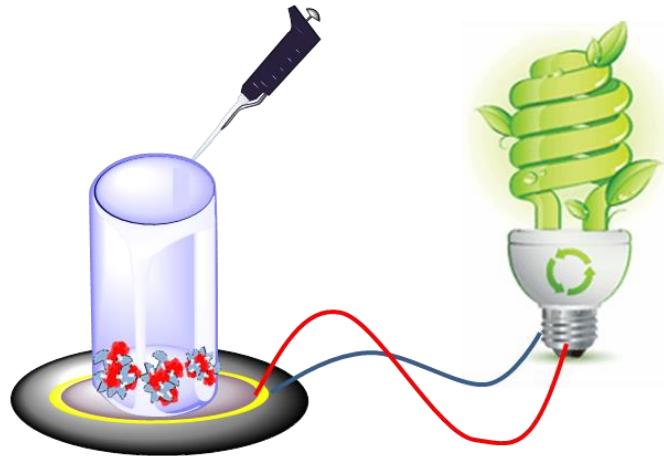


Ensamblados enzimáticos para aplicaciones biotecnológicas: Generación de energía



TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

**Memoria presentada por: NICOLL PAULINA ZEBALLOS LEMA bajo la
dirección del Dr. FERNANDO LÓPEZ GALLEG**

Máster en Biología Molecular y Celular

Departamento de Química Orgánica

Universidad de Zaragoza

Septiembre de 2018

Índice

1. Antecedente	8
1.1 Biocatálisis	8
1.2 Ensamblados enzimáticos	9
1.3 Ensamblajes al azar	10
1.4 Ensamblaje ordenado mediante uniones específicas Cohesina-Dockerina	12
1.4.1. Celulosoma	14
1.4.2 Andamios celulosómicos sintéticos	15
1.5. Uso de enzimas en aplicaciones de energía	15
2. Motivación e Hipótesis	18
3. Objetivos	
4. Materiales y Métodos	20
4.1 Materiales y Métodos	20
4.2 Métodos	22
4.2.1 Producción de enzimas entrecruzadas covalentemente (CLEA)	22
4.2.1.1 Producción de CLEA de catalasa (CLEA-CAT/BSA)	22
4.2.1.2 Producción de CLEA de catalasa y polietilenimina (PEI) (CLEA-CAT/BSA/PEI)	22
4.2.1.3 Producción de combi-CLEAs de catalasa (CAT) y glucosa oxidasa (GOX) (CLEA-CAT/BSA/GOX)	23
4.2.1.4 Producción de CLEA de catalasa (CAT), polietilenimina (PEI) y glucosa oxidasa (GOX) (CLEA-CAT/BSA/PEI/GOX)	23
4.2.2 Cuantificación de proteína en los CLEAs	23
4.2.2.1 Rendimiento de precipitación	24
4.2.2.2 Rendimiento de Inmovilización	24
4.2.2.3 Rendimiento de unión GOX	25
4.2.3 Determinación de la actividad enzimática de la <u>catalasa</u>	25
4.2.4 Actividad expresada de las enzimas inmovilizadas en forma de CLEAs	25
4.2.5 Integraciones de CLEAs en bio-generadores inorgánicos	26
4.2.6 Caracterización funcional de los CLEAs integrados en un bio-generador inorgánico	26
4.2.7 Microscopía electrónica de barrido (SEM)	27
4.2.8 Mutagénesis dirigida	27
4.2.9 Transformación	28
4.2.10 Obtención y cuantificación de plásmido	28
4.2.11 Secuenciación	29
4.2.12 Expresión de las proteínas	29

