el comportamiento de una enzima dentro de una partícula, dichos resultados se podrían extrapolar para obtener su funcionamiento dentro de la microestructura del biocatalizador. Estudiando la conformación de la proteína, el transporte másico y la cinética enzimática dentro de una partícula simple a una nano/micro escala ayudaría a entender mejor cómo se comporta la proteína en la microestructura del biocatalizador^{17,18}. De esta forma sería mucho más sencillo diseñar un biocatalizador heterogéneo que optimizase el funcionamiento de la enzima y afectase lo menos posible a sus propiedades, además de comprender mejor su productividad y estabilidad a un nivel macroscópico.

Existen precedentes que apoyan la utilidad de este tipo de estudios, como son los estudios de molécula simple¹⁹ y célula simple²⁰ desarrollados en las últimas dos décadas. Estos estudios han mejorado en gran medida la comprensión de la dinámica de numerosos procesos biológicos y han permitido diferentes éxitos biotecnológicos. Además, han aportado numerosas herramientas de análisis para la localización de proteínas, conformación de proteínas y transporte de metabolitos dentro de la célula. Teniendo en cuenta que las partículas porosas son mucho más simples y controlables que las células vivas, todo estos estudios muestran la gran cantidad de posibilidades para la caracterización microscópica de partículas porosas. Los estudios a nivel de partícula simple de biocatalizadores heterogéneos están mucho menos extendidos, aunque están ganando terreno como método de caracterizar sus propiedades internas antes de la evaluación operativa, especialmente en biocatálisis de flujo^{17,20}.

En resumen, los estudios a nivel de partícula simple aportan información fundamental sobre la funcionalidad, integridad estructural y microambientes de las enzimas inmovilizadas en materiales sólidos, obteniendo información inaccesible por estudios macroscópicos. Toda la información intraparticular es fundamental para obtener la localización óptima de sistemas de enzimas inmovilizadas aumentando su eficiencia, el tipo unión necesaria con la superficie sólida para obtener una estabilidad máxima y una arquitectura del biocatalizador que reduzca las limitaciones del transporte másico. Sin embargo, siguen existiendo muchas limitaciones para analizar los datos obtenidos, por lo que se necesitan desarrollar nuevos métodos de análisis de imagen que permitan procesar los datos provenientes de los experimentos microscópicos.

Por tanto, en el presente trabajo se intentará establecer un método que permita procesar y analizar imágenes de diferentes experimentos microscópicos realizados en biocatalizadores heterogéneos a nivel de partícula simple. Con este objetivo, como se explicará a continuación, el trabajo se centrará en reacciones que involucran biocatalizadores heterogéneos con enzimas dependientes de cofactores de nicotamida. En este trabajo presentaremos la metodología y el

análisis necesarios para llevar a cabo estudios a nivel de partícula de enzimas co-inmovilizadas con sus cofactores correspondientes en micropartículas porosas de agarosa. La principal ventaja para el estudio microscópico de este tipo de biocatalizadores se debe a la autofluorescencia que poseen los cofactores redox en su forma reducida (NADH, NADPH), la cual permitirá analizar la actividad enzimática a partir de los valores de fluorescencia observadas en las imágenes experimentales.

1.2 Introducción al caso de estudio: enzimas dependientes de cofactores

Algunas de las reacciones más interesantes en la biocatálisis a nivel industrial son catalizadas por enzimas que dependen de un cofactor. Esto quiere decir que la enzima utilizada únicamente actúa cuando está unida a dicho cofactor. Tal es el caso de la conversión de una cetona al correspondiente alcohol (y viceversa), una de las reacciones redox más comunes en la química orgánica. En este tipo de reacciones la biocatálisis aparece como una nueva opción frente a los procesos químicos sintéticos tradicionales, que requieren el uso de metales tóxicos y de hidruros caros y complejos. Es aquí donde entran en juego las enzimas deshidrogenasas (y reductasas), las cuales son dependientes de cofactores de nicotamida, como NADH o NADPH²¹. Sin embargo, estos cofactores poseen un alto precio, por lo que su regeneración y reutilización son un requerimiento fundamental para su aplicación a nivel industrial. Existen numerosos sistemas basados en reacciones enzimáticas que consiguen reciclar dichos cofactores, pero aún así necesitan la adición exógena del cofactor y por tanto el coste del proceso aumenta en gran medida²².

En la figura 1 se muestran los dos sistemas principales para reciclar los cofactores de nicotamida: en el primer caso mediante una única enzima que transforma un sustrato y un co-sustrato que permite reciclar el cofactor *in situ*; y en el segundo caso mediante dos enzimas, donde una cataliza la reacción principal y la otra realiza el reciclaje del cofactor.

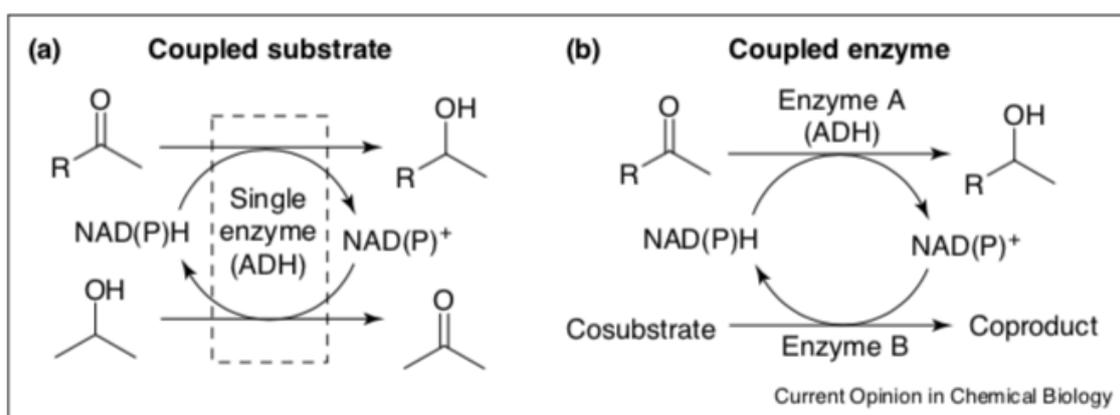


Figura 1. Tipos principales de reciclaje de cofactores de nicotamida: dos sustratos acoplados (a) y dos enzimas acopladas (b)²¹

1.2.1 Co-inmovilización de enzima y cofactor

Una de las soluciones para intentar evitar la necesidad de añadir el cofactor de forma exógena es la co-inmovilización de cofactor y enzima sobre un material sólido. En el caso del cofactor NADPH, se ha conseguido su co-inmovilización junto con diferentes deshidrogenasas y reductasas, permitiendo su regeneración y reutilización durante varios ciclos⁸. Sin embargo, este tipo de sistemas heterogéneos se enfrentan a varios retos: conseguir que la enzima trabaje eficientemente con el cofactor inmovilizado, aumentar el número de recambio de los cofactores inmovilizados, y lograr la reutilización tanto de enzimas como de cofactores a gran escala y en procesos en continuo. Todo esto se debe a que una inmovilización irreversible de los cofactores de nicotamida disminuye de forma significativa la actividad enzimática²³. Por esto en la última década se ha propuesto la adsorción iónica de cofactores fosforilados como el NADH o el NADPH a superficies activadas con grupos catiónicos.

Según el tipo de material donde co-inmovilizar la enzima y el cofactor fosforilado, existe la posibilidad de usar materiales porosos o no porosos. En cuanto a los materiales no porosos, la reutilización del cofactor funciona solo en un medio orgánico, pero falla en un medio acuoso debido a la lixiviación tanto del cofactor desde la matriz sólida al medio de reacción²⁴. Sin embargo, si el cofactor (cargado negativamente) es adsorbido en la superficie de un material poroso se produce una adsorción dinámica, y por tanto la unión entre el cofactor y la superficie porosa es reversible. Esto hace que algunas moléculas de cofactor estén asociadas a la superficie sólida, permitiendo su reutilización, mientras que otras estén disociadas dentro del volumen de los poros, estando así disponibles para las enzimas inmovilizadas. De este modo, los cofactores se intercambian continuamente entre los centros activos de las enzimas y la superficie sólida sin salir del interior del material poroso. Este equilibrio de asociación/disociación dentro del ambiente poroso permite que se produzca una biocatálisis heterogénea autosuficiente, ya que es capaz de regenerar y retener los cofactores en la fase sólida dentro de un medio acuoso²² sin necesidad de añadir estos cofactores de forma exógena. De hecho, en el mismo laboratorio de biocatálisis heterogénea donde se ha desarrollado este trabajo de fin de master, se ha desarrollado una arquitectura muy eficiente en la que las enzimas son inmovilizadas covalentemente e irreversiblemente a través de grupos aldehídos y posteriormente recubiertas con una poliamina (PEI) que permite la unión reversible con los grupos fosfato de los cofactores (Figura 2²²)

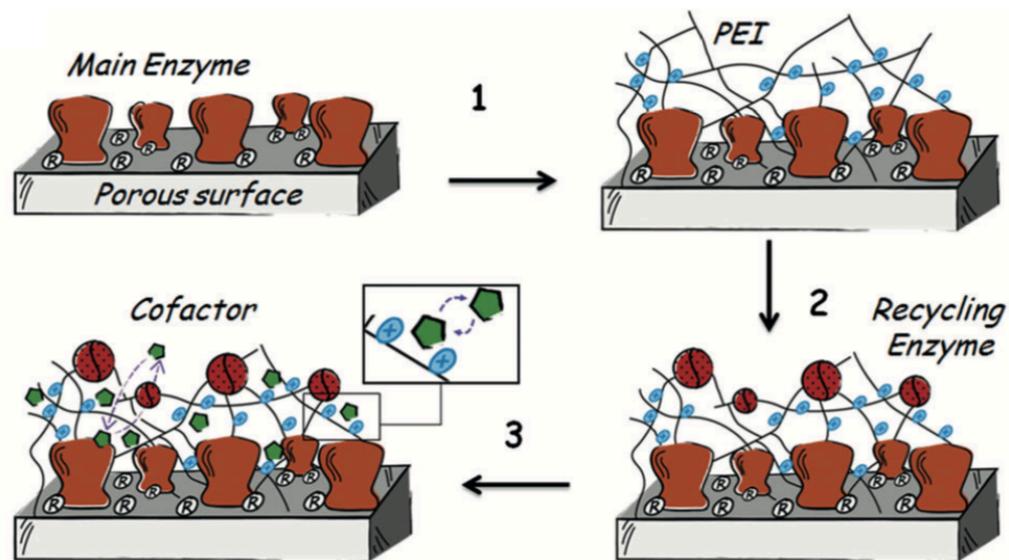


Figura 2. Estrategia de Velasco et al. ²² para lograr la arquitectura del biocatalizador heterogéneo autosuficiente .

Este tipo de biocatalizadores heterogéneos autosuficientes basados en la co-inmovilización de cofactores y enzimas serán los estudiados en este trabajo. Más específicamente, se estudiará la reducción o oxidación de NAD^+ o NAD(P)H , respectivamente, dentro de superficies porosas donde se encuentran inmovilizadas diferentes deshidrogenasas y cetoreductasas.

2 Objetivo general del trabajo

El principal objetivo de este trabajo es establecer un método para obtener la cinética de reacción en biocatalizadores heterogéneos a nivel de partícula simple a partir de imágenes de microscopía de fluorescencia. Debido a la naturaleza de las muestras, la fluorescencia está directamente relacionada con la concentración de cofactor reducido (NADH) y por tanto con la actividad enzimática de las enzimas inmovilizadas. De este modo, mediante la monitorización de la fluorescencia dentro de la partícula se podrá obtener información sobre la cinética de las enzimas inmovilizadas con resolución espacio-temporal. Este método de análisis pretende facilitar la caracterización de biocatalizadores heterogéneos para comprender mejor su funcionamiento y así contribuir a futuros diseños más racionales y eficientes.

Como casos de estudio hemos elegido tres sistemas enzimáticos dependientes del cofactor NAD(P)H:

- Sistema 1: Formiato deshidrogenasa de *Candida boidinii* co-inmovilizada con NAD⁺ y usando ácido fórmico como sustrato exógeno. En este sistema la enzima está inmovilizada de forma irreversible a través de un entrecruzamiento basado en grupos bi-epóxido con micropartículas de agarosa funcionalizadas con polietileneimina (aminas primarias, secundarias y terciarias) que a su vez proporciona las cargas positivas necesarias para adsorber iónicamente el cofactor.
- Sistema 2: Cetorreductasa P1-A04 (Codexis®) co-inmovilizada con NADPH y usando 2,2',2''-trifluoroacetofenona como sustrato exógeno. En este sistema tanto la enzima como el cofactor están iónicamente adsorbidas a micropartículas de agarosa activadas con aminas terciarias.
- Sistema 3: Alcohol deshidrogenasa de *Bacillus stearothermophilus* co-inmovilizada con NADH y usando dos sustratos exógenos diferentes: acetona y benzaldehído. En este sistema la enzima está inmovilizada a través de enlaces metálicos entre su cola de histidinas y los grupos quelatos en la superficie del soporte. La enzima inmovilizada es posteriormente recubierta con una capa polimérica de polietileneimina donde se adsorbe reversiblemente el cofactor NADH.

Todos los datos experimentales se obtuvieron en el laboratorio de biocatálisis heterogénea de la Universidad de Zaragoza. Los datos experimentales usados en este trabajo se obtuvieron de la publicación de Velasco-Lozano et al.²² para el sistema 1, de la publicación Benítez-Mateos et al.²⁵ para el sistema 2 y experimentalmente *ad hoc* para el sistema 3.

Para la elaboración del método desarrollado en este trabajo se han seguido varias fases, por lo que el objetivo general puede dividirse en tres sub-objetivos que abarcan las fases necesarias para lograr obtener y analizar los resultados.

1. **Procesado de imágenes de microscopía fluorescencia:** la primera fase de este trabajo será el correcto procesado de las imágenes de microscopía de fluorescencia que permitan obtener los datos de evolución temporal de fluorescencia, que posteriormente permitirán calcular la cinética de reacción. Este primer sub-objetivo abarca los diferentes pasos para que los datos de fluorescencia iniciales puedan asociarse correctamente con la actividad

enzimática, obteniendo así las curvas de cursos de reacción enzimáticos a nivel de partícula simple. Para ello se empleará el software Image J, con el que se intentarán procesar las diferentes imágenes de microscopía de fluorescencia.

2. **Obtención de parámetros cinéticos de reacción.** Esta segunda fase se centra en la obtención de los resultados de la cinética enzimática a partir de los datos obtenidos en la primera fase. Para ello será utilizada una herramienta de ajuste, que consiste en un código de Matlab que permite calcular diferentes parámetros cinéticos a partir de las curvas de cursos de reacción enzimáticos. Será fundamental que los valores de los diferentes parámetros obtenidos sean lo más realistas y exactos posible.
3. **Análisis de resultados cinéticos.** Esta última fase del trabajo pretenderá interpretar la información obtenida de los parámetros cinéticos de reacción. Debido al diferente tipo de resultados obtenidos, será posible realizar un análisis del biocatalizador a nivel interparticular (comparando la cinética enzimática en diferentes partículas) así como una análisis intraparticular (analizando la cinética enzimática en diferentes puntos del interior de una misma partícula).

3 Metodología

En este bloque se resumirán las diferentes fases del método empleado para obtener los parámetros cinéticos a partir de un set de imágenes de microscopía de fluorescencia tomadas a diferentes tiempos.

1. **Metodología experimental.** Este primer apartado describe los materiales y métodos de los experimentos a partir de los cuales se obtuvieron las diferentes imágenes de microscopía. Todas ellas provienen de reacciones observadas *in operando* de diferentes sistemas donde se co-inmovilizaron enzimas y cofactores en micropartículas porosas.
2. **Procesado de Imagen.** En este primer paso se obtendrán las gráficas iniciales de la intensidad de fluorescencia (I) frente al tiempo (t) a partir de un set de imágenes de microscopía de fluorescencia. Consta de los diferentes códigos utilizados en Image J para obtener dicha información original a partir de las imágenes de las muestras.
3. **Normalización y curado de los datos crudos a partir de las imágenes de fluorescencia.** Una vez obtenidas las primeras gráficas I vs t, se realizarán diferentes modificaciones con el objetivo de obtener unas gráficas que muestren unos resultados normalizados y comparables entre sí.
4. **Cálculo de parámetros cinéticos.** Usando como datos de inicio aquellos representados en las gráficas de I vs t normalizadas y mediante la herramienta de ajuste "PCAT" y usando el software MATLAB se podrán obtener los parámetros cinéticos de las enzimas inmovilizadas a nivel de partícula simple.

3.1 Metodología experimental

En este apartado se definen los materiales utilizados para obtener las imágenes de microscopía de fluorescencia que han sido empleadas para establecer un método de caracterización de biocatalizadores heterogéneos a nivel de partícula simple. Como ya se dijo anteriormente en la introducción, todas las muestras utilizadas se basan en partículas porosas de agarosa donde se han inmovilizado diferentes enzimas y sus respectivos cofactores $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ (Dinucleótido de nicotamida adenina / fosfato). La autofluorescencia del cofactor reducido (NADH/NADPH) permite relacionar directamente los valores de fluorescencia de las muestras con su concentración, y por tanto con la actividad de las enzimas inmovilizadas. Mientras que las dos primeras muestras fueron obtenidas de trabajos anteriores, el último sistema enzimático ha sido obtenido en el laboratorio. A continuación se describen las diferentes reacciones y sistemas enzimáticos de las que se han obtenido las muestras empleadas en este trabajo.

3.1.1 Sistema de reducción de NAD^+ a NADH (Velasco-Lozano et al., 2017²²)

La reacción de esta muestra se cataliza por medio de la enzima formiato deshidrogenasa (FDH) co-inmovilizada con el cofactor NAD^+ con ácido fórmico como sustrato y dando lugar a CO_2 . Esta reacción es en realidad la reacción regeneradora del biocatalizador. Como en la reacción se parte de NAD^+ para progresivamente reducirlo en NADH , se produce un incremento en la fluorescencia de la muestra.