4.2.13 Gel de SDS-poliacrilamida	30
4.2.14 Purificación mediante cromatografía de afinidad	31
4.2.15 Ensamblaje en fase de andamios Cohesina-Dockerina artificiales:Dock-Cian	31
4.2.16 Medida de Fluorescencia Dock-Cian	32
4.2.17 Ensamblaje en fase sólida de Dock-wTa	32
4.2.18 Medidas de actividad transaminasa	32
5. Resultados	33
5.1 Inmovilización aleatoria de enzimas	33
5.1.1 Producción de CLEA-CAT	33
5.1.1.1 Agente precipitante	33
5.1.1.2 Concentración de Glutaraldehído	34
5.1.1.3 Concentración de proteína inicial	34
5.1.1.4 Producción de CLEA-CAT/BSA/PEI	35
5.1.1.5 Producción de combi-CLEAs: CAT/BSA/GOX y CAT/BSA/PEI/GOX	36
5.1.1.6 SEM	37
5.1.2 Respuesta energética: Bio-generadores inorgánicos	38
5.2 Inmovilización ordenada de enzimas	42
5.2.1 Diseño y expresión de andamios proteicos basados en celulosoma	42
5.2.2 Diseño y síntesis de plásmidos	42
5.2.3 Expresión de proteínas	43
5.2.4 Anclaje de Cohesinas de Tipo II a micropartículas activadas con quelatos de cobalto	44
5.2.5 Unión de Dock-Cian a micropartículas porosas ancladas con Cohesina de tipo II	45
5.2.6 Unión de Dock-wTa a micropartículas porosas ancladas con Cohesina de tipo II	48
6. Discusión	49
6.1 Inmovilización en CLEA y fabricación de generadores bio-inorgánicos	49
6.1.1 Oprimización de la preparación de CLE-CAT y su respuesta energética	50
6.2 Construcción de andamios artificiales Cohesina-Dockerina	52
6.2.1 Diseño y expresión de andamios artificiales basados en celulosa	52
7. Conclusiones	55
8. Bibliografía	57
9. Anexos	61

Abreviaturas

CLEA Agregados enzimáticos entrecruzados por enlaces covalentes del inglés “Cross-linked enzyme aggregates”.

Combi-CLEA Agregados enzimáticos formados por más de una enzima

GA Glutaraldehído

PZT Disco piezoelectrónico de titanato de zirconato de plomo

SiO_2 Oxido de silicio

CAT Catalasa

H_2O_2 Peróxido de hidrógeno

GOX Glucosa oxidasa

PEI Polietilenimina ramificada

BSA Albúmina de suero bovino

Coh Cohesina de *C. Thermocellum*

Coh-His Cohesina de *C. Thermocellum* tras la mutación, contiene una etiqueta de polihistidinas

Dock-Cian Dockerinas de *Clostridium thermocellum* unida a una proteína fosforescente cyan

Dock-wTa Dockerinas de *Clostridium thermocellum* unida a una transaminasa de *Aspergillus terreus*

HRP Peroxidasa de rábano picante

ABTS Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiozonil-6-sulfónico)

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Sulfato de amonio

S1 Sobrenadante 1

S2 Sobrenadante 2

S3 Sobrenadante 3

Abs Absorbancia

SEM Microscopía electrónica de barrido del inglés “Scanning electron microscope”

PCR del inglés “polymerase chain reaction”

INA Instituto de Nanociencia de Aragón

GC Guanina y Citocina

DO Densidad óptica

IPTG Isopropil- β -tiogalactoriranósido

SDS-PAGE Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes

IMAC Cromatografía de afinidad de metal inmovilizado reticulado

CaCl_2 Cloruro de calcio

PLP piridoxal fosfato

AP Agente precipitante

Ae_i Actividad específica inmovilizada

CFP Proteína ciano fluorescente

Resumen

Uno de los grandes problemas que presentan el uso de enzimas como catalizadores industriales es su complejidad a la hora de integrarlas en dispositivos tecnológicos tales como sensores o reactores. Por ello, en las últimas décadas ha surgido una gran variedad de metodologías capaces de insolubilizar las enzimas para facilitar su separación y reciclaje en procesos químicos, o bien su incorporación a los electrodos de un gran número de biosensores.

En este trabajo abordamos la fabricación y optimización de dos tipos de inmovilización basada en sistemas de agregación de proteínas: i) agregados enzimáticos unidos covalentemente (CLEA) donde las enzimas interaccionan entre sí de forma aleatoria y ii) agregados enzimáticos basados en uniones específicas cohesina-dockerina que permiten una agregación ordenada, imitando al ensamblaje molecular que ocurren en la formación natural de celulosomas. Con el objetivo de demostrar su aplicabilidad biotecnológica, estos agregados moleculares han sido depositados en materiales piezoeléctricos con la finalidad de producir un bio-generador energético reutilizable basado en la transformación de energía química en energía eléctrica a través de estímulos mecánicos.

En este trabajo, hemos demostrado la posibilidad de producir un CLEA funcional formado por dos enzimas diferentes; catalasa (CAT) y glucosa oxidasa (GOX) (combi-CLEA). Este sistema multi-enzimático permitió la formación de un estímulo mecánico (en forma de burbujas) a partir de una mezcla de glucosa y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) mediante la oxidación de la glucosa catalizada por la GOX y la subsiguiente eliminación del H_2O_2 (sub-producto de la GOX) a agua y oxígeno molecular. Además, este CLEA fue integrado de forma satisfactoria en los dispositivos piezoeléctricos. Esta demostración abre la puerta para utilizar esta metodología con otros sistemas multi-enzimáticos capaces de usar otros combustibles químicos renovables más allá de la glucosa.

Finalmente, se diseñaron y construyeron dos piezas de un andamio sintético basado en interacciones cohesina-dockerina con el objetivo de lograr una agregación enzimática más controlada. Con estas construcciones se ha demostrado: la fuerza y la especificidad de este tipo de uniones, la retención de la actividad enzimática tras la inmovilización y la estabilidad de las uniones de enzimas multivalentes unidas por andamios sintéticos a soportes. Con vista a un futuro, diferentes oxidases y catalasas serán fusionados a estos bloques celulosómicos para formar agregados moleculares ordenados y posteriormente depositados sobre superficies piezoeléctricas para fabricar bio-generadores más eficientes.

Abstract

The use of enzymes as industrial catalyst is limited by its low stability and solubility when they are intended to integrate into technological devices (sensor or reactors).

In the last decades a great variety of methodologies have been developed to stabilize and make the enzymes insoluble in order to facilitate their recovery, recycling and incorporation into solid surfaces like electrodes of a large number of biosensors or packed bed reactors for continuous chemical processes.

In this work, we address the fabrication and optimization of two approaches of protein immobilization based on different protein aggregation systems: i) cross linked enzyme aggregates (CLEA), where the enzymes interact with each other in a random way, and ii) enzymatic aggregates based on cohesin-dockerin specific interactions, which brings enzyme together, emulating the molecular assembly that occurs in the natural formation of cellulosomes.

To demonstrate its biotechnological applicability, those molecular aggregates have been deposited over piezoelectric materials in order to produce a reusable energy bio-generator based on the transformation of chemical energy into electrical energy through mechanical stimuli.

We have demonstrated the possibility of producing a functional CLEA formed by two different enzymes; catalase (CAT) and glucose oxidase (GOX) (combi-CLEA). This multi-enzymatic system allowed the formation of a mechanical stimuli (as bubbles) from a mixture of glucose and hydrogen peroxide through the oxidation of glucose catalyzed by GOX and the subsequent elimination of H₂O₂ (by-product of GOX) into water and molecular oxygen. Besides, this CLEA system was integrated in a satisfactory way in the piezoelectric devices. This demonstration, therefore, opens the door to use of this technology with other multi-enzymatic systems capable of using different reusable chemical fuels beyond glucose.

Finally, two pieces of a synthetic scaffold based on cohesine-dockerine interactions were designed and built with the scope of achieving a more controlled enzymatic aggregation. With these structures, it has been proved: the solid-phase assembly of the cohesion and dockering domains; the strength and specificity of this type of interaction, the retention of enzymatic activity after the assembly and, the multivancy of the bonding between the synthetic scaffolds and the functionalized surfaces. Looking at the future, different oxidases and catalases will be fused to these cellulosic building blocks to form ordered molecular aggregates and subsequently deposited on piezoelectric surfaces to produce more efficient bio-generators.

1. Antecedentes

1.1. Biocatálisis

Los procesos biocatalíticos se diferencian de los procesos convencionales químicos principalmente por las propiedades físico-químicas de las enzimas; unos catalizadores que generalmente trabajan en condiciones fisiológicas y con una selectividad exquisita. Estas propiedades tan características de las enzimas nos permiten llevar a cabo procesos químicos muy eficientes en condiciones suaves de reacción (temperaturas moderadas, medios acuosos, presiones atmosféricas...) y con una gran quimio, regio y estereoselectividad (Illanes, 2008), lo que permite obtener productos con un grado de pureza muy elevado. Además, el origen natural de las enzimas hace que sean catalizadores renovables y biodegradables, lo que hace que su uso sea sostenible y respetuoso con el medio ambiente.

Gracias a los avances de la biocatálisis en las últimas tres décadas, se ha ampliado el abanico de sustratos moleculares capaces de ser utilizados por las enzimas, más allá de sus sustratos naturales. Esto ha permitido catalizar la síntesis y transformación de una amplia cantidad de moléculas complejas. Además, las enzimas, gracias a su selectividad producen menos residuos que los procesos químicos convencionales ya que no requieren de pasos intermedios de protección/desprotección de los sustratos.

En términos generales las enzimas no solo son catalizadores sostenibles per se, sino que hacen mucho más sostenibles aquellos procesos químicos en los que intervienen.