3.1.1.1 Materiales

Las partículas de la muestra corresponden al sistema de biocatálisis heterogéneo autosuficiente, donde la enzima ADH cataliza reacción principal (reducción asimétrica de trifluoroacetofenona consumiendo NADH) y la enzima FDH cataliza la reacción de regeneración (oxidación del ácido fórmico consumiendo NAD^+). El biocatalizador heterogéneo está formado por los siguientes elementos:

- Cofactor Dinucleótido de Nicotamina Adenina (NAD^+)
- Enzima principal: Alcohol Deshidrogenasa 2, proveniente de *Thermus thermophilus* (Tt-ADH)
- Enzima secundaria: Formiato Deshidrogenasa, proveniente de *Candida boidinii* (Cb-FDH)
- Polietilienimina (PEI)
- Micropartículas de Agarosa activadas con grupos Glioxilo (Ag-G).

3.1.1.2 Métodos

Para producir las muestras del biocatalizador heterogéneo se realizó inicialmente la inmovilización de la enzima principal (Tt-ADH2) en las micropartículas de agarosa activadas con aldehídos (Ag-G). Después se realizó el recubrimiento de la partícula con el polímero PEI. La enzima regeneradora (Cb-FDH) se inmovilizó al polímero PEI por adsorción con un posterior entrelazado permanente. Finalmente, se inmovilizó el cofactor NAD^+ por adsorción al polímero PEI. De esta forma, ambas enzimas y el polímero PEI están unidos de forma irreversible a la

micropartícula de agarosa mientras que el cofactor es adsorbido de forma reversible al polímero que envuelve las enzimas.

La monitorización *in operando* de la fluorescencia del cofactor tuvo lugar en un microscopio de fluorescencia *cell axio observer* con excitación en amplitud de onda de 365 nm y emisión en 402-448 nm durante 15 minutos.

3.1.2 Sistema de oxidación de NAD(P)H a NAD(P)⁺ (Benítez-Mateos et al., 2017²⁵)

La reacción se cataliza con la enzima cetorreductasa (KRED) co-inmovilizada con NAD(P)H (dinucleótido nicotamida adenina fosfato) usando 2,2',2''-trifluoroacetofenona como sustrato, siendo la reducción asimétrica de éste la reacción principal del biocatalizador. Debido a que la autofluorescencia del cofactor se da en su forma reducida (NADPH), al ser oxidado por la enzima en NADP⁺ se obtiene una pérdida de fluorescencia con el tiempo (decaimiento de fluorescencia).

3.1.2.1 Materiales

Las partículas de la muestra corresponden a un biocatalizador heterogéneo autosuficiente, en el cual la misma enzima inmovilizada KRED es capaz de realizar tanto la reacción principal (reducción asimétrica de carbonilos) como la secundaria (oxidación de Isopropanol para regenerar el cofactor). El biocatalizador consta de los siguientes elementos:

- Enzima cetorreductasa P1-A04 (Codexis®) inmovilizada (KRED)
- Cofactor dinucleótido nicotamida adenina fosfato (NADPH)
- Micropartículas de agarosa activadas con grupos dietil aninoetil Ag-DEAE

3.1.2.2 Métodos

Tanto la enzima como el cofactor fueron inmovilizados en la agarosa mediante enlaces iónicos (debido al tipo de grupo dietil aninoetil utilizado para activar la agarosa).

El microscopio de fluorescencia utilizado para analizar la fluorescencia de las partículas *in operando* fue del tipo "cell axio observer" con una amplitud de onda de excitación a 365 nm, y a 402-448 nm de emisión, siendo la duración de observación de 20 minutos.

3.1.3 Sistemas de oxidación de NADH a NAD⁺

Las dos reacciones propuestas se catalizan con la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) co-inmovilizada con el cofactor NADH utilizando como sustratos acetona y benzaldehído. Debido a que se parte del cofactor en su forma reducida (y autofluorescente) para ser utilizado por la enzima, en estas dos nuevas reacciones se vuelve a producir un decaimiento progresivo en los valores de fluorescencia.

Estas muestras no se basan en biocatalizadores heterogéneos autosuficientes ya publicados, como en los casos 3.1.1 y 3.1.2, sino que proceden de biocatalizadores producidos en el laboratorio elaborados específicamente para este trabajo.

3.1.3.1 Materiales

En este caso el biocatalizador no es autosuficiente, ya que carece de una reacción de regeneración del cofactor. Cuenta con una enzima, la alcohol deshidrogenasa de *Bacillus stearothermophilus* (ADH) co-inmovilizada con el cofactor NADH en micropartículas de cobalto-agarosa funcionalizadas con polietilenoimina. Las reacciones llevadas a cabo por este biocatalizador dependen del sustrato añadido (acetona o benzaldehído), aunque en ambos casos la enzima oxida el cofactor pasando de NADH a NAD⁺, y por tanto produciéndose una disminución en los valores de fluorescencia.

- Alcohol deshidrogenasa de *Bacillus stearothermophilus* (ADH)
- Cofactor dinucleótido nicotamida adenina (NADH)
- Polietilenoimina (PEI)
- Micropartículas de Cobalto Agarosa (Co-Ag)

3.1.3.2 Métodos

Inicialmente se llevó a cabo la inmovilización de la enzima ADH en las micropartículas de cobalto agarosa a través de la etiqueta de histidinas fusionada al N-terminal de la ADH y los grupos quelato de cobalto en la superficie del soporte. Posteriormente la enzima inmovilizada se recubrió con el polímero PEI y finalmente se inmovilizó el cofactor NADH sobre la red polimérica de PEI.

Las mediciones *in operando* de las reacciones se realizaron en un microscopio de fluorescencia Leica widefield con filtro DAPI con un paso de filtro de 350/50 nm y con un filtro de emisión 460/50, durante 15 minutos.

3.2 Procesado de imagen con Image J

En este segundo apartado de la sección de metodología se describen los diferentes procesos llevados a cabo para obtener las primeras gráficas de evolución temporal de intensidad de fluorescencia a partir de las imágenes de microscopía, mediante diferentes códigos ejecutados en el software Image J.

3.2.1 Características de la imagen de microscopía de fluorescencia

3.2.1.1 *Frames temporales*

Como el objetivo del trabajo es la obtención de los parámetros cinéticos, para poder calcularlos será necesaria la obtención de la evolución temporal de su actividad enzimática. Por tanto, el set de datos necesario para obtener dichos parámetros serán el conjunto de imágenes de fluorescencia (*frames*) tomadas a diferentes tiempos. Para ello se utilizará un microscopio de fluorescencia en su modalidad de “**time lapse**”. El funcionamiento de este microscopio consiste en la toma de múltiples imágenes de fluorescencia de una misma muestra a diferentes tiempos.

3.2.1.2 *Fluorescencia*

El método empleado para cuantificar la actividad enzimática ha sido la intensidad de fluorescencia, medida en RFUs (Resonance Fluorescence Units). Como el software “Image J” es capaz de cuantificar dicha intensidad de fluorescencia (I), para cada píxel de la imagen tendremos un valor específico de I . Como además contamos con diferentes imágenes temporales, será posible obtener una evolución temporal de dichos valores de intensidad de fluorescencia, que podrán ser representados en gráficas de RFUs vs t . Sin embargo, antes de obtener dichas gráficas será necesario procesar la imagen con diferentes códigos en el software Image J para definir las regiones de interés (ROIs) donde queremos llevar a cabo el análisis y establecer el tipo de gráfica a obtener.

En la siguiente Figura 3 se puede observar dos de las muestras utilizadas para realizar este trabajo, donde se distinguen varias partículas cuya fluorescencia varía según el instante temporal (se muestran el primer y último de los instantes temporales del set de imágenes).

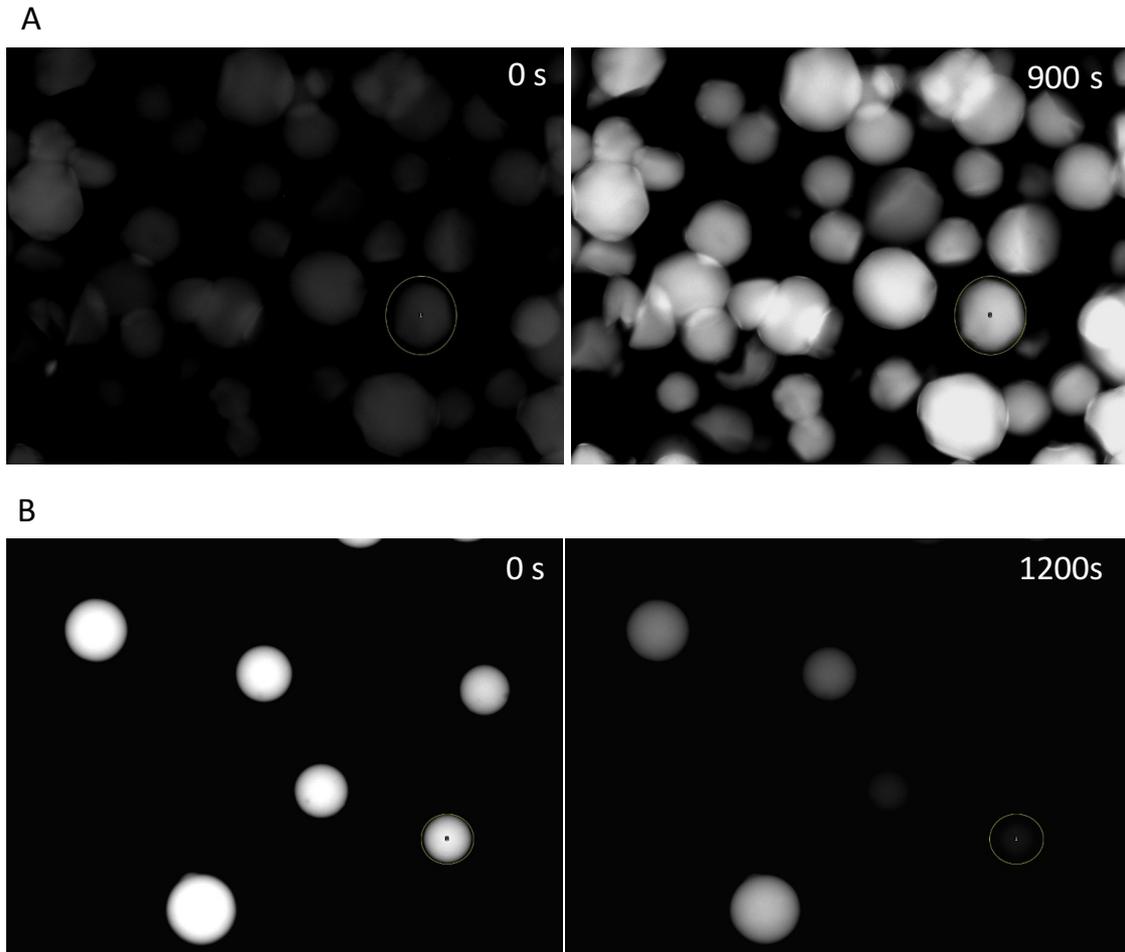


Figura 3. Imágenes de microscopía de fluorescencia del primer y último instante temporal para el sistema 1 de reducción de NAD^+ , donde aumenta la fluorescencia (A); y para el sistema 2 de oxidación de NADPH, donde disminuye la fluorescencia (B)

3.2.2 Segmentación de imagen (Identificación y separación de partículas): Código Identificador de contornos

Como las imágenes contienen numerosas partículas, será necesaria la identificación de cada una de ellas para estudiar la actividad enzimática a nivel de partícula simple. Para ello se ha desarrollado un código que asocia un contorno específico (ROI) para cada una de las partículas, de modo que diferencia la señal de intensidad del interior de la partícula respecto del fondo donde se encuentra. Finalmente este código guarda cada partícula como una imagen individual para su posterior análisis.

3.2.2.1 Consideraciones de contraste

El fundamento para identificar las partículas y poder trazar su contorno se basa en la segmentación mediante diferencia de contraste (partículas brillantes en un fondo oscuro). Por tanto, es muy importante fijar un umbral de contraste adecuado que permita definir un contorno o ROI a partir de la imagen de microscopía de fluorescencia y que este contorno se asemeje lo máximo posible al de la partícula original, para minimizar el error en los posteriores análisis.

Tras una serie de problemas relacionados con la selección automática del ROI que daban contornos alejados de la realidad experimental, se decidió incluir en el código una selección inicial que permite comparar la segmentación con diferentes métodos de umbral (*threshold*) y utilizar el más adecuado para cada una de las imágenes utilizadas.

3.2.2.2 Consideraciones morfológicas

A la hora de realizar una correcta segmentación de partículas se deben cumplir dos criterios morfológicos:

- Circularidad: se rechazan aquellas partículas demasiado irregulares.
- Aislamiento: se rechazan aquellas partículas que estén en contacto con otras, ya que su fluorescencia se solaparía dando lugar a resultados erróneos

En la Figura 4 se pueden distinguir las diferentes partículas identificadas por el código asociando, que posteriormente se aislarán para estudiar su fluorescencia de forma individual.

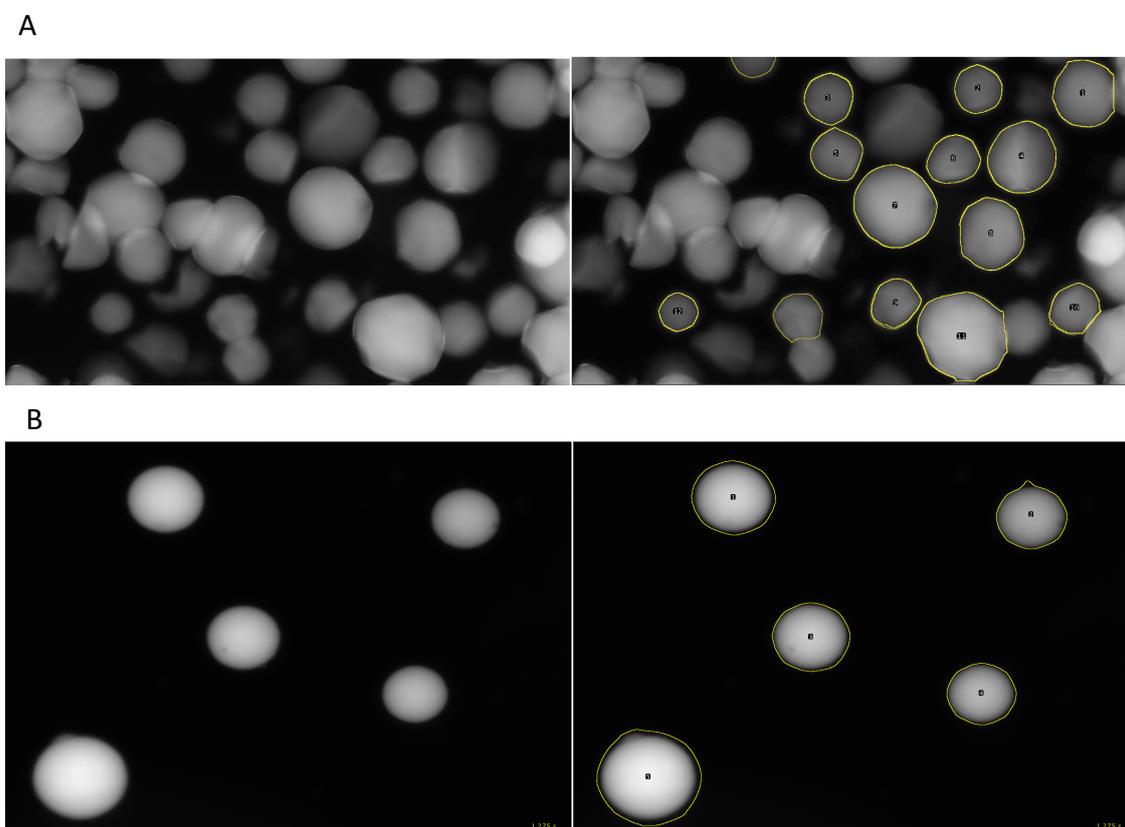


Figura 4. Identificación de los contornos a partir de la imagen original para el sistema 1 de reducción de NAD^+ (A) y el sistema 2 de oxidación de NADPH (B)

Una vez obtenidos todos los contornos que definen cada una de las partículas a estudio, el código segmentará y guardará cada una de las partículas como una imagen individual tipo TIFF (manteniendo el mismo contorno para todos sus “frames” temporales), como se puede apreciar en la Figura 5. Esto permitirá desarrollar posteriores análisis a nivel de partícula simple usando las imágenes de cada ROI aislado.

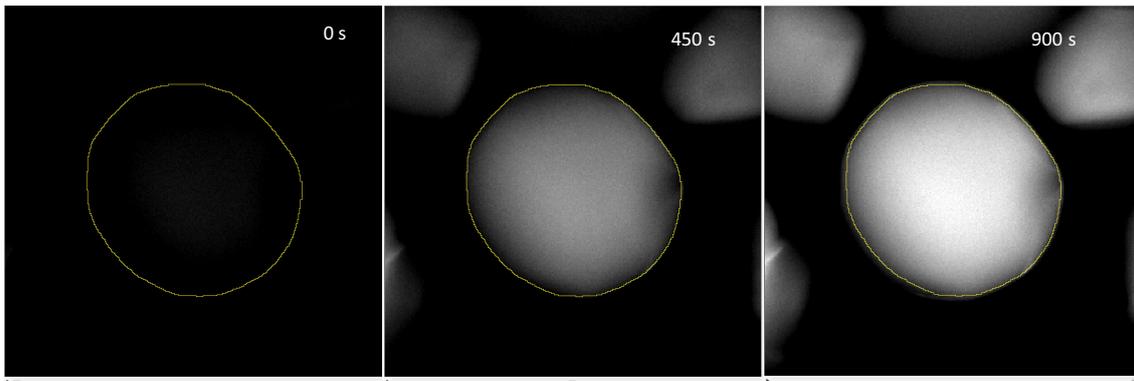


Figura 5. Partícula aislada del sistema 1 de reducción de NAD^+ con su contorno asociado (ROI) a diferentes instantes temporales.

3.2.3 Obtención de gráficas de evolución temporal de intensidad

En este trabajo se obtuvieron dos tipos de gráficas de la evolución temporal de intensidad de fluorescencia. Las primeras corresponden a la intensidad total de cada partícula, que permiten comparar la actividad enzimática en partículas de diferente tamaño. Las otras gráficas corresponden a la intensidad en diferentes puntos dentro de cada partícula, las cuales permiten conocer cómo varía la actividad enzimática en diferentes zonas del interior de una misma partícula (resolución espacial dentro de una partícula).