Sin embargo, debido a su origen y función natural, las enzimas presentan algunas desventajas cuando se quieren aplicar en procesos de producción a nivel industrial en donde las condiciones de reacción son muy desfavorables para su estabilidad, tales como su baja estabilidad en presencia de disolventes no polares, a temperaturas altas o a cambios de pH extremos. Debido a su alta solubilidad en medios acuosos su reutilización en reacciones discontinuas y en procesos de flujo continuo se ve limitada por su dificultad de recuperación en dichos procesos.(Homaei, et al., 2013) Además, cuanto más complejo es el sistema multi-enzimático más se pone en manifiesto estos problemas.

1.2. Ensamblados enzimáticos

Las rutas metabólicas son vías complejas formadas por sistemas multi-enzimáticos evolucionados a lo largo de millones de años para trabajar dentro del medio celular. Sin embargo, en las últimas décadas se ha producido un auge en los procesos biocatalíticos *in vitro* que integran sistemas multi-enzimáticos capaces de llevar a cabo reacciones en cascada en condiciones no naturales. Este auge se debe principalmente a los avances realizados en la ingeniería de proteínas y en el desarrollo de diversos procesos de inmovilización que han permitido la modificación y aplicación de enzimas como biocatalizadores en procesos industriales para la obtención de productos valiosos, (Bruggink, et al., 1998; DiCosimo, et al., 2013; Sedlaczek, et al., 1988) así como para el tratamiento de diversas enfermedades. (Illanes, 2008)

En la naturaleza, las enzimas pertenecientes a cascadas enzimáticas presentan una organización espacial a través de estructuras o superficies. Las membranas lipídicas o los filamentos del citoesqueleto son algunas de las estrategias más utilizadas por las células para organizar las enzimas. (Schmitt, et al., 2017; Sweetlove, et al., 2018) Ejemplos de esta organización van desde la fosforilación oxidativa en la membrana interna de mitocondrias (Haggie, et al., 2001), hasta la organización temporal de las enzimas glicolíticas a través de la unión a filamentos de actina. (Holtgräwe, et al., 2005)

Por otro lado en los últimos 40 años también se ha demostrado que en el metabolismo las enzimas no siempre se distribuyen homogéneamente a lo largo de la célula, sino que pueden unirse debido a interacciones proteína-proteína entre ellas. Estos ensamblajes enzimáticos generalmente constituyen vías metabólicas, permitiendo una canalización de los productos de una enzima a la otra, sin que estos productos lleguen a difundir y equilibrarse con la fase acuosa de la célula (Srere, 1985). Este hecho es especialmente beneficioso en procesos donde el producto de una enzima de la cascada enzimática es lábil o tóxico para ella misma o para las demás enzimas produciendo su inactivación o inhibición. Un ejemplo de esta estrategia de ensamblado enzimático es la degradación de aminas biogénicas en el vino cuya degradación catalizada por la diamina oxidasa (*de Pisum sativum*) produce aldehídos inocuos y peróxido de hidrógeno como sub-producto. Este último, desafortunadamente provoca la inactivación de la oxidasa (García-García, et al., 2018), por lo que se debe incorporar una catalasa que descomponga *in situ* al oxidante. La co-

immovilización de la catalasa y la oxidasa aumentan significativamente la productividad y la estabilidad del sistema gracias a su co-localización espacial mediada por técnicas de inmovilización. Demostrando así la capacidad que tiene la inmovilización enzimática combinada con la ingeniería de proteínas de simular *in-vitro* las condiciones naturales perdidas durante el proceso de aislamiento de sistemas multi-enzimáticos.

Aunque en la literatura se ha descrito que la formación de agregados enzimáticos aumentan la velocidad de reacción debido a una canalización más eficiente de sustratos (Ovádi, et al., 2004), existen otras explicaciones alternativas basadas en cambios en las condiciones biofísicas locales, debido a aumentos locales de concentración de sustratos o cambios locales de pH que mejoraran la actividad de las cascadas enzimáticas, además de la regeneración de *in situ* de cofactores. (Garcia-Galan, et al., 2011; Zhang, et al., 2017)

Dentro de estos ensamblados moleculares existen dos tipos: i) ensamblajes al azar formados a partir de la agregación estocástica de varias enzimas que juntas forman una ruta biosintética; ii) ensamblajes ordenados construidos a partir de uniones proteína-proteínas basadas en interacciones supramoleculares gracias a la complementariedad estructural de varios dominios proteicos que actúan como ladrillos estructurales para formar el perseguido andamio molecular. (Sweetlove, et al., 2018) Mientras que en la primera aproximación se tiene poca precisión sobre la posición de cada uno de las enzimas, la segunda estrategia sí que nos permite diseñar la posición de varias enzimas que forman el sistema biosintético objetivo.

1.3. Ensamblajes al azar

En las células los ensamblajes aleatorios se produce con enzimas metabólicas formando metabolomas dinámicos en respuesta a condiciones de nutrición o de estrés con el objetivo de mejorar la actividad de la vía metabólica.(O'Connell, et al., 2012) El ejemplo más claro de este tipo de ensamblado son los purisomas compuestos de enzimas que se requieren para la síntesis de purinas *de novo*. (An, et al., 2008)

La adaptación de este tipo de ensamblaje a la síntesis *in vitro* fue desarrollado por el laboratorio de Sheldon en los años 90 con la formación de agregados enzimáticos

entrecruzados por enlaces covalentes, abreviados como CLEA de su definición en inglés “cross-linked enzyme aggregates”.

El ensamblaje de enzimas en forma de CLEA es una forma de inmovilización que no requiere el empleo de matrices sólidas o soportes preformados. La formación de los CLEAs se realiza mediante la agregación de las proteínas utilizando un agente precipitante, seguido del entrecruzamiento de estos agregados utilizando un agente entrecruzante bifuncional (Fig. 1 A). En este tipo de inmovilización, las proteínas se unen irreversiblemente mediante enlaces covalentes. En la mayoría de los casos, el agente precipitante empleado es el glutaraldehído (GA), de modo que los enlaces formados se producen a través de los grupos amino de aminoácidos como la lisina (presente típicamente en la superficie de proteínas) que reaccionan con los grupos aldehídos del GA. (Velasco-Lozano, et al., 2016). Este entrecruzamiento covalente evita la redispersión de los agregados y mantiene el carácter insoluble de las enzimas lo que permite su reciclaje y recuperación.

Este tipo de ensamblaje enzimático proporciona a las enzimas mayor estabilidad en condiciones de reacción adversas, (pH, solventes orgánicos, temperatura, etc.), mayor resistencia a inhibidores o desnaturizantes (Sheldon, 2007) con respecto a las enzimas solubles. Además, la selectividad y actividad de estos biocatalizadores se puede modular controlando las condiciones de formación del CLEA. (Sheldon, 2007). Y con respecto a las proteínas inmovilizadas en soportes convencionales muestran un aumento de 10 a 1000 veces la actividad de las enzimas (U g^{-1} de biocatalizador), no requiere la purificación previa de las enzimas y por tanto su preparación es más sencilla y económica.

Sin embargo este tipo de inmovilización también presenta desventajas, como la disminución de la actividad debido a la formación de agregados enzimáticos de gran tamaño que generan grandes problemas de difusión, y la necesidad de optimizar el protocolo de agregación y entrecruzamiento para cada enzima. (Roessl, et al., 2010)

Las propiedades catalíticas de los CLEA, tales como la actividad y la selectividad, dependen de la conformación de las proteínas en los agregados y éstas pueden alterarse dependiendo de las condiciones de agregación de las proteínas, y por tanto del agente precipitante empleado durante su preparación (Schoevaart, et al., 2004a). Otra de las propiedades más importantes de los CLEA es el tamaño de los agregados

puesto que influye directamente en su capacidad de transferencia de masa y por lo tanto en su actividad. El tamaño de los CLEA depende de la concentración de agente entrecruzante utilizado, del tiempo de entrecruzamiento, del agente precipitante y condiciones de precipitación, así como de la velocidad de agitación durante el entrecruzamiento. (Sheldon, 2011b)(Talekar et al., 2013)