3.2.3.1 Gráficas generales para cada partícula: Código gráficas de partícula

Lo que nos permite este nuevo código de Image J es obtener la suma de las intensidades de fluorescencia de todos los píxeles que se encuentren dentro del contorno (ROI) de cada partícula individual. Ya que este análisis se hace con cada uno de los “frames” temporales del mismo ROI, podremos graficar la evolución temporal de la fluorescencia total dentro de la partícula, donde cada punto de la gráfica corresponde a un “frame” o instante temporal (Figura 6). Esto nos permitirá comparar el aumento o decaimiento de la fluorescencia respecto al tiempo, que no es otra cosa que la actividad enzimática en cada una de las partículas aisladas. Con las gráficas obtenidas a partir de este primer código será posible obtener y comparar la actividad enzimática de partículas de diferente tamaño para cada uno de los sistemas analizados, y por tanto comprender el efecto que tiene el tamaño de la partícula en sus diferentes parámetros cinéticos.

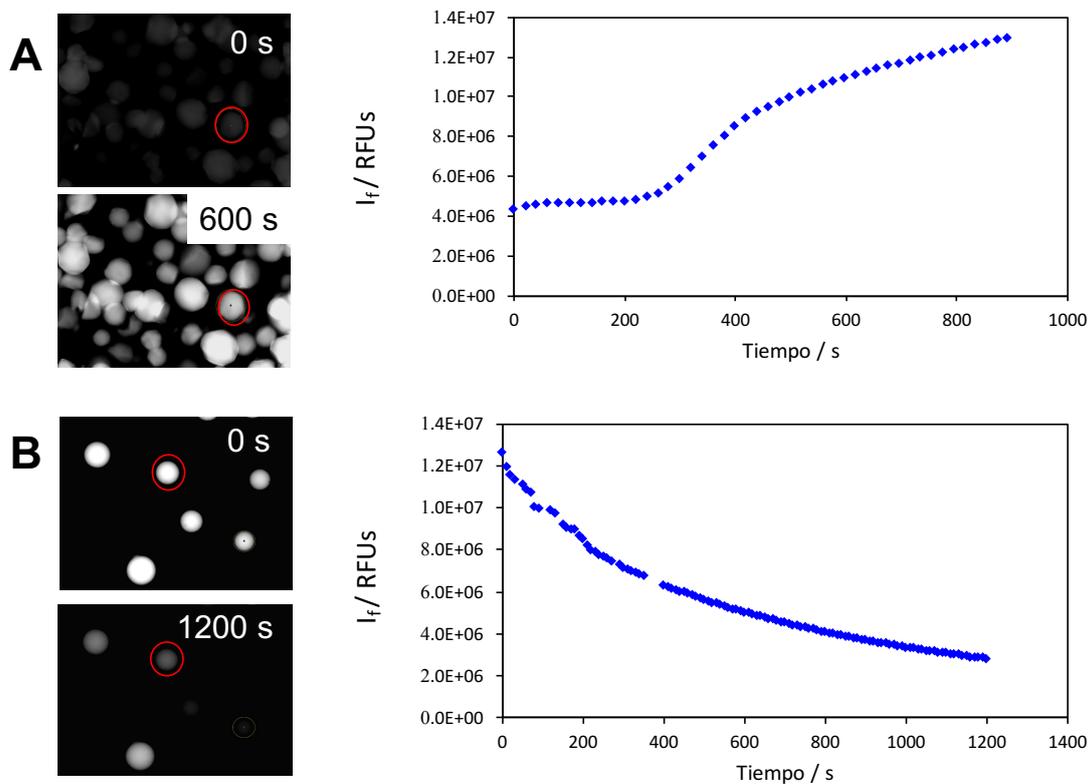


Figura 6. Evolución temporal de la intensidad total de fluorescencia dentro de dos partículas del sistema 1 de reducción de NAD^+ (A) y el sistema 2 de oxidación de NADPH (B), donde cada punto de la gráfica corresponde a un instante o "frame" temporal.

3.2.3.2 Gráficas para cada píxel dentro de una misma partícula: Código gráficas intra-particular

Con el objetivo de ganar en resolución espacial en los análisis, hemos desarrollado otro código más avanzado que nos permite crear las gráficas de intensidad de fluorescencia frente al tiempo para cada píxel dentro de una misma partícula. Esto permitirá analizar a nivel intra-particular la evolución de la fluorescencia frente al tiempo (es decir la actividad enzimática), pudiendo así determinar diferencias entre las distintas zonas del interior de una misma partícula.

De este modo, esta nueva versión del código obtiene los valores de intensidad de un píxel determinado a lo largo del tiempo. Estas gráficas serán similares a las obtenidas anteriormente para cada una de las partículas individuales, solo que ahora se podrán obtener numerosas gráficas (una por cada píxel), para una misma partícula. Por tanto, esto permitirá comparar cómo varía la actividad enzimática (a través de la evolución de la fluorescencia con el tiempo) no solo a nivel de partícula simple, sino a nivel de intrapartícula.

3.2.3.3 Tipo de gráficas empleadas

Aquellas gráficas en las que la intensidad de fluorescencia disminuía con el tiempo (decaimiento de fluorescencia), encontramos problemas a la hora de ajustar sus parámetros cinéticos mediante el uso de un código de MATLAB específico (PCAT) que será descrito más en detalle en la sección 3.4 de este trabajo. Para solucionar este problema, se decidió invertir los valores de fluorescencia para convertir las gráficas de decaimiento de fluorescencia frente al tiempo en gráficas crecientes similares a aquellas en que las imágenes experimentales de microscopía

ofrecían un aumento de la fluorescencia frente al tiempo. El aumento o la bajada de la fluorescencia, como se comentó al principio de esta sección experimental, depende de la reacción enzimática. Simplemente como recordatorio, cuando la enzima lleva a cabo una reacción de reducción del cofactor (NAD^+) dentro de la partícula, la intensidad de fluorescencia de estas aumentaba, mientras que cuando la reacción era de oxidación del cofactor (NADH) la intensidad de fluorescencia disminuía con el tiempo. Fue en este último sistema en que se tuvo que invertir la gráfica de evolución de intensidad de fluorescencia con el tiempo, obteniendo así en cualquier caso gráficas exponenciales crecientes que pueden ser ajustadas correctamente.

3.3 Corrección de gráficas iniciales

En este apartado se explicarán las diferentes modificaciones que se realizarán sobre las gráficas obtenidas anteriormente para que puedan ser correctamente ajustadas por la herramienta PCAT. Inicialmente se realizará un refinamiento de las gráficas para que puedan ser correctamente ajustadas, y posteriormente se realizará una normalización que permita que los resultados de las diferentes partículas sean comparables entre sí al tener un significado físico.

3.3.1 Refinado de gráficas

Este primer proceso se refiere a las modificaciones realizadas en las gráficas crudas obtenidas en la sección anterior 3.2 para que su morfología facilite el ajuste posterior evitando errores en el cálculo de los diferentes parámetros cinéticos.

3.3.1.1 Descarte de fase latencia inicial

Se hará un tratamiento especial a aquellos datos que provengan de reacciones donde los valores de fluorescencia aumenten con el tiempo después de una fase de latencia previa a la reacción. Esta fase de latencia o “lag” corresponde al tiempo en el que el sustrato accede a la fase porosa para encontrarse con el enzima y el cofactor. Una vez se encuentran la enzima, el cofactor y el sustrato la reacción se ajusta a una cinética exponencial en estado estacionario siguiendo un comportamiento de Michaelis-Menten. Por tanto, a la hora de obtener los parámetros cinéticos de la reacción se deberá eliminar esta fase de latencia inicial.

Para conseguir esto se desarrolló un procedimiento de análisis completo, con el objetivo de obtener gráficas que representen el cambio de intensidad de fluorescencia frente al tiempo solamente en la fase exponencial. Este procedimiento consta de los siguientes tres pasos:

1. **Restar el valor inicial.** El primer paso sería restar el valor inicial de intensidad en todos los valores temporales de intensidad. Esto permite que no se tenga en cuenta la intensidad de fluorescencia inicial a la hora de obtener los parámetros cinéticos, si no únicamente el incremento producido por la actividad de la enzima unida al cofactor.
2. **Establecer inicio de fase exponencial.** El punto de inicio de la fase exponencial se ha establecido como valor estándar el tiempo donde la intensidad supera el 15% de su intensidad máxima. Por tanto, todos los tiempos cuyos valores sean inferiores a este umbral serán eliminados de la gráfica.
3. **Inicio de gráficas en origen de coordenadas.** El último paso sería establecer como tiempo 0 el que corresponda al primer valor que supere el umbral del 15% de intensidad máxima (inicio a $X=0$). Y posteriormente se vuelve a restar dicho valor inicial a todos los puntos (inicio $Y=0$).

Ahora todas las gráficas de intensidad corresponden exclusivamente a la parte exponencial de la reacción enzimática y comienzan en el origen de coordenadas (Figura 7)

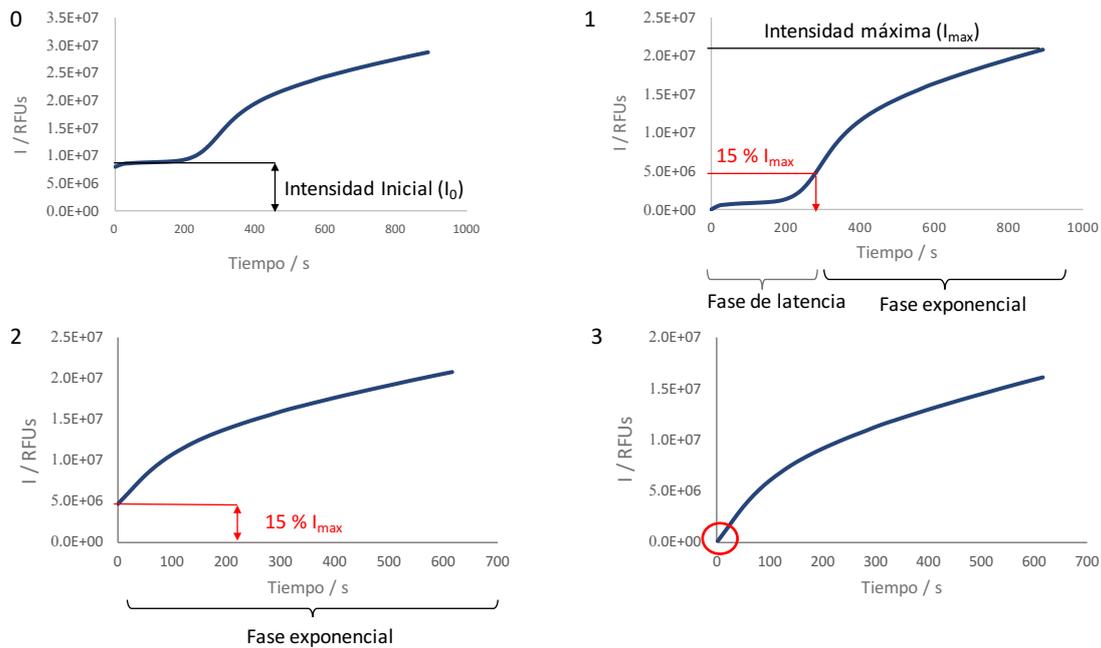


Figura 7. Esquema del procedimiento para descartar la fase de latencia inicial de un curso enzimático de reacción.

3.3.1.2 Descarte de valores atípicos

Debido a que los valores que se utilizan provienen de imágenes de microscopio, estas pueden haber sufrido variaciones debido a errores durante su medición. En algunos casos se encuentran valores muy altos, debido principalmente a entradas fortuitas de luz en la cámara del microscopio lo que afecta de manera transitoria a las mediciones de la intensidad total para algunos “frames” concretos. Todos estos puntos son considerados como valores atípicos y han sido eliminados del análisis con el objetivo de obtener una curva lo más regular posible que permita un mejor ajuste. Esto es posible gracias al gran número de puntos experimentales que tienen cada una de las medidas de curso de reacción.

Como ya se ha dicho, en la mayoría de casos estas entradas de luz son momentáneas y corresponden a “frames” temporales determinados dentro de una imagen, y por tanto han podido ser fácilmente identificados y eliminados. Sin embargo, en otras ocasiones las entradas de luz no han sido momentáneas, sino que se han mantenido en el tiempo y han afectado al resto de puntos posteriores. Para este tipo de errores se ha seguido el siguiente procedimiento:

1. Se identifican y eliminan el intervalo de puntos donde se produce la entrada de luz en el microscopio. Este intervalo de puntos es fácilmente reconocible ya que la intensidad en esos puntos aumenta de forma anormal al resto de la gráfica.
2. Restar el incremento de intensidad en todos los puntos posteriores provocado por la entrada de luz mantenida en el tiempo. Dicho incremento se ha calculado restando el valor final al valor inicial del intervalo obtenido en el paso previo.
3. Unión de los dos segmentos de la gráfica para mantener su continuidad.

Una vez realizado el procedimiento, se consigue eliminar el error provocado por la entrada de luz en el microscopio obteniéndose una gráfica exponencial que permita un buen ajuste (Figura 8)

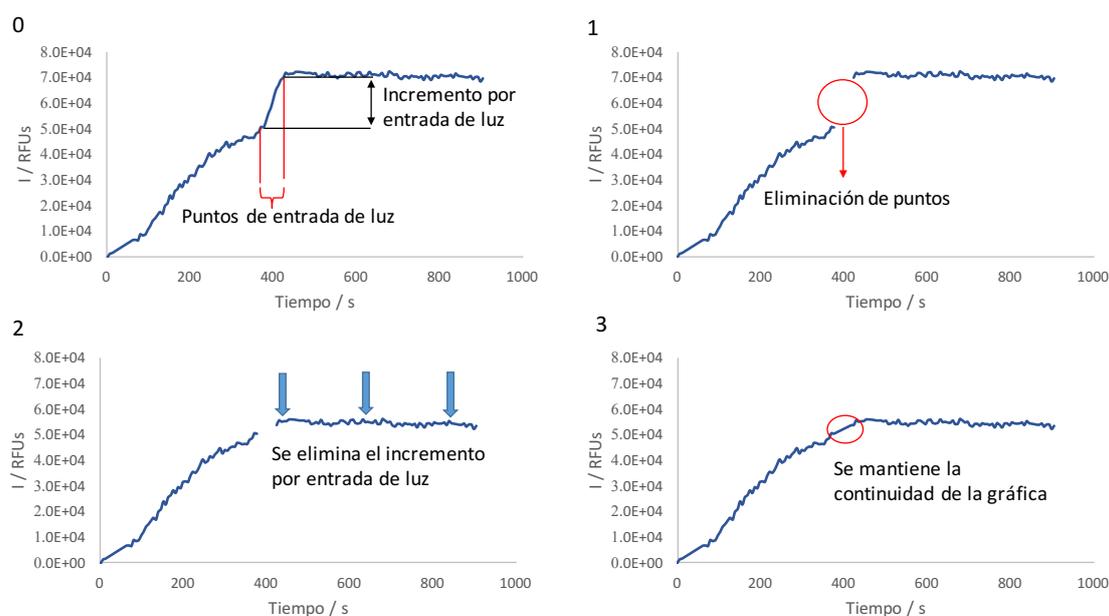


Figura 8. Procedimiento para corregir gráficas en cuya imagen de microscopio se hayan producido entradas de luz mantenidas en el tiempo

3.3.2 Normalización: Conversión a intensidad volumétrica

Esta corrección es una de las más significativas, ya que hasta ahora se ha considerado la intensidad de fluorescencia total tanto a nivel de partícula simple como a nivel de píxel intraparticular. Sin embargo, debido a que las medidas experimentales se realizaron con un microscopio de epifluorescencia no confocal, el valor de las medidas no corresponde a un plano bidimensional, sino a la superposición de planos en el eje z. Dependiendo de la posición del píxel en cada zona de la partícula, el apilamiento de planos, y por tanto la señal de fluorescencia, puede ser mayor o menor. Por esto el píxel del centro de la partícula, donde un número mayor de planos están apilados, muestra una intensidad de fluorescencia mayor que aquellos píxeles más exteriores donde se apilan menos planos. Por tanto se genera un error en el análisis relativo debido a que los valores obtenidos para cada píxel no corresponden a aquellos que se encuentran en un mismo plano axial (perpendicular al haz del microscopio), sino que para cada píxel se suman todos los valores de los píxeles a lo largo del eje perpendicular al plano axial de la partícula. Es decir, que el valor que debería corresponder a un único píxel es en realidad la suma de todos los píxeles situados por encima y debajo siguiendo la dirección del eje del haz del microscopio (Figura 9).

Por tanto, no se puede relacionar la intensidad de fluorescencia de cada píxel con la concentración de cofactor, porque los diferentes píxeles corresponden a volúmenes diferentes dependiendo de su posición en la partícula. Sin embargo, si dividimos los valores de intensidad de fluorescencia entre el volumen que realmente está midiendo el microscopio obtendríamos una medida de intensidad volumétrica que sería equivalente a la concentración del cofactor

dentro de la partícula. A estos valores corregidos de intensidad, se les llama intensidad volumétrica y presentan unas unidades de RFUs x μm^{-3} . Antes de obtener los parámetros cinéticos a partir de una curva de intensidad de fluorescencia frente al tiempo, se debe calcular la intensidad volumétrica, bien para cada partícula o bien para cada píxel dependiendo de la resolución del análisis de imagen. Y una vez divididos los valores de intensidad de fluorescencia entre el volumen correspondiente para cada uno de los tiempos de análisis, ahora se puede decir que estamos graficando un valor que representa la variación de la concentración de cofactor frente al tiempo. En estas condiciones, los datos están listos para ser usados en el código que nos permitirá calcular los parámetros cinéticos aparentes de las enzimas inmovilizadas. A continuación se detalla la metodología precisa para lograr esta corrección volumétrica tanto a nivel de partícula como a nivel de píxel.

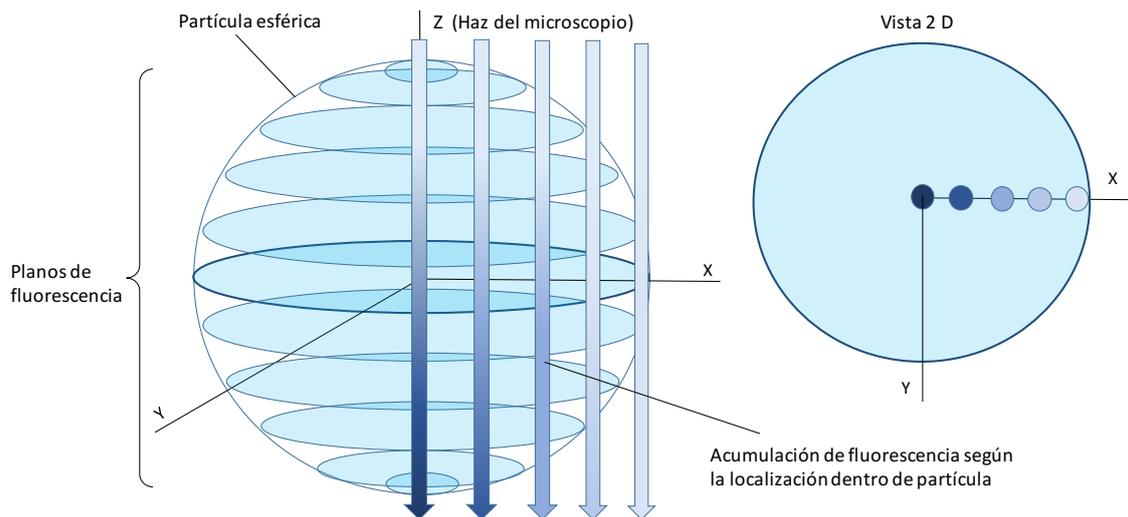


Figura 9. Acumulación de fluorescencia medida por el microscopio en diferentes píxeles del interior de la partícula

3.3.2.1 Intensidad de fluorescencia total de una partícula

Como se ha dicho anteriormente, una primera opción del tratamiento de la imagen permitía medir la intensidad de fluorescencia total de una partícula (sección 3.2.3.1) sumando los valores de todos los píxeles dentro del contorno seleccionado (ROI). Por tanto, la unidad de volumen que se debe tener en cuenta para obtener su intensidad volumétrica será el volumen de la propia partícula a analizar (Ecuación 1). Para simplificar su cálculo las partículas se han aproximado a una morfología esférica, y su volumen se ha calculado mediante su radio promedio (Ecuación 2). Esto ha permitido comparar de forma realista las intensidades volumétricas obtenidas en partículas de diferente radio.

$$\text{Intensidad Volumétrica Partícula [RFUs x } \mu\text{m}^{-3}] = \frac{\text{Intensidad Total Partícula [RFUs]}}{\text{Volumen de partícula [}\mu\text{m}^3\text{]}}$$

Ecuación 1

$$\text{Volumen de partícula [}\mu\text{m}^3\text{]} = \frac{4}{3} \pi \times r_p^3$$

Ecuación 2

Donde r_p es el radio promedio de la partícula.

3.3.2.2 Intensidad de fluorescencia para cada píxel dentro de una partícula

Para el caso en el que se quiere obtener la intensidad volumétrica de un único píxel dentro de una partícula, la intensidad de fluorescencia de cada píxel medida de acuerdo a la sección 3.2.3.2 se debe corregir por el volumen correspondiente a la suma de de todos los píxeles que se encuentren en el mismo eje perpendicular al plano axial (Ecuación 3). Es decir, el volumen corresponde a un prisma cuya área corresponde a la de un píxel y cuya longitud sea dos veces la altura vertical desde el radio hasta el perímetro de la esfera (Figura 10, Ecuación 4). Por tanto, será necesario obtener la distancia de cada píxel hasta el centro de la partícula, y con la ecuación de la circunferencia se obtendrá su altura.

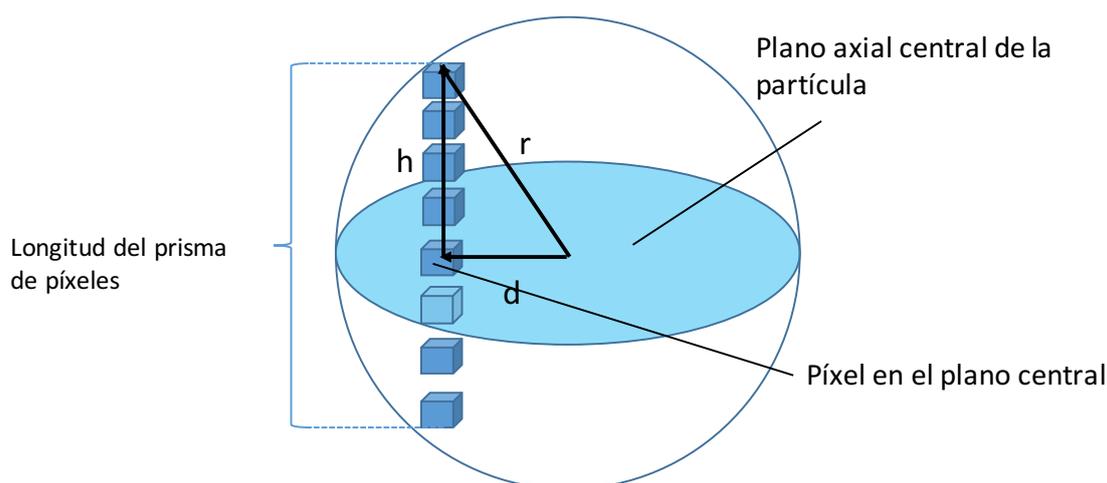


Figura 10. Esquema para obtener la unidad de volumen para cada píxel intraparticular

$$\text{Intensidad Volumétrica Píxel [RFUs} \times \mu\text{m}^{-3}] = \frac{\text{Intensidad Total Píxel [RFUs]}}{\text{Volumen Prisma Píxeles } [\mu\text{m}^3]}$$

Ecuación 3

$$\text{Volumen Prisma Píxeles } [\mu\text{m}^3] = \text{Área Píxel} \times \text{Longitud} = A_p \times 2h = A_p \times 2\sqrt{r^2 - d^2}$$

Ecuación 4

donde

h = altura vertical desde el plano axial central hasta el perímetro de partícula

A_p = área de 1 píxel

r = radio de partícula

d = distancia desde píxel hasta centro de partícula

3.4 Cálculo de parámetros cinéticos a partir de gráficas de intensidad

3.4.1 Introducción a la herramienta de ajuste: código PCAT

Una vez las gráficas han sido corregidas, ya hemos obtenido los valores de la evolución temporal de la intensidad volumétrica tanto a nivel de partícula simple como a nivel de píxel. Por tanto, sólo nos faltaría obtener los parámetros cinéticos que caracterizan la actividad enzimática en dichas curvas, y que nos permitirá analizar y comparar los resultados.

Con este fin se ha utilizado el artículo de Bäuerle et al.²⁶ que ha desarrollado una herramienta de análisis de curvas de cursos de reacción enzimáticos. Sus autores lo han desarrollado para el estudio de actividades enzimáticas intracelulares a nivel de célula única, y nosotros lo hemos aprovechado para estudiar la actividad de enzimas inmovilizadas en materiales porosos a nivel de partícula única. La herramienta, llamada PCAT (Progress Curve Analysis Tool), es un código de Matlab en el que a partir de gráficas de un curso de reacción enzimático como input se obtienen sus diferentes parámetros cinéticos como output. En nuestro caso, las gráficas de evolución temporal de la intensidad de fluorescencia volumétrica ya obtenidas se usarán para obtener los parámetros aparentes de velocidad máxima (V_{max}) y la concentración asociada a la velocidad media o constante de Michaelis-Menten (K_M), que caracterizarán las propiedades cinéticas de las reacciones enzimáticas estudiadas.

Para desarrollar la herramienta PCAT, los autores utilizan una solución de la ecuación de Michaelis-Menten, aproximada para una cinética enzimática dependiente del tiempo, consiguiendo relacionar diferentes parámetros cinéticos (V_{max} , K_M y $[S_0]$) con la variación temporal de la concentración de sustrato $[S]$ mediante la función de Lambert W (Ecuación 5).

$$[S](t) = K_M W \left(\frac{[S_0]}{K_M} \exp \left(\frac{-V_{max} + [S_0]}{K_M} \right) \right)$$

Ecuación 5

Dicha función Lambert W describe la relación inversa de la función $f(z) = z \times e^z$, donde z es cualquier número complejo. Mediante la herramienta PCAT, la función de Lambert W es calculada a partir de las curvas de cursos de reacción enzimáticos. Esto da como resultado que por cada gráfica de un curso de reacción enzimático el código PCAT permita calcular sus diferentes parámetros cinéticos. Como ya se explicó anteriormente en la sección 3.3.2, las gráficas de evolución temporal de la intensidad de fluorescencia de este trabajo corresponden con la evolución temporal de la concentración del cofactor. Por tanto, los diferentes parámetros que calculará PCAT se calcularán en base a la evolución en la concentración del cofactor, utilizada como curso de reacción enzimático.

3.4.2 Consideraciones iniciales de cálculo

La herramienta de ajuste PCAT posee diferentes métodos de ajuste, aunque el único que ha dado resultados razonables con el tipo de datos usados en este trabajo ha sido el ajuste analítico, donde los valores de salida de los parámetros cinéticos dependen de valores iniciales

de K_M y V_{max} , y por tanto será necesario realizar varias iteraciones con diferentes valores iniciales para luego promediar los resultados de salida y garantizar que son estadísticamente significativos. Finalmente, el número de iteraciones para obtener el resultado final se estableció como tres, y sus valores se especificarán para cada uno de los sistemas enzimáticos analizados.

Dicho ajuste analítico se obtiene mediante la aproximación de la función de Lambert W con funciones elementales, y su error máximo relativo (con respecto a resultados numéricos de alta precisión) ha sido establecido por Bäuerle et al.²⁶ como un 0.2 %. Como ya se dijo anteriormente, para facilitar el ajuste por parte de la herramienta PCAT y para obtener una mejor convergencia de los resultados en las iteraciones, en las gráficas de datos crudos obtenidas directamente del microscopio se han realizado los procedimientos de refinado de las gráficas explicados anteriormente en la sección 3.3.1. Una vez refinadas, las gráficas finales utilizadas para ser ajustadas fueron normalizadas volumétricamente como se explicó en la sección 3.3.2 para que de este modo se pudieran asociar los valores de fluorescencia con la concentración de cofactor.

3.4.3 Parámetros cinéticos estudiados

Los parámetros cinéticos aparentes que se pueden obtener mediante el método de ajuste analítico de PCAT son la concentración máxima de sustrato $[S_0]$ (que en nuestro caso se refiere a la concentración de cofactor), la velocidad máxima de reacción V_{max} y la constante de Michaelis K_M (Figura 11). Como se ha explicado anteriormente, para obtener el resultado final de cada parámetro se realizarán varias iteraciones, y por tanto el resultado final de cada parámetro será el promedio de los resultados parciales de cada iteración.

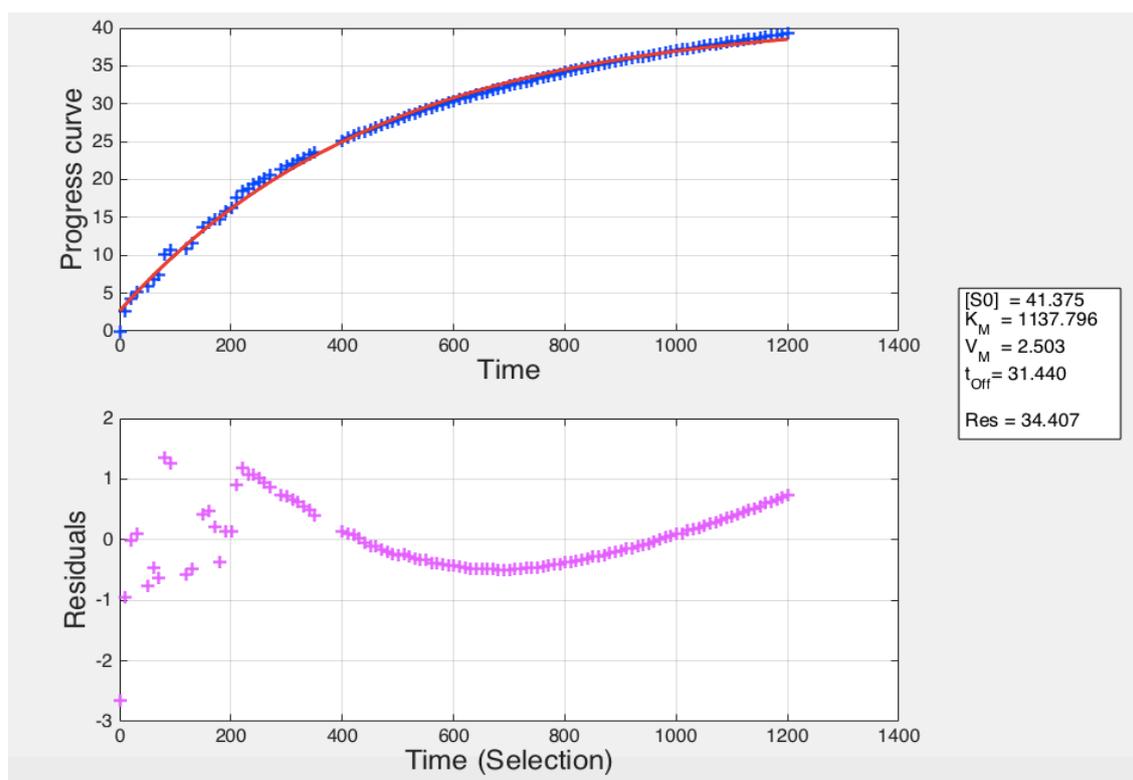


Figura 11. Resultados del código PCAT (valores de la derecha), donde la gráfica superior muestra el ajuste (línea roja) de los datos introducidos (aspas azules). En la gráfica inferior (color rosa) el código estima la bonanza del ajuste.

Adicionalmente, se ha calculado la velocidad inicial de reacción " V_0 ", aunque en este caso no se ha obtenido mediante la herramienta de ajuste PCAT. En su lugar, se han utilizado directamente las gráficas de intensidad de fluorescencia volumétrica para realizar un ajuste lineal de su pendiente. Para este ajuste lineal se han elegido únicamente aquellos valores donde la intensidad de fluorescencia volumétrica no sea superior al 20% de la concentración máxima de cofactor $[S_0]$ (que equivale a la intensidad máxima de fluorescencia) previamente calculado con el ajuste PCAT (Figura 12). El valor de $[S_0]$ utilizado será el valor promedio de las iteraciones realizadas, por lo que para cada gráfica se obtendrá un único valor de su velocidad inicial.

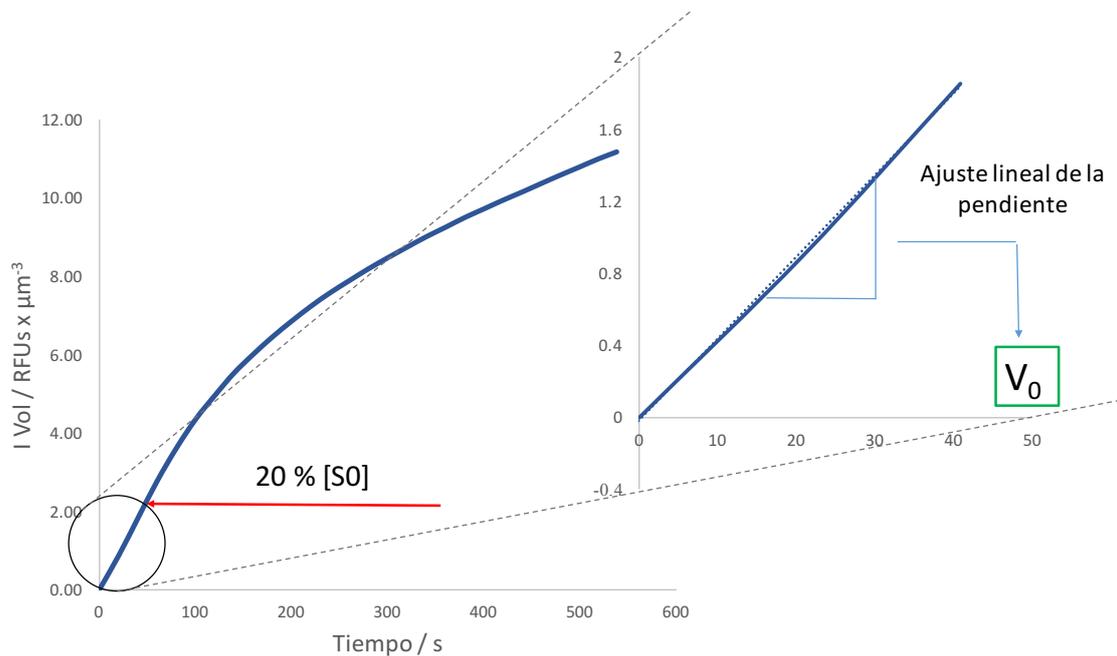


Figura 12. Obtención de la velocidad inicial V_0 a partir de las gráficas de evolución de intensidad de fluorescencia volumétrica estableciendo como corte el 20% de $[S_0]$

4 Análisis de resultados

Antes de analizar los resultados, hay que tener en cuenta que, debido al tipo de gráficas de intensidad de fluorescencia utilizadas, su utilidad es especialmente relevante en las tendencias obtenidas frente al tamaño de la partícula o su localización dentro de ella, más que en el propio valor absoluto del resultado. Es decir, la evolución de la intensidad de fluorescencia corresponde con la evolución de la concentración de cofactor, pero esto no hace que el valor nominal de ambas magnitudes sea comparable

Como ya se dijo en la sección 3.4.2, los parámetros son el promedio del resultado tras realizar tres iteraciones, por lo que se especificarán los valores iniciales de K_M y V_{max} utilizados en cada una de ellas. Para cada caso se probaron diferentes valores iniciales definiendo el valor máximo y mínimo que podía tomar la K_M inicial sin que empeorara el ajuste (lo cual se pudo comprobar fácilmente de forma gráfica en los resultados). La V_{max} inicial se fijó siempre como 100 veces menos que la K_M inicial, ya que el ajuste no permitía una ratio menor, y en su artículo Bäuerle et al.²⁶ recomendaban que esta ratio debía ser la menor posible.