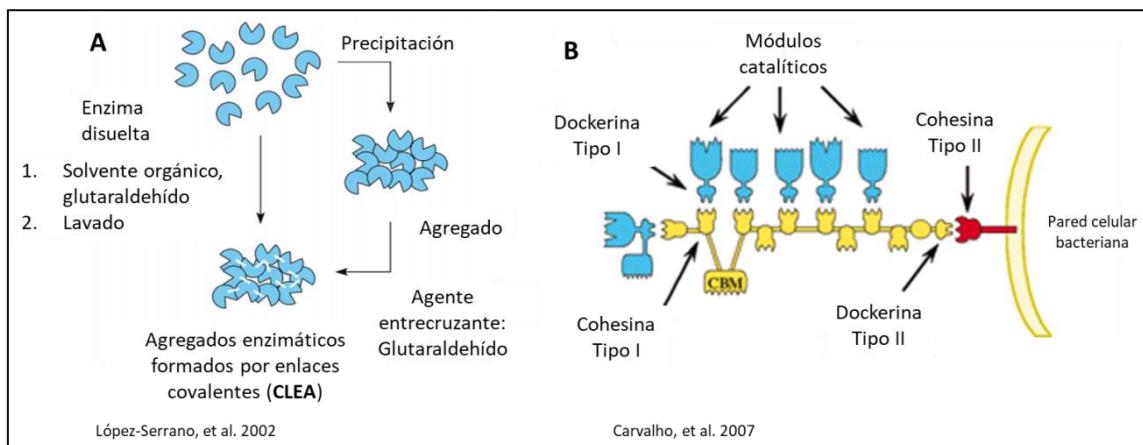


Figura 1. Tipos de ensamblajes moleculares. A. Esquema de la formación de agregados enzimáticos unidos por enlaces covalentes o CLEA. B. Esquema de las uniones específicas cohesina-dockerina en el celulosoma.

Utilizando este tipo de ensamblado también se ha demostrado con éxito la capacidad de inmovilizar más de un tipo de enzima en el mismo agregado (combi-CLEA) para su utilización en reacciones en cascada en donde se requiere más de un tipo de actividad enzimática ó reacciones en pasos sucesivos ((Velasco-Lozano, et al., 2018b). Un ejemplo de este sistema multi-enzimático es la biodegradación del paracetamol en aguas residuales utilizando un combi-CLEA compuesto de lactasa y tirosinasa donde la actividad residual de la lactasa libre pasa de 5% a un 40% cuando esta inmovilizada en CLEA y en el caso de la tirosinasa pasa de no mostrar actividad a presentar un 25% en forma de CLEA.(Ba, et al., 2014)

1.4. Ensamblaje ordenado mediante uniones específicas Cohesina-Dockerina

Inspirados en la eficiencia de las rutas metabólicas presentes en la naturaleza, los primeros intentos de imitar estos complejos naturales fueron fusiones simples de dominios de enzimas que catalizan reacciones consecutivas. (Meynil Salles, et al., 2007; Wang, et al., 2011) Esta estrategia a pesar de dar buenos resultados, se complica cuando intervienen más de dos enzimas o existen cambios estereométricos en las

enzimas. Otra de las alternativas planteadas para la organización espacial de enzimas es su inmovilización en superficies porosas. ((Schmidt-Dannert, et al., 2016)Schmid-Dannert et al, 2016), Recientemente se ha logrado un control preciso de la disposición espacial de varias proteínas fluorescentes sobre microesferas de agarosa porosa ajustando su tasa de inmovilización individual. (Bolivar, et al., 2011). Las actuales estrategias de co-inmovilización de enzimas, requieren la selección cuidadosa de la de química de inmovilización y así como del tipo de soporte sólido, con el objetivo de preservar la actividad, estabilidad y selectividad enzimática implicada en el sistema biocatalítico. El desarrollo de nuevos materiales para inmovilización de enzimas está enfocado en aumentar su biocompatibilidad, inmovilización específica y para imitar las estrategias del diseño espacial de los sistemas biológicos. (Schmid-Dannert, et al. 2016). Pero a pesar de poder controlar la química de inmovilización en soportes porosos, estos fallan a la hora de lograr una precisión nanométrica en la organización espacial de sistemas multi-enzimáticos. Es aquí donde los andamios moleculares se muestran como una alternativa que permite la co-localización nanométrica de sistemas multi-enzimáticos con orientaciones y patrones espaciales específicos gracias a dominios de unión entre pares específicos. Esta localización y orientación asemeja la inmovilización de las enzimas a las formas más eficaces de ensamblados naturales, lo que a su vez aumenta a actividad del biocatalizador. La síntesis de estos andamios se compone de dominios de unión y dominios catalíticos que pueden ser modificados según las necesidades de la cascada enzimática. (Siu, et al., 2015)

Existe una amplia variedad de andamios moleculares descritos en la literatura en los últimos años debido a la flexibilidad que proporcionan estos sistemas. Algunos ejemplos incluyen andamios basados en ácidos nucleicos, en los cuales el auto-ensamblado de moléculas de ADN y ARN ha sido bastante estudiado, permitiendo el diseño computacional de nuevas estructuras más complejas que imponen una organización espacial detallada de proteínas unidas. (Wilner, et al., 2009) Otro ejemplo son los micro-compartimentos que secuestran los intermediarios limitantes o tóxicos, permiten el control selectivo sobre el sustrato y la creación de un microambiente dentro del compartimento. (DeLoache, et al., 2013) Uno de los ejemplos de complejos enzimáticos multifuncionales son los celulosomas de bacterias celulolíticas anaerobias que se basan en uniones muy específicas cohesina- dockerina (Fig 1 B.) mediadas por unión a calcio. (Bayer, et al., 2004; Schmid, et al., 2001)