4.1 Efecto del tamaño de la partícula en los parámetros cinéticos

Este análisis permite comparar la cinética de partículas con diferente tamaño. Para analizar los resultados, los parámetros obtenidos para cada partícula ($[S_0]$, V_{max} , K_M , V_0) han sido representados frente a su radio (en μm). Adicionalmente, se ha calculado el parámetro V_{max}/K_M para comprender mejor la relación entre estos dos parámetros cinéticos. Con el objetivo de estudiar la dependencia de todos los parámetros cinéticos con el tamaño de partícula, se ha añadido a cada gráfico una línea de tendencia lineal con su coeficiente de correlación R^2 , y también una barra de error que muestra la desviación estándar entre los resultados de cada iteración.

En este primer apartado los parámetros se han calculado ajustando las gráficas de intensidad de fluorescencia en una partícula, obtenidas tras realizar su normalización volumétrica según la sección 3.2.1. En cada reacción estudiada se han dado diferentes escenarios.

4.1.1 Sistema de reducción de NAD^+ a NADH con ácido fórmico y FDH co-inmovilizada

Para llevar a cabo estos experimentos a nivel de partícula singular, usamos un biocatalizador heterogéneo autosuficiente que contenía una formiato deshidrogenasa (FDH) de *Candida boidinii* co-inmovilizada con NAD^+ y una alcohol deshidrogenasa de *Thermus thermophilus*. Para llevar a cabo la reacción de reducción de NAD^+ , se disparó la reacción con ácido fórmico.

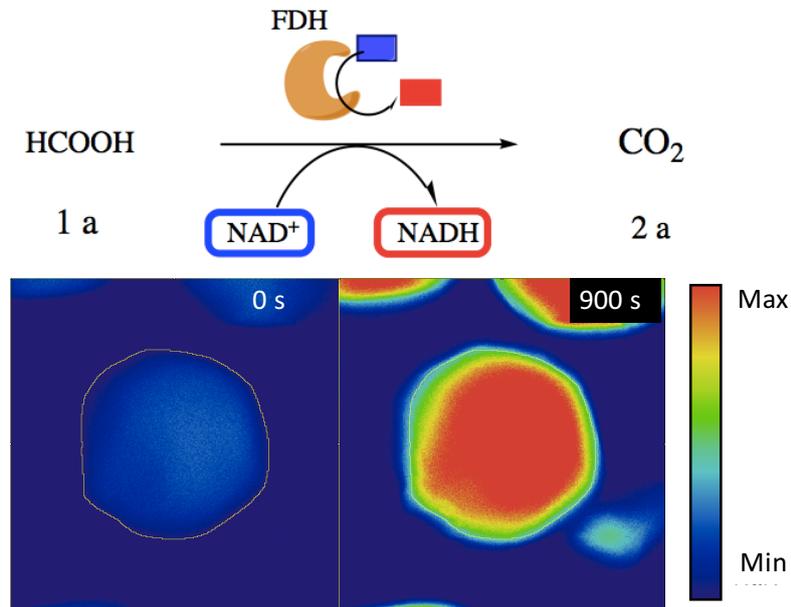


Figura 13. Arriba, reducción de NAD^+ por la formiato deshidrogenasa, transformando ácido fórmico (1a) en CO_2 (2a). Debajo, intensidad de fluorescencia del cofactor al inicio y final de la reacción

En este primer caso de estudio, se analizaron las 12 partículas presentes en la muestra de microscopía de fluorescencia. En cuanto a las condiciones del ajuste analítico que se realizó, los valores iniciales de K_M y V_{\max} para realizar las tres diferentes iteraciones fueron, respectivamente, 1 y 0.01; 10 y 0.1; 100 y 1.

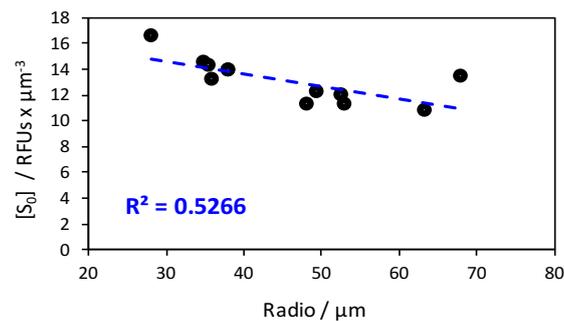


Figura 14. Concentración máxima de cofactor $[S_0]$ frente al radio de partícula para el sistema de reducción de NAD^+ con FDH y ácido fórmico

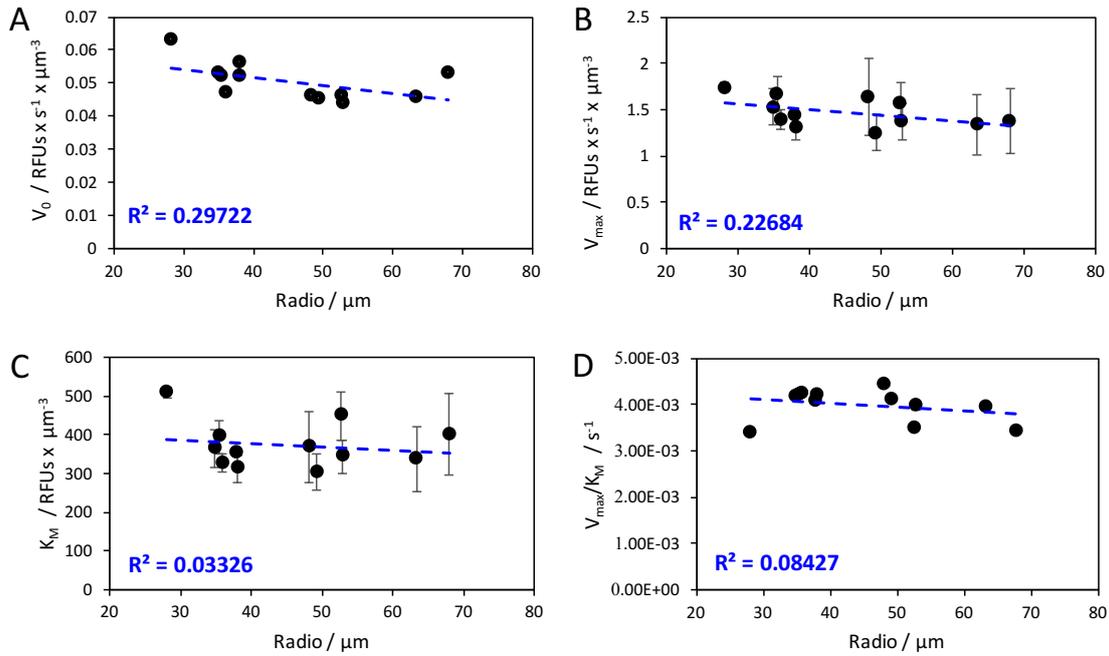


Figura 15. Diferentes parámetros cinéticos frente al radio de partícula: V_0 (A), V_{max} (B), K_M (C) y V_{max}/K_M (D) para el sistema de reducción de NAD^+ con FDH y ácido fórmico

- **Concentración máxima de cofactor ($[S_0]$).** Según la gráfica (Figura 14), parece que existe una correlación inversa entre la concentración máxima del sustrato y el radio de la partícula. Aunque el coeficiente de correlación es relativamente alto (> 0.5), no se puede asegurar que esta relación sea completamente lineal (los valores de la partícula más grande y la más pequeña se salen de la línea de tendencia general). Esto parece indicar que la inmovilización de cofactor no fue del todo homogénea, y se acumuló ligeramente más en partículas de menor tamaño. Las barras de error son despreciables, por lo cual los resultados no varían entre las diferentes iteraciones realizadas.
- **Velocidad inicial (V_0).** La tendencia que siguen los datos (Figura 15 A) es bastante similar a la que sigue la concentración máxima de sustrato, es decir, la velocidad disminuye con el tamaño de la partícula. Sin embargo, existe una mayor dispersión de los datos con respecto a la línea de tendencia, por lo que el coeficiente de correlación es mucho menor y por tanto no podemos asegurar una correlación negativa confiable, por lo que sugerimos que V_0 no depende del tamaño de partícula.
- **Velocidad máxima (V_{max}).** Para el caso de la velocidad máxima de la reacción, se puede considerar que también tiende a disminuir con el tamaño de partícula, aunque la correlación es muy baja y similar al caso de la velocidad inicial (Figura 15 B). Las barras de error muestran que la desviación estándar es considerable, especialmente en algunas de las partículas. Con estos resultados nos ocurre algo similar a lo ocurrido con la V_0 , lo que parece indicar que no hay una correlación significativa entre la V_{max} y el tamaño de partícula.
- **Constante de Michaelis-Menten (K_M).** Para este parámetro se puede asegurar que la K_M no está correlacionada con el radio de la partícula, debido a la gran dispersión de los datos (Figura 15 C) y al coeficiente de correlación lineal despreciable ($R_2 < 0.05$). En cuanto a la desviación estándar, las barras de error son muy similares a las obtenidas

para la velocidad máxima, coincidiendo en tamaño para las mismas partículas. Esto sugiere que las condiciones iniciales del ajuste afectan en igual medida tanto a la K_M como a la V_{max} .

- **Ratio V_{max}/K_M .** La gráfica (Figura 15 D) que muestra la relación entre la velocidad máxima y la K_M nos sugiere varias ideas. Como era esperable V_{max} / K_M no depende del tamaño de la partícula ya que ni V_{max} ni K_M dependía de esa misma variable. El bajo coeficiente R_2 y la alta dispersión de los puntos, manteniéndose su valor en torno a 0.004 para todas las partículas son dos indicadores fiables de la no existencia de dicha correlación. Finalmente, el hecho de que la desviación estándar sea despreciable (no se aprecian las barras de error) confirma que la relación entre la velocidad máxima y la K_M no varía entre las iteraciones.

En resumen, si bien se puede considerar que la concentración máxima de cofactor disminuye ligeramente al aumentar el tamaño de la partícula, con el resto de parámetros cinéticos no hay una verdadera correlación lineal; ni positiva, ni negativa. La ausencia de correlación entre los parámetros cinéticos y el tamaño de partícula parece indicar que el sustrato, en este caso el ácido fórmico, no sufre problemas importantes de transferencia de materia. De otro modo, si el sustrato sufriese problemas difusionales tendría más dificultades para introducirse en el interior de las micropartículas de mayor tamaño, por lo que sí existiría una correlación negativa entre los parámetros cinéticos y el tamaño de la partícula.

4.1.2 Sistema de oxidación de NADPH a NADP⁺ con trifluoroacetofenona y cetorreductasa co-inmovilizada

En estos experimentos a nivel de partícula simple usamos un biocatalizador heterogéneo autosuficiente que contenía una Cetorreductasa P1-A04 (Codexis®) co-inmovilizada con NADPH. Para llevar a cabo la reacción de reducción de NAD⁺, se disparó la reacción con 2,2',2''-trifluoroacetofenona (Figura 16)

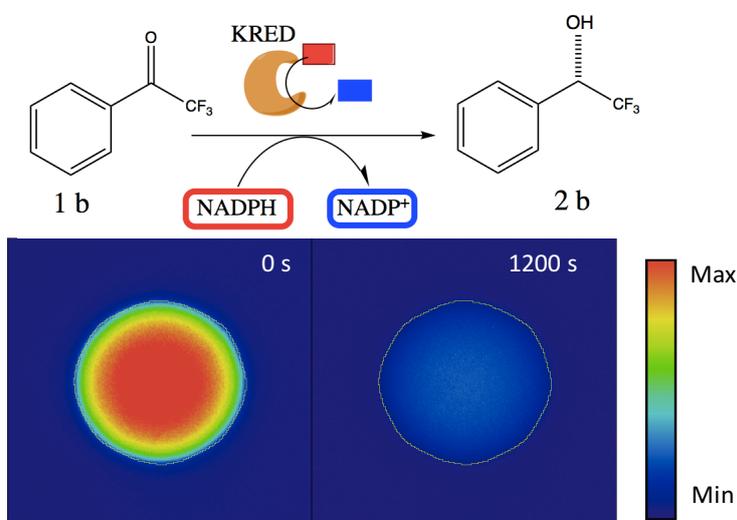


Figura 16. Arriba, oxidación de NADPH por la cetorreductasa, que transforma la 2,2,2-trifluoroacetofenona (1b) en 2,2,2-trifluoro-1-feniletanol (2b). Debajo, intensidad de fluorescencia del cofactor al inicio y final de la reacción.

Para este segundo caso de estudio se utilizaron los resultados de 5 partículas presentes en la muestra de microscopía de fluorescencia. En cuanto a las tres iteraciones realizadas en el ajuste analítico, los valores iniciales de K_M y V_{max} establecidos fueron, respectivamente: 5 y 0.05; 10 y 0.1; 30 y 0.3.

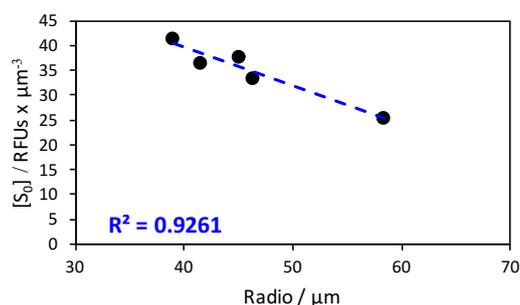


Figura 17. Concentración máxima de cofactor $[S_0]$ frente al radio de partícula para el sistema de oxidación de NADPH con cetorreductasa y 222-trifluoroacetofenona

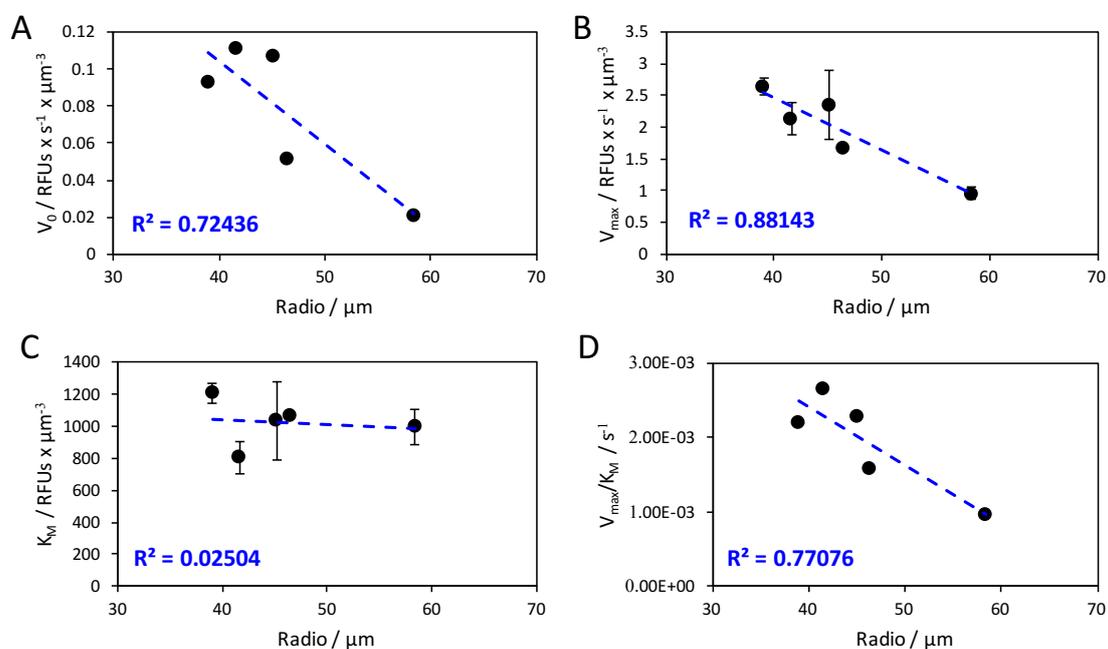


Figura 18. Diferentes parámetros cinéticos frente al radio de partícula: V_0 (A), V_{max} (B), K_M (C) y V_{max}/K_M (D) para el sistema de oxidación de NADPH con cetorreductasa y 222-trifluoroacetofenona

- Concentración máxima de cofactor ($[S_0]$).** Para esta reacción se puede observar claramente cómo la concentración máxima de cofactor disminuye con el tamaño de la partícula (Figura 17). El alto coeficiente de correlación lineal confirma que la dependencia es muy alta. Finalmente la ausencia de desviación estándar indica que el resultado no varía entre las diferentes iteraciones realizadas. Este efecto sugiere que la inmovilización del NADH en las partículas no fue homogénea acumulándose una mayor concentración en las partículas más pequeñas. Esto parece indicar que la transferencia de materia en partículas de menor radio es más efectiva que en partículas

de radios mayores. Este efecto fue mucho más dramático en partículas de radios inferiores a 50 μm .