1.4.1. Celulosoma

El celulosoma es un complejo multi-enzimático presente en bacterias anaeróbicas que dependen de enzimas hidrolíticas para la descomposición eficiente de polisacáridos extracelulares como la celulosa, con el fin último de utilizar estos polímeros de glucosa como fuente de carbono. (Schoevaart, et al., 2004a) Uno de los celulosomas más estudiados es el de *Clostridium thermocellum* que contiene varias celulasas y hemicelulasas ancladas a subunidades de andamiaje no catalítico formando un módulo dockerina de tipo I (Fig. 1 B en azul, Doc Tipo I). Las celulasas fusionadas genéticamente a estos dominios dockerinas se unen mediante interacciones no covalentes de alta afinidad, con varios módulos de anclaje basados en dominios cohesina de tipo I (Fig. 1 B amarillo, Coh Tipo I). Además, uno de los extremos del andamio de cohesinas tiene fusionado un dominio dockerina de tipo II que se une a una cohesina tipo II fusionada al petidoglicano bacteriano. De este modo el celulosoma formado por los modulos estructurales (dockerinas y cohesinas) y los funcionales (celulasas) permanece anclado a la pared bacteriana (Fig. 1 B en rojo, Coh Tipo II). Estas uniones (tipo I y tipo II) son muy específicas y dependientes de calcio.(Talekar, et al., 2013; Velasco-Lozano, et al., 2018b)

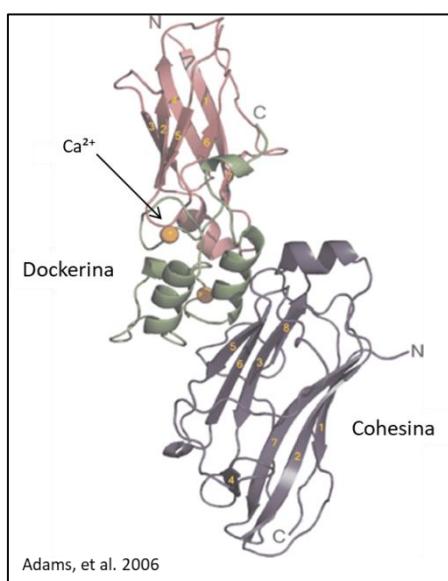


Figura 2. Estructura del complejo Cohesina-Dockerina de tipo II. En verde el dominio dockerina y en violeta el dominio cohesina. En esferas naranja se representa los cationes de calcio.

1.4.2. Andamios celulosómicos sintéticos

La biología sintética se ha inspirado en los celulosomas naturales para diseñar nuevos andamios sintéticos tipo dockerina y cohesinas capaces de ensamblar rutas biosintéticas más allá de aquellas que degradan la celulosa. De este modo, gracias a la especificidad en la interacción cohesina-dockerina que encontramos en diferentes organismos bacterianos, se han podido ensamblar celulosomas totalmente artificiales con aplicaciones en síntesis química.(You, et al., 2013) La primera propuesta de este tipo de construcciones sintéticas fue realizada en 1994 por Bayer y colaboradores. (Lopez-Serrano, et al., 2002).

1.5. Uso de enzimas en aplicaciones de energía

La búsqueda de fuentes o procesos alternativos de generación de energía es una necesidad inmediata para abastecer los requerimientos de la sociedad actual y futura. En este contexto se han desarrollado diversas líneas de investigación, especialmente con el auge de la nanotecnología, donde se encuentra uno de los ejemplos más exitosos de generación de energía mediante nanogeneradores piezoelectricos capaces de producir hasta $1 \mu\text{J cm}^{-2}$ a partir de energía mecánica. (You, et al., 2013) (Bowers, et al., 1995). Sin embargo, estos nanogeneradores requieren el suministro de energía mecánica para producir electricidad, lo que imposibilita su uso en sitios donde dicha energía mecánica no se encuentra disponible. Recientemente, nuestro grupo de investigación ha desarrollado el primer bio-generador inorgánico capaz de producir su propia energía mecánica a partir de la energía química contenida en moléculas combustibles procedentes de fuentes renovables. Dichos bio-generadores aprovechan la capacidad de los materiales piezoelectricos para generar cargas eléctricas al ser sometidos a fuerzas mecánicas, y la capacidad de sistemas enzimáticos para producir gas como fuente de energía mecánica(Velasco-Lozano, et al., 2018a)