- **Velocidad inicial (V_0).** La gráfica muestra que la velocidad inicial también disminuye al aumentar el tamaño de la partícula (Figura 18 A), aunque en este caso la correlación lineal es algo menor que en el caso de $[S_0]$. Esto indica a su vez una correlación linear positiva entre la velocidad inicial y la concentración de cofactor inmovilizada como es esperable ya que la actividad enzimática depende de la concentración de cofactor atendiendo a la ecuación de Michaelis-Menten.
- **Velocidad máxima (V_{max}).** Como era esperable, la velocidad máxima también disminuye linealmente al aumentar el radio de la partícula, siendo su correlación significativamente mayor que para el caso de la velocidad inicial (Figura 18 B). En general, las barras de error relativamente pequeñas muestran que la influencia de las iteraciones no varía demasiado el resultado final para cada partícula. Esta disminución de la V_{max} no solo podría estar atribuida a la diferente concentración inicial del cofactor inmovilizado en cada partícula, sino a la heterogeneidad en la carga enzimática de cada partícula. Al igual que los cofactores se concentran más o menos en partículas más o menos pequeñas, la enzima podría sufrir un efecto similar. Sin embargo, esto no lo pudimos corroborar debido a que técnicamente no pudimos cuantificar la concentración de enzima en cada partícula. En futuros estudios, llevaremos a cabo el marcaje de los enzimas con un fluoróforo y su posterior análisis en experimentos de partícula simple, midiendo la fluorescencia en dos canales, uno para el cofactor NADH y otro para detectar el fluoróforo unido al enzima y así determinar la concentración de enzima por partícula.
- **Constante de Michaelis-Menten (K_M).** Se puede observar (Figura 18 C) que la dependencia entre la K_M y el tamaño de la partícula es nula (el coeficiente de correlación lineal es muy bajo y la línea de tendencia es prácticamente horizontal). En cuanto a las desviaciones estándar, las barras de errores son relativamente bajas en casi todos los casos, y tienden a coincidir con las de la velocidad máxima (las variaciones en las condiciones iniciales afectan de igual manera a ambos parámetros en cada partícula). Este resultado es muy interesante porque indica que la capacidad de saturación no se ve afectada ni por la concentración inicial de cofactor inmovilizado ni por el tamaño de partícula. Lo que sugiere que el efecto observado en V_{max} y en V_0 es un efecto asociado a la difusión de los sustratos al centro activo de los enzimas.
- **Ratio V_{max}/K_M .** Para este caso sí que existe una correlación entre el tamaño de la partícula y la relación V_{max}/K_M (Figura 18 D). Se puede observar cómo al aumentar el radio de la partícula V_{max} disminuye con respecto a K_M , lo cual resulta lógico ya que mientras que la velocidad máxima disminuye con el radio la K_M se mantiene prácticamente estable. Finalmente, la desviación estándar despreciable muestra que nuevamente la relación V_{max}/K_M en cada partícula es la misma independientemente de la iteración realizada.

En resumen, tanto la concentración máxima de sustrato, la velocidad inicial, la velocidad máxima y la ratio V_{max}/K_M disminuyen con el radio de la partícula de forma lineal. La concentración asociada a la velocidad media K_M , en cambio, se mantiene en unos valores relativamente constantes independientemente del tamaño de la partícula. El efecto del tamaño de partícula

en las velocidades parece sugerir que este sistema está sujeto a restricciones difusionales del sustrato (cetonas proquirales como es el caso de la trifluoroacetofenona) hacia el interior de los poros del soporte. Si bien, no se puede descartar que las diferencias en velocidades se deban también a la heterogeneidad entre partículas en cuanto a la concentración de la enzima inmovilizada.

4.1.3 Sistema de oxidación de NADH a NAD⁺ usando dos sustratos carbonílicos diferentes y alcohol deshidrogenasa co-inmovilizada.

Los experimentos a nivel de partícula simple fueron realizados a partir de un biocatalizador fabricado en el laboratorio para este trabajo, que contenía Alcohol deshidrogenasa de *Bacillus stearothermophilus* co-inmovilizada con NADH. Como ya se ha explicado en la sección de Metodología experimental, para este sistema se realizaron dos reacciones diferentes, una disparada con acetona y otra con benzaldehído como sustratos (Figuras 19 y 23). Con este planteamiento experimental, perseguimos entender si dos sustratos con propiedades físico-químicas diferentes presentan un comportamiento difusional diferente que afecta a las constantes cinéticas de las enzimas inmovilizadas y así entender si estos efectos dependen del tamaño de partícula. Para ambas reacciones los resultados se obtuvieron a partir del análisis de los cursos de reacción de 16 partículas diferentes observadas mediante microscopía de fluorescencia con los parámetros descritos previamente en este trabajo.

4.1.3.1 Con acetona como sustrato

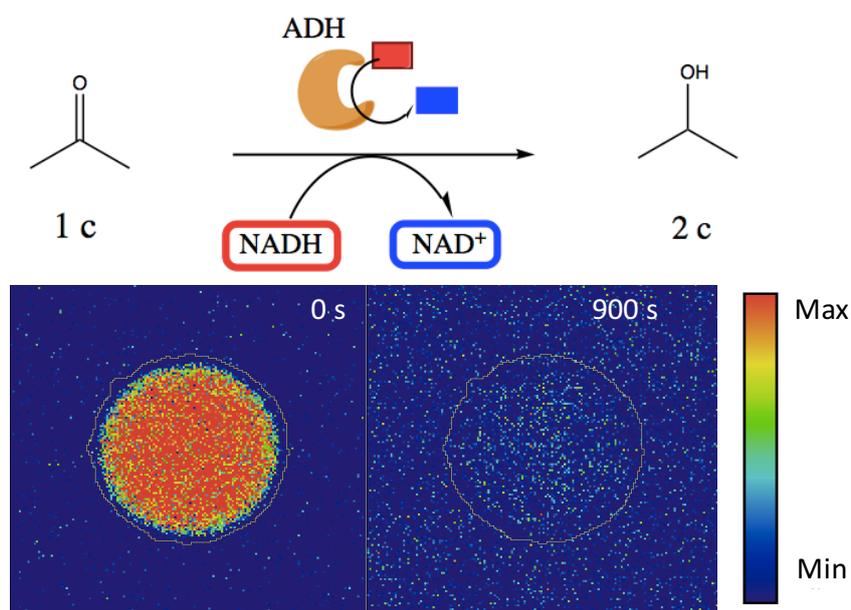


Figura 19. Arriba, oxidación de NADH por la alcohol deshidrogenasa, que transforma la acetona (1c) en isopropanol (2c). Debajo, intensidad de fluorescencia del cofactor al inicio y final de la reacción.

En las tres iteraciones realizadas en el ajuste analítico, los valores iniciales de K_M y V_{max} establecidos fueron, respectivamente: 1 y 0.01; 0.5 y 0.005; 0.1 y 0.001.

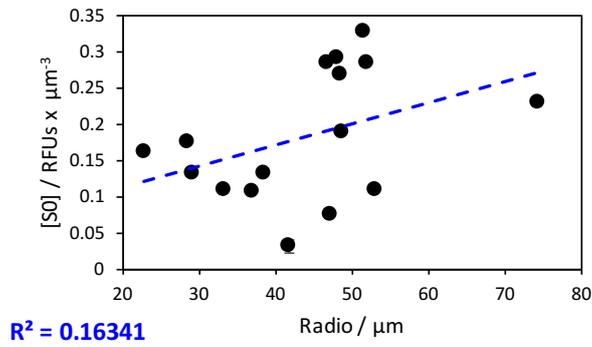


Figura 20. Concentración máxima de cofactor $[S_0]$ frente al radio de partícula para el sistema de oxidación de NADH con FDH y acetona

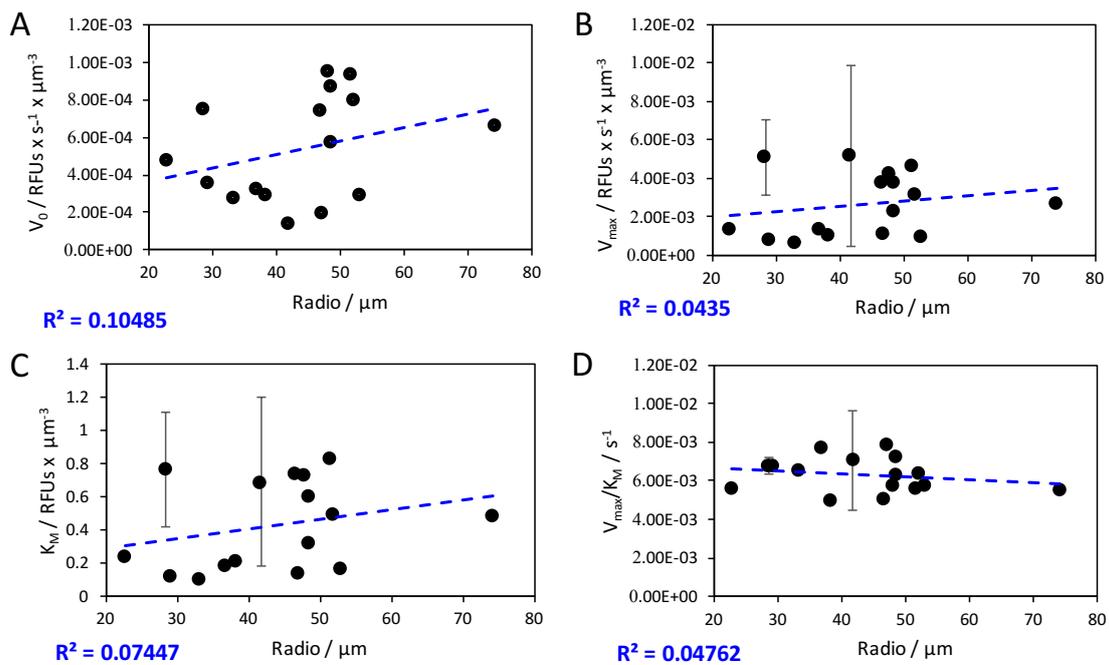


Figura 21. Diferentes parámetros cinéticos frente al radio de partícula: V_0 (A), V_{max} (B), K_M (C) y V_{max}/K_M (D) para el sistema de oxidación de NADH con ADH y acetona

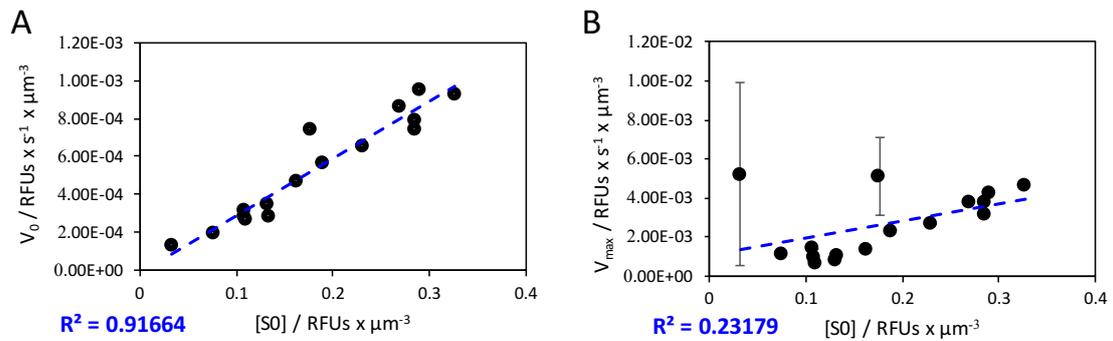


Figura 22. Velocidad inicial (A) y velocidad máxima (B) frente a la concentración máxima de cofactor $[S_0]$ para el sistema de oxidación de NADH con ADH y acetona

Para esta reacción no se puede considerar que exista ninguna dependencia lineal de los diferentes parámetros con el radio de la partícula, debido a la gran dispersión de los puntos y los coeficientes de correlación lineal muy reducidos (Figuras 20, 21). Sin embargo, sí que se puede apreciar que tanto la velocidad inicial V_0 , y en menor medida la velocidad máxima V_{max} , correlacionan bastante positivamente con la concentración de cofactor inmovilizado (Figura 22), lo que sí que es esperable atendiendo a la ecuación de Michaelis-Menten.

- Se puede destacar que las tendencias de la **concentración máxima de cofactor $[S_0]$** (Figura 21) y la **velocidad inicial V_0** (Figura 22 A) son relativamente similares, y aunque los puntos estén muy dispersos sus líneas de tendencia indican que sus valores parecen crecer ligeramente al aumentar el radio de la partícula, aunque el coeficiente de correlación despreciable impide que se pueda considerar como aceptable. En cuanto al cofactor, parece que aunque la inmovilización no ha sido homogénea, en este caso no se puede decir que el tamaño de la partícula haya influido en una mayor o menor concentración.
- En cuanto a la **velocidad máxima V_{max}** y la **K_M** , se encuentran similitudes en sus tendencias (Figura 22 B y C), sin poder considerarse que dependan del radio de la partícula debido a la gran dispersión de los puntos y el bajo coeficiente de correlación lineal. En general la desviación estándar en cada partícula es despreciable, exceptuando dos de ellas.
- Por último, la **relación V_{max}/K_M** tampoco muestra una dependencia lineal con el radio de la partícula, y la línea de tendencia de los puntos es prácticamente horizontal (Figura 22 D). Este resultado podría indicar que el transporte de la acetona no se ve negativamente afectado por el tamaño de partícula debido a ser una molécula muy pequeña y fácilmente difundible. Como ya se dijo, las variaciones en velocidad inicial, y en menor medida en V_{max} , correlacionan bastante positivamente con la concentración de cofactor pero no con el tamaño de partícula.

4.1.3.2 Con benzaldehído como sustrato

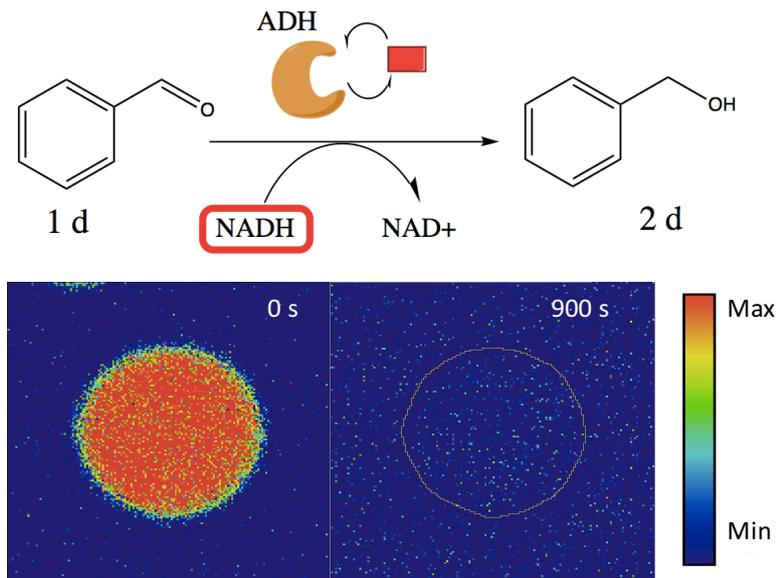


Figura 23. Arriba, oxidación de NADH por la alcohol deshidrogenasa, transformando el benzaldehído (1d) en alcohol benzílico (2d). Debajo, intensidad de fluorescencia del cofactor al inicio y final de la reacción.

Para las tres iteraciones realizadas en el ajuste analítico los valores iniciales de K_M y V_{max} establecidos fueron, respectivamente: 1 y 0.01; 0.75 y 0.0075; 0.5 y 0.005.

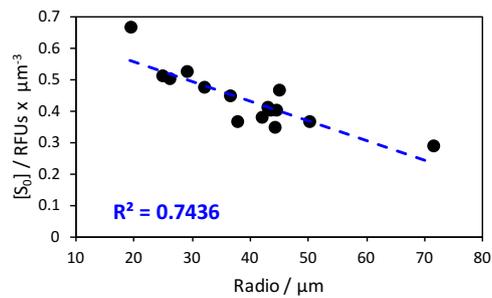


Figura 24. Concentración máxima de cofactor $[S_0]$ frente al radio de partícula para el sistema de oxidación de NADH con FDH y benzaldehído

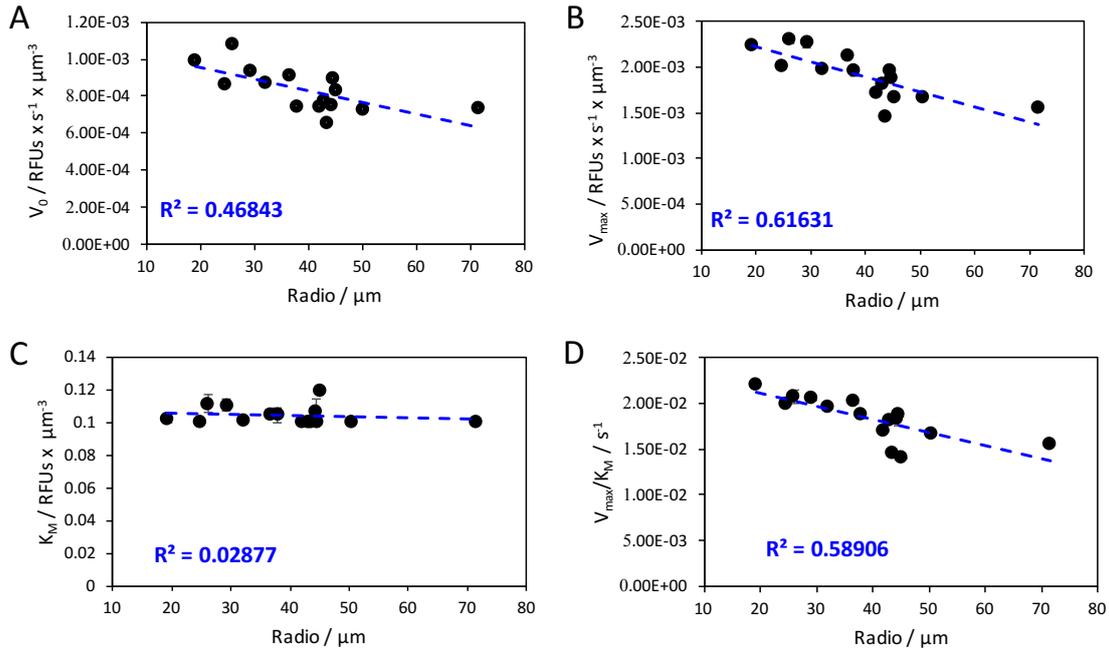


Figura 25. Diferentes parámetros cinéticos frente al radio de partícula: V_0 (A), V_{max} (B), K_M (C) y V_{max}/K_M (D) para el sistema de oxidación de NADH con ADH y benzaldehído

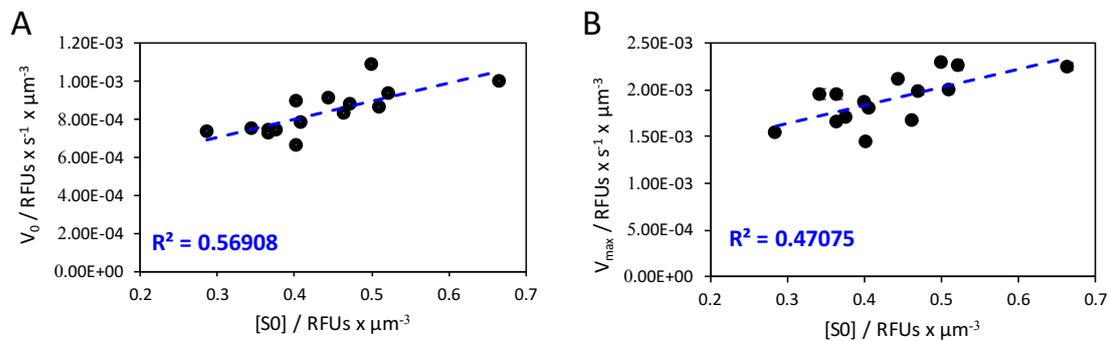


Figura 26. Velocidad inicial (A) y velocidad máxima (B) frente a la concentración máxima de cofactor $[S_0]$ para el sistema de oxidación de NADH con ADH y benzaldehído

En este caso los resultados sí que muestran una dependencia lineal de algunos parámetros con el radio de la partícula, como se puede observar en la menor dispersión de los datos y los coeficientes de correlación lineal mucho mayores que en el caso de la acetona como sustrato.

- La **concentración máxima de cofactor $[S_0]$** posee una dependencia lineal considerable con el radio de la partícula, pudiéndose observar cómo la $[S_0]$ disminuye al aumentar el radio (Figura 24). Su desviación estándar en las diferentes partículas es despreciable. Esto parece indicar que la inmovilización del cofactor sigue sin ser homogénea, aunque a diferencia de la reacción con acetona como sustrato ahora la concentración sí aumenta en las partículas de menor radio.
- Tanto la **velocidad inicial (V_0)** como la **velocidad máxima (V_{max})** también disminuyen al aumentar el radio de la partícula (Figura 25 A y B), aunque su dependencia lineal es algo menor, especialmente en el caso de la V_0 . En el caso de la V_{max} la desviación estándar es

despreciable en todas las partículas. Ambas velocidades también correlacionan linealmente con la concentración máxima de cofactor (Figura 26), al igual que ocurría en esta misma reacción con acetona como sustrato.

- La K_M no tiene ninguna dependencia con el radio de la partícula (Figura 25 C), manteniéndose muy constante para los diferentes tamaños de partícula. Su desviación estándar también es muy reducida, aunque algo superior a la de V_{max} .
- La **relación V_{max}/K_M** tiene un comportamiento muy similar al de la V_{max} , con una disminución lineal de su valor al aumentar el radio de la partícula (Figura 25 D), lo cual parece lógico ya que la K_M se mantiene muy constante para los diferentes tamaños de partícula. Por último, su desviación estándar es despreciable en las diferentes partículas.

En resumen, la última reacción de oxidación de NADH a NAD^+ usando benzaldehído como sustrato muestra una gran diferencia en los parámetros cinéticos obtenidos con relación al radio de la partícula. Mientras que en el caso de usar acetona como sustrato no se puede decir que exista una correlación lineal entre ningún parámetro y el radio de la partícula, al usar benzaldehído tanto $[S_0]$, V_0 , V_{max} y V_{max}/K_M muestran una clara dependencia lineal, disminuyendo su valor a medida que aumenta el radio de la partícula. Resultados similares fueron observados en la oxidación de NADPH a $NADP^+$ catalizada por una cetoreductasa co-inmovilizada y usando una cetona aromática. Esto indica que los sustratos aromáticos (como la trifluoroacetofenona y el benzaldehído) presentan mayores restricciones a la hora de difundir a través de las micropartículas porosas de agarosa que los sustratos más pequeños e hidrófilos como son el ácido fórmico o la acetona. Sin embargo, los resultados obtenidos para la concentración de cofactor muestran que su inmovilización no ha sido homogénea, y en algunos casos dependiente del radio de partícula. Además de esta observación existe la posibilidad de que las propias enzimas tampoco hayan sido inmovilizadas de forma homogénea en las diferentes micropartículas de cada sistema. Esto dificulta conocer la causa real en la tendencia de los parámetros con respecto al radio de la partícula, por lo que se hizo un análisis adicional que aumenta la resolución de los resultados para conocer qué es lo que realmente ocurre en el interior de cada micropartícula.

4.2 Efecto de la posición del píxel en la superficie interna de la partícula sobre los parámetros cinéticos

El análisis de imágenes de regiones de interés anterior nos dio información sobre la media de los parámetros cinéticos de enzimas que estaban inmovilizadas en el interior una única partícula porosa. Pero gracias a al potencial de este tipo de análisis podemos incluso obtener los cursos de reacción de cada píxel y por tanto los parámetros cinéticos de las enzimas inmovilizadas son de una resolución cercana a la micra cúbica. Este análisis permite estudiar la cinética en los diferentes puntos dentro de una partícula, y comprender cómo la actividad enzimática varía según la localización micrométrica dentro de ella. Para ello se han calculado los parámetros en varios puntos (píxeles) con diferente distancia al centro de la partícula (en μm), donde previamente se obtuvo la evolución temporal de intensidad de fluorescencia volumétrica.

En total, se han analizado los píxeles de tres partículas de diferente radio para cada uno de los sistemas anteriormente estudiados. Cada color muestra la evolución del parámetro cinético en el interior de una partícula de diferente tamaño, correspondiendo el rojo a la de menor radio y el negro a la de mayor radio. Este nuevo análisis permitirá conocer si existen gradientes internos en los parámetros estudiados y comparar el interior de partículas con diferente tamaño. Para cada sistema se han obtenido diferentes escenarios.

4.2.1 Sistema de reducción de NAD^+ a NADH con ácido fórmico y FDH co-inmovilizada

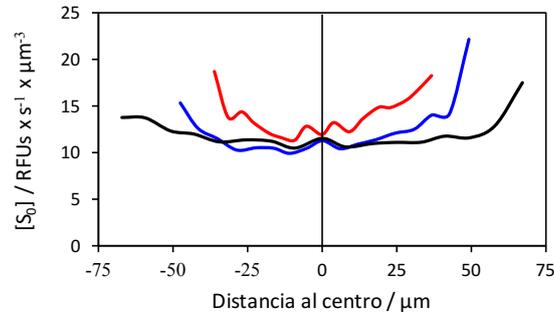


Figura 27. Concentración máxima de cofactor $[S_0]$ frente a la distancia al centro de la partícula para el sistema de reducción de NAD^+ con FDH y ácido fórmico

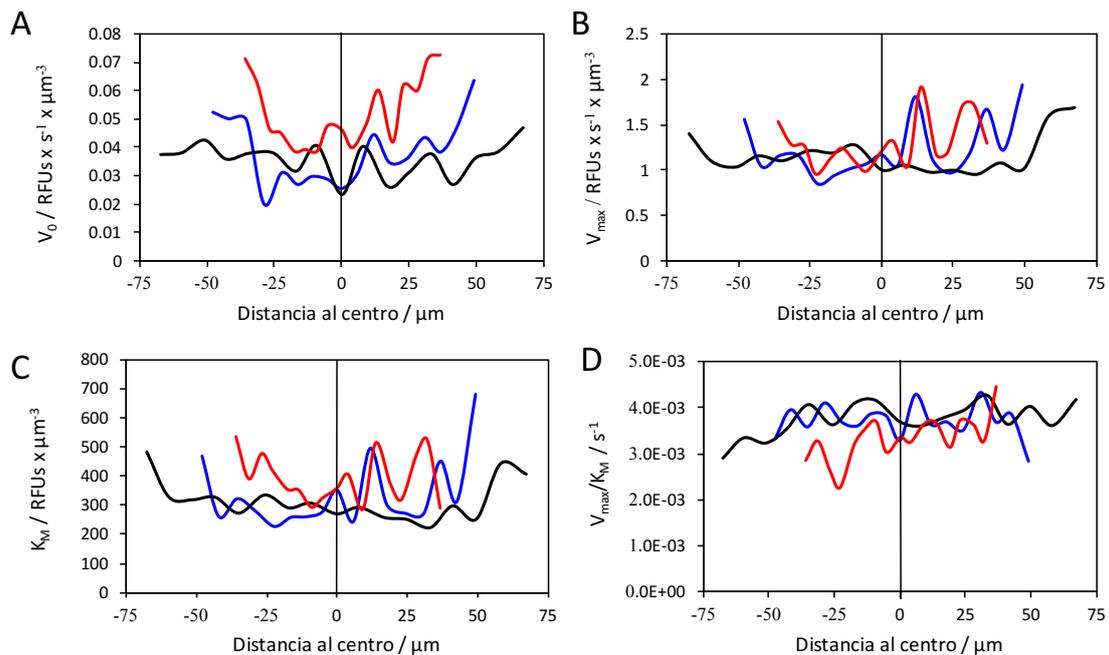


Figura 28. Diferentes parámetros cinéticos frente a la distancia al centro de la partícula: V_0 (A), V_{max} (B), K_M (C) y V_{max}/K_M (D) para el sistema de reducción de NAD^+ con FDH y ácido fórmico

En cuanto a la **concentración máxima de cofactor $[S_0]$** se puede observar (Figura 27) cómo su valor en el interior de la partícula se mantiene relativamente constante y únicamente aumenta en los puntos más alejados del centro (zona más externa de la partícula). Esto ocurre independientemente del tamaño de la partícula analizada (mismo patrón en las curvas negra,

roja y azul). Este hecho sugiere que la inmovilización del cofactor ha sido más eficiente en las zonas más externas de la partícula.

Con el **resto de parámetros** ocurre algo similar (Figura 28), aumentando su valor en las zonas más externas de la partícula, aunque las fluctuaciones entre los diferentes puntos son mucho mayores que para el caso de $[S_0]$. Es destacable la gran similitud de la evolución de V_{max} y K_M en el interior de las partículas, lo cual parece indicar una gran dependencia entre ambos parámetros. Es interesante el hecho de que en la partícula de mayor radio (color negro) las fluctuaciones son mucho menores que en las otras dos, lo cual parece sugerir que un mayor tamaño de partícula disminuye los gradientes internos para este sistema. Por último es destacable la gran proximidad de las curvas de diferentes colores, que representan partículas de diferente radio. Esto confirma la ausencia de correlación lineal entre los parámetros cinéticos y el radio de las partículas que ya se había observado en el análisis anterior del apartado 4.1.1.

4.2.2 Sistema de oxidación de NADPH a NADP⁺ con trifluoroacetofenona y cetereductasa co-inmovilizada

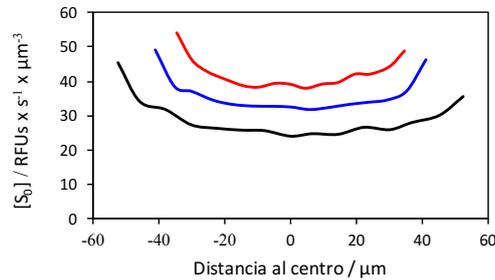


Figura 29. Concentración máxima de cofactor $[S_0]$ frente a la distancia al centro de la partícula para el sistema de oxidación de NADPH con cetereductasa y trifluoroacetofenona

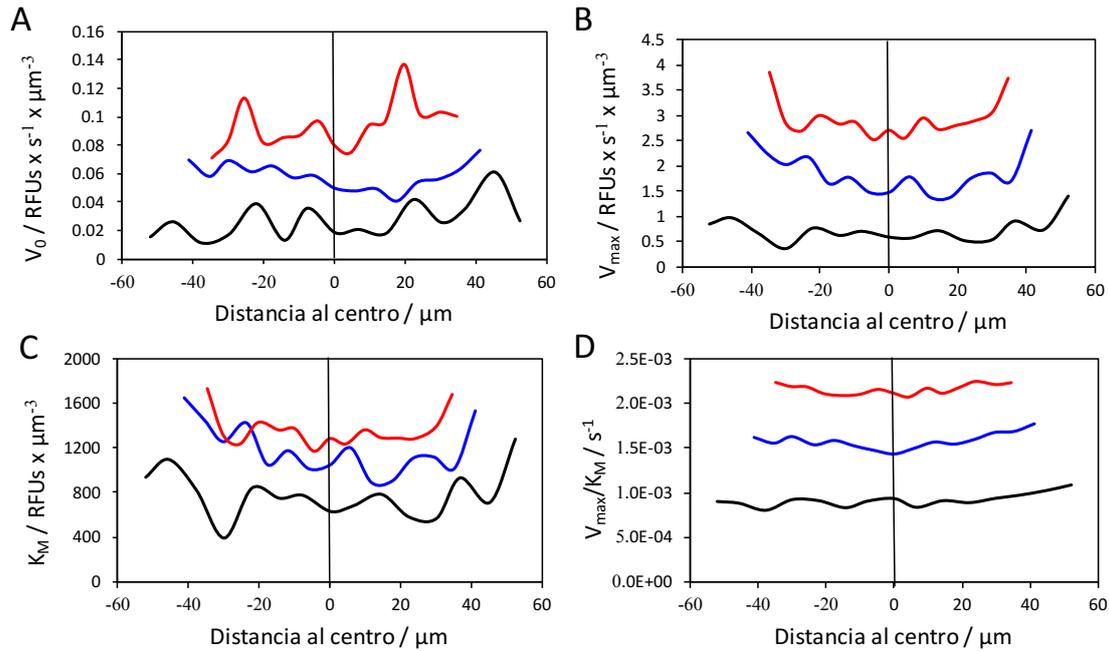


Figura 30. Diferentes parámetros cinéticos frente a la distancia al centro de la partícula: V_0 (A), V_{max} (B), K_M (C) y V_{max}/K_M (D) para el sistema de oxidación de NADPH con cetorreductasa y trifluoroacetofenona

En este sistema enzimático la **concentración máxima de cofactor $[S_0]$** también mantiene un valor constante en el interior de la partícula aumentando sólo en los puntos más alejados del centro (Figura 29), como ocurría en el apartado anterior 4.1.2. Sin embargo ahora se nota una diferencia apreciable de partícula a partícula (mayor separación entre las curvas), indicando una mayor concentración de cofactor NADPH en las partículas más pequeñas.

En cuanto a la V_{max} y K_M su valor también más o menos constante alrededor del centro de la partícula y aumentando en las zonas más alejadas (Figura 30 B y C). Además, se puede destacar la similitud entre los patrones de V_{max} y K_M , que parece indicar una dependencia entre sus valores. Para el **ratio V_{max}/K_M** lo más destacable es que su valor casi no sufre fluctuaciones (Figura 30 D), lo cual vuelve a confirmar el gran equilibrio entre los valores de V_{max} y K_M , cuya proporción se mantiene en las diferentes zonas del interior de la partícula. Todo lo anterior se cumple para todas las curvas (negra, azul y roja) lo cual sugiere que el tamaño de la partícula en este sistema no determina su comportamiento interno. Por último, en el apartado 4.1.2 para este sistema se observó una clara dependencia inversa entre el valor de los parámetros y el radio de la partícula. Esta dependencia se vuelve a confirmar en estas gráficas, ya que para todos los parámetros las curvas que muestran su evolución dentro de cada partícula se separan claramente entre sí, correspondiendo los valores más altos a la partícula más pequeña (roja) y los más bajos a la de mayor radio (negra).

4.2.3 Sistema de oxidación de NADH a NAD^+ usando dos sustratos carbonílicos diferentes y alcohol deshidrogenasa co-inmovilizada.

En los apartados anteriores (4.2.1 y 4.2.2), los parámetros fueron calculados en puntos individuales situados a diferente distancia del centro. Sin embargo, en este nuevo apartado los

parámetros se calcularon promediando el valor de todos los puntos de la partícula situados a una misma distancia del centro. Por tanto, ahora las gráficas son simétricas (Figuras 31, 32, 33 y 34), ya que el valor del parámetro en una distancia es el mismo independientemente de si nos alejamos del centro por la izquierda (distancia negativa) o por la derecha (distancia positiva). Con esta nueva metodología conseguimos una mayor fiabilidad de los valores medios, ya que para su cálculo hemos utilizado los cursos de reacción de un mayor número de píxeles que se encuentran a la misma distancia del centro. En otras palabras, los parámetros cinéticos en cada punto se han calculado promediando todos los cursos de reacción obtenidos para todos y cada uno de los píxeles que se encuentran a una misma distancia del centro. En los sistemas anteriores, el análisis intrapartícula se realizó con el curso de reacción de un solo píxel situado a una distancia determinada del centro.

4.2.3.1 Con acetona como sustrato

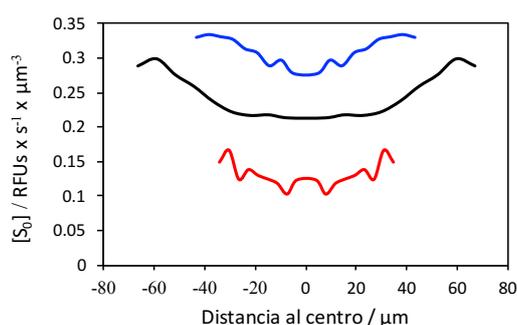


Figura 31. Concentración máxima de cofactor $[S_0]$ frente a la distancia al centro de la partícula para el sistema de oxidación de NADH con ADH y acetona

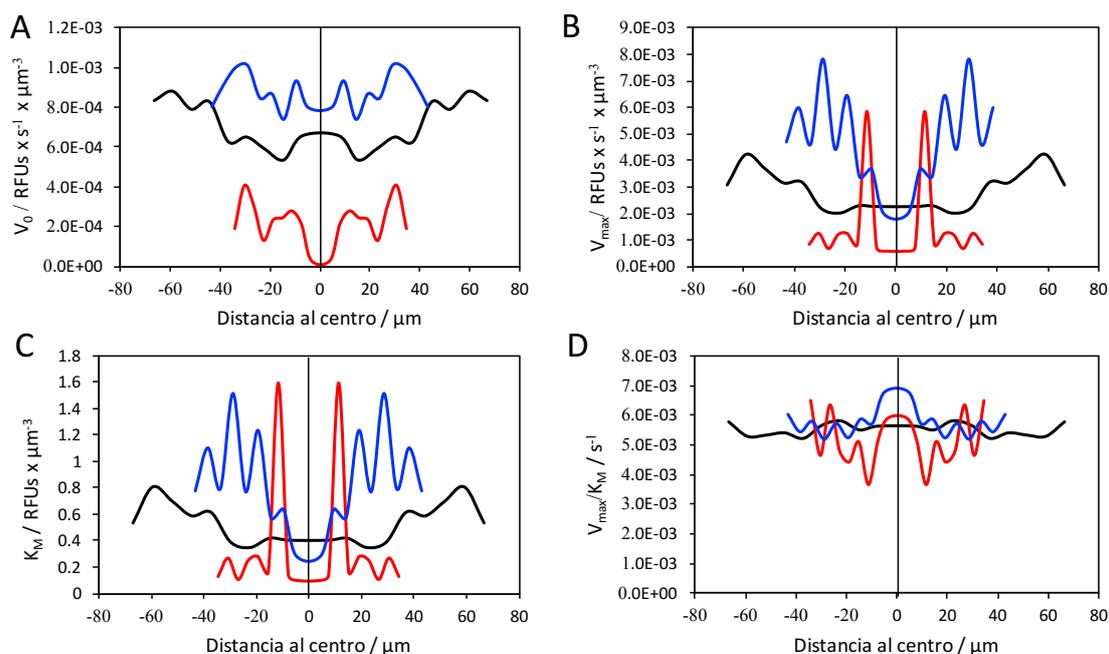


Figura 32. Diferentes parámetros cinéticos frente a la distancia al centro de la partícula: V_0 (A), V_{max} (B), K_M (C) y V_{max}/K_M (D) para el sistema de oxidación de NADH con ADH y acetona

En esta primera reacción, la evolución de la **concentración máxima de cofactor [S₀]** (Figura 31) parece ser la misma que en los sistemas anteriores (4.2.1 y 4.2.2), siendo su valor constante en las zonas más internas de la partícula y aumentando en las zonas más alejadas del centro. Sin embargo, en las partículas más pequeñas (color azul y rojo) esta tendencia es algo más irregular.

Para el resto de parámetros **V₀**, **V_{max}**, **K_M** y **ratio V_{max}/K_M**, no se puede encontrar un patrón común entre las tres partículas (Figura 32). En las dos partículas de mayor radio (negra y azul) la **V_{max}**, **V₀** y **K_M** sí parecen aumentar a medida que nos alejamos del centro de la partícula, mientras que en la partícula de menor tamaño (roja) aparecen dos picos de valores máximos de **V_{max}** y **K_M** cerca del centro. Sin embargo, en cada partícula el patrón para **V_{max}** y **K_M** es muy parecido, lo cual parece indicar que para este sistema existe una estrecha dependencia entre ambos parámetros.

En cuanto a las fluctuaciones internas de los parámetros, mientras que en la partícula de mayor tamaño (negra) su evolución es mucho más suave y clara, en las otras dos (especialmente en la roja de menor tamaño) es mucho más irregular. Esto parece indicar que las partículas pequeñas son mucho más irregulares internamente que las de mayor tamaño. Estas irregularidades pueden ser causadas debido a diferentes gradientes de difusión del sustrato, en este caso la acetona. Otra posible explicación podría ser una distribución heterogénea del cofactor a lo largo de la superficie interna de cada partícula, sobre todo de aquellas más pequeñas. Sin embargo, el perfil de **[S₀]** frente a la posición intraparticular solo sugiere un ligero aumento de la concentración de cofactor en las zonas más exteriores de la partícula.

4.2.3.2 Con benzaldehído como sustrato

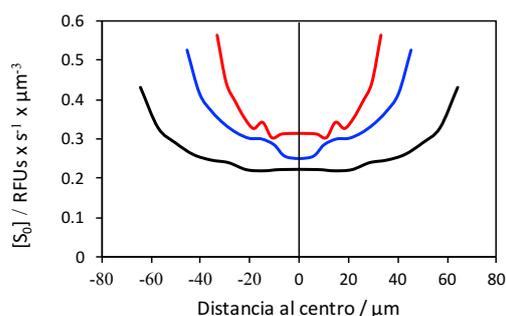


Figura 33. Concentración máxima de cofactor [S₀] frente a la distancia al centro de la partícula para el sistema de oxidación de NADH con ADH y benzaldehído

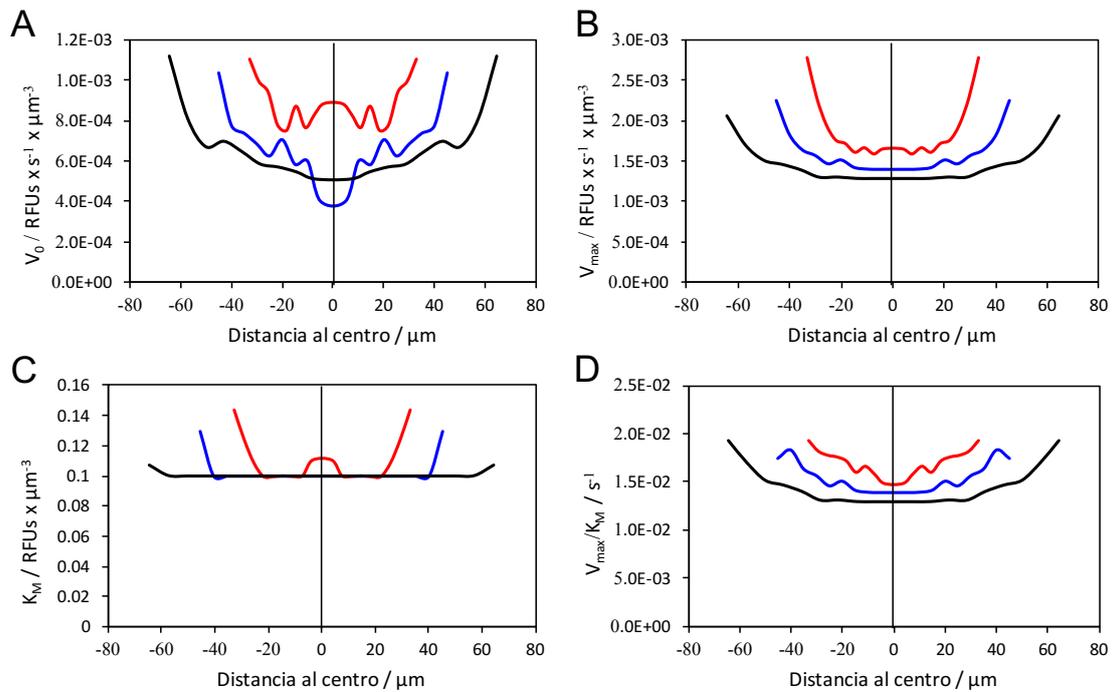


Figura 34. Diferentes parámetros cinéticos frente a la distancia al centro de la partícula: V_0 (A), V_{\max} (B), K_M (C) y V_{\max}/K_M (D) para el sistema de oxidación de NADH con ADH y benzaldehído

En esta nueva reacción la evolución interna de los parámetros cinéticos sigue un patrón mucho más regular y claro que para el caso anterior 4.2.3.1. Ahora sí que parece existir un claro patrón común entre todos los parámetros ($[S_0]$, V_{\max} , K_M , V_0 y ratio V_{\max}/K_M) cuyo valor es bastante constante en las zonas interiores de la partícula y aumenta a medida que nos alejamos del centro de la partícula (Figuras 33 y 34). Atendiendo al perfil de las curvas, si bien los cambios son menos dramáticos en el exterior de la partícula más grande (negra), para el caso de la partícula de menor tamaño (roja) encontramos cambios mucho más grandes entre las zonas exteriores e interiores, lo que sugiere unas restricciones difusionales más severas para este tipo de sustratos aromáticos de mayor tamaño y mayor carácter hidrofóbico. Por último, al observar el valor de los parámetros entre las diferentes partículas se confirma su relación inversa con relación al radio de la partícula explicada en el apartado 4.1.3.2, ya que las curvas de los parámetros se ordenan según el tamaño de la partícula (la roja de menor tamaño posee los valores más altos y la negra de mayor tamaño posee los valores más bajos).

5 Conclusiones

5.1 Procesado de imágenes de microscopía de fluorescencia

Los códigos implementados en el software Image J han permitido obtener satisfactoriamente a partir de los datos crudos iniciales la evolución temporal de la intensidad de fluorescencia en las diferentes partículas. Mediante los códigos empleados se ha conseguido aislar cada partícula de forma individual para obtener su intensidad total e incluso la intensidad de puntos localizados en su interior (resolución micrométrica). Sin embargo, una vez obtenidos estos datos crudos han tenido que ser refinados, y lo más importante, normalizados volumétricamente para obtener gráficas que correspondan a la concentración de cofactor, y que por tanto muestren de forma significativa la actividad enzimática en el tiempo. Esta corrección de los datos realizada pretende paliar la diferencia entre la fluorescencia real que existe en un punto y la observada por el microscopio.

5.2 Obtención de parámetros cinéticos

Una vez obtenidas las gráficas de actividad enzimática en el tiempo, para poder obtener sus diferentes parámetros cinéticos ha sido necesario su ajuste mediante una herramienta específica. Esta herramienta de ajuste de cursos de reacción enzimáticos se denomina "PCAT", y consiste en un código del software Matlab donde introduciendo los valores de las gráficas calcula sus parámetros cinéticos. Las curvas de evolución de fluorescencia obtenidas han podido ser empleadas como cursos de reacción enzimáticos ya que sus valores se corresponden con los de la concentración de cofactor. El método de ajuste empleado ha sido un ajuste de tipo analítico, el cual requería establecer valores iniciales para algunos parámetros, por lo que ha sido necesario realizar varias iteraciones que aseguren la obtención de un resultado final más fiable.

5.3 Análisis de resultados

Los parámetros cinéticos de los sistemas enzimáticos han sido estudiados a dos niveles: interparticular, estudiando el efecto del tamaño de la partícula; e intraparticular, estudiando el efecto de la localización en el interior de la partícula. Se ha observado un comportamiento muy diferente dependiendo del sustrato usado: mientras que para sustratos pequeños e hidrofílicos no se observan variaciones significativas de los parámetros cinéticos con respecto al tamaño de partícula, para aquellos sustratos más voluminosos y aromáticos como la 2,2,2-trifluoroacetofenona y el benzaldehído sí que se observa una correlación negativa entre la eficiencia catalítica y el tamaño de partícula. Conclusiones similares se han alcanzado al estudiar el perfil intrapartícula de estos parámetros cinéticos, ya que hay una variación mucho mayor entre el interior y el exterior de la partícula cuando se estudiaron reacciones de reducción usando grupos carbonílicos aromáticos. La herramienta de análisis de imagen desarrollada en este trabajo abre una puerta muy interesante para avanzar en el entendimiento de la función de sistemas enzimáticos inmovilizados. Estos sistemas son de gran utilidad en el campo de los

biomateriales ya que muchas de sus aplicaciones (biosensores, nanoterapia, liberación de fármacos...) se basan en el acoplamiento de enzimas a materiales sólidos.

5.4 Consideraciones futuras

Los resultados de este trabajo parecen prometedores a la hora de aportar nuevas técnicas de análisis de imagen que faciliten la caracterización de sistemas enzimáticos inmovilizados, aunque todavía existe mucho espacio para su mejora. Durante la realización de este trabajo han surgido diferentes ideas que serían muy interesantes para aumentar el potencial del método propuesto.

- Una de las consideraciones principales sería la de establecer una correlación entre los valores reales de fluorescencia obtenidos a partir de las imágenes con los de la concentración del cofactor que produce dicha fluorescencia. Esto permitiría no sólo obtener tendencias en los resultados de los parámetros, sino también poder obtener su valor real.
- También sería muy positivo modificar el método de medición para obtener los valores reales de fluorescencia en cada punto, en lugar de tener que recurrir a normalizar los datos como ha ocurrido en este trabajo debido al uso de un microscopio no confocal. De esta forma la fiabilidad de los resultados aumentaría en gran medida, al no depender de ningún tipo de aproximación ni corrección, y permitiría obtener datos fiables directamente a partir de las mediciones experimentales.
- En cuanto al ajuste de los cursos enzimáticos y obtener sus parámetros, sería mucho más fiable utilizar un método de ajuste que no dependa de datos iniciales, como es el caso del tipo de ajuste analítico empleado en este trabajo.
- Por último, para mejorar el análisis de los resultados y obtener conclusiones más precisas, sería muy interesante marcar las enzimas inmovilizadas con un fluoróforo, lo cual permitiría cuantificar la concentración de la enzima de igual forma que se ha obtenido la del cofactor.

6 Bibliografía

- (1) Benítez-Mateos, A. I. Design and Engineering of Artificial Metabolic Cells for Chemical Manufacturing. Doctoral Thesis, University of Basque Country, 2019.
- (2) Illanes, A. *Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications*; Netherlands: Springer, Dordrecht, 2008.
- (3) Schmid-Dannert, C.; López-Gallego, F. *Advances and Opportunities for the Design of Self-Sufficient and Spatially Organized Cell-Free Biocatalytic Systems*; 2019; Vol. 49.
- (4) Moore, J. C.; Jin, H.-M.; Kuchner, O.; Arnold, F. H. Strategies for the in Vitro Evolution of Protein Function: Enzyme Evolution by Random Recombination of Improved Sequences¹¹ Edited by J. Wells. *Journal of Molecular Biology* **1997**, 272 (3), 336–347.
- (5) Minshull, J.; Willem Stemmer, P. C. Protein Evolution by Molecular Breeding. *Current Opinion in Chemical Biology* **1999**, 3 (3), 284–290.
- (6) Sheldon, R. A.; Woodley, J. M. Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry. *Chem. Rev.* **2018**, 118 (2), 801–838.
- (7) Benítez-Mateos, A. I.; Nidetzky, B.; Bolivar, J. M.; López-Gallego, F. Single-Particle Studies to Advance the Characterization of Heterogeneous Biocatalysts. *ChemCatChem* **2018**, 10 (4), 654–665.
- (8) DiCosimo, R.; McAuliffe, J.; Poulouse, A. J.; Bohlmann, G. Industrial Use of Immobilized Enzymes. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42 (15), 6437–6474.
- (9) Bommarius, A. S.; Paye, M. F. Stabilizing Biocatalysts. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42 (15), 6534–6565.
- (10) Liese, A.; Hilterhaus, L. Evaluation of Immobilized Enzymes for Industrial Applications. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42 (15), 6236–6249.
- (11) López-Gallego, F.; Jackson, E.; Betancor, L. Heterogeneous Systems Biocatalysis: The Path to the Fabrication of Self-Sufficient Artificial Metabolic Cells. *Chemistry – A European Journal* **2017**, 23 (71), 17841–17849.
- (12) Köhler, V.; Turner, N. J. Artificial Concurrent Catalytic Processes Involving Enzymes. *Chem. Commun.* **2015**, 51 (3), 450–464.
- (13) Rollin, J. A.; Tam, T. K.; Zhang, Y.-H. P. New Biotechnology Paradigm: Cell-Free Biosystems for Biomanufacturing. *Green Chem.* **2013**, 15 (7), 1708–1719.
- (14) Hinzpeter, F.; Gerland, U.; Tostevin, F. Optimal Compartmentalization Strategies for Metabolic Microcompartments. *Biophysical Journal* **2017**, 112 (4), 767–779.
- (15) Liese, A.; Hilterhaus, L. Evaluation of Immobilized Enzymes for Industrial Applications. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42 (15), 6236–6249.

- (16) Neto, W.; Schürmann, M.; Panella, L.; Vogel, A.; Woodley, J. M. Immobilisation of ω -Transaminase for Industrial Application: Screening and Characterisation of Commercial Ready to Use Enzyme Carriers. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2015**, *117*, 54–61.
- (17) Bolivar, J. M.; Consolati, T.; Mayr, T.; Nidetzky, B. Shine a Light on Immobilized Enzymes: Real-Time Sensing in Solid Supported Biocatalysts. *Trends in Biotechnology* **2013**, *31* (3), 194–203.
- (18) Bolivar, J. M.; Eisl, I.; Nidetzky, B. Advanced Characterization of Immobilized Enzymes as Heterogeneous Biocatalysts. *Catalysis Today* **2016**, *259*, 66–80.
- (19) Gershenson, A. Single Molecule Enzymology: Watching the Reaction. *Current Opinion in Chemical Biology* **2009**, *13* (4), 436–442.
- (20) Tamborini, L.; Fernandes, P.; Paradisi, F.; Molinari, F. Flow Bioreactors as Complementary Tools for Biocatalytic Process Intensification. *Trends in Biotechnology* **2018**, *36* (1), 73–88.
- (21) Kroutil, W.; Mang, H.; Edegger, K.; Faber, K. Recent Advances in the Biocatalytic Reduction of Ketones and Oxidation of Sec-Alcohols. *Current opinion in chemical biology* **2004**, *8* (2), 120–126.
- (22) Velasco-Lozano, S.; Benítez-Mateos, A. I.; López-Gallego, F. Co-Immobilized Phosphorylated Cofactors and Enzymes as Self-Sufficient Heterogeneous Biocatalysts for Chemical Processes. *Angewandte Chemie International Edition* **2017**, *56* (3), 771–775.
- (23) Beauchamp, J.; Vieille, C. Activity of Select Dehydrogenases with Sepharose-Immobilized N6-Carboxymethyl-NAD. *Bioengineered* **2015**, *6* (2), 106–110.
- (24) Rulli, G.; Heidlindemann, M.; Berkessel, A.; Hummel, W.; Gröger, H. Towards Catalyst Compartmentation in Combined Chemo- and Biocatalytic Processes: Immobilization of Alcohol Dehydrogenases for the Diastereoselective Reduction of a β -Hydroxy Ketone Obtained from an Organocatalytic Aldol Reaction. *Journal of Biotechnology* **2013**, *168* (3), 271–276.
- (25) Benítez-Mateos, A. I.; San Sebastian, E.; Ríos-Lombardía, N.; Morís, F.; González-Sabín, J.; López-Gallego, F. Asymmetric Reduction of Prochiral Ketones by Using Self-Sufficient Heterogeneous Biocatalysts Based on NADPH-Dependent Ketoreductases. *Chemistry – A European Journal* **2017**, *23* (66), 16843–16852.
- (26) Bäuerle, F.; Zotter, A.; Schreiber, G. Direct Determination of Enzyme Kinetic Parameters from Single Reactions Using a New Progress Curve Analysis Tool. *Protein Engineering, Design and Selection* **2016**, *30* (3), 151–158.