Este bio-generador está compuesto por un disco piezoelectrico de titanato de zirconato de plomo (PZT) que está separado por una capa de cobre inferior y electrodos de plata superiores recubiertos de una capa de óxido de silicio (SiO_2) para evitar la corrosión. El disco de PZT se encuentra acoplado a una columna en forma de reservorio donde se produce la reacción enzimática (Fig. 3 A). La enzima productora de gas utilizada es la catalasa (CAT), un enzima tetramérica que contiene un grupo hemo capaz de descomponer el peróxido de hidrógeno produciendo oxígeno molecular

(Switala, et al., 2002), que debido a su baja solubilidad en medios acuoso forma de burbujas de gas. Esta formación vigorosa de gas hace colisionar las burbujas de oxígeno con la superficie piezoeléctrica transformando el estímulo mecánico en energía eléctrica. (Bowers, et al., 1995)

Con este bio-generador se ha reportado la generación de hasta $265 \pm 26.2 \text{ nJ cm}^{-2}$ (con 600 mM de H_2O_2 , 88 $\mu\text{g mL}^{-1}$ CAT en 400 μL). La cual, a pesar de ser una producción de energía baja, puede alimentar dispositivos microscópicos. A diferencia de las células de combustible microbianas descritas por primera vez en los años 60, este sistema no presenta problemas de transferencia de electrones a los electrodos y por tanto no necesita mediadores. (Montoro-García, et al., 2010)

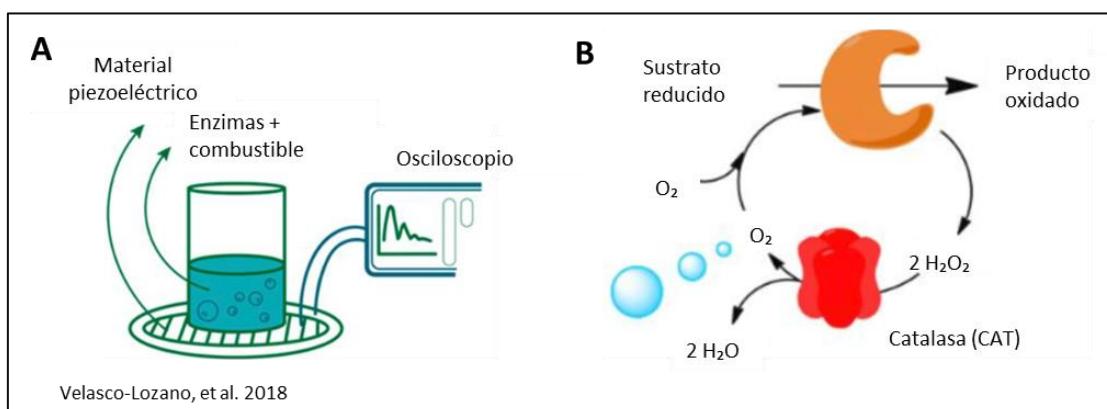


Figura 3. A. Esquema del bio-generador de energía. B. Producción de oxígeno y peróxido de hidrógeno en un sistema de acoplamiento multi-enzimático de una oxidasa (GOX) y una catalasa (CAT)

Otra de las ventajas que proporciona este sistema de generación de energía es la capacidad de acoplamiento de diversas enzimas para producir estímulos mecánicos más vigorosos (pares oxidasa-catalasa) que amplía el abanico de combustibles renovables como azúcares, gracias al acoplamiento de oxidases y catalasas (Fig. 3 B). De este modo, glucosa oxidasa, alcohol oxidasa y aminoácido oxidasa pueden utilizar glucosa, alcoholes y aminoácidos, respectivamente, como combustible. Además, este sistema no genera residuos tóxicos ni gases de efecto invernadero.

Uno de los grandes inconvenientes que presenta este sistema de cara a la sostenibilidad del proceso es el uso de enzimas solubles que deben ser desechadas tras el agotamiento del combustible. Por lo tanto, un gran avance en la fabricación de estos bio-generadores sería la unión irreversible de las enzimas a la superficie del material piezoeléctrico. De este modo se lograría el uso repetido de los biocatalizadores

durante para la generación de energía en modo continuo. Del mismo modo, la orientación y acomodo las enzimas sobre el material piezoeléctrico permitirá que el componente piezoeléctrico tenga mayor eficiencia de aprovechamiento de la energía mecánica ya que las burbujas de gas sería producidas mayoritariamente en la proximidad de la superficie piezoeléctrica, al contrario que cuando se utilizan enzimas solubles que generan burbujas en todo el volumen del reactor, las cuales se distribuyen en todas direcciones, desaprovechando gran parte de la energía mecánica producida.

Para realizar la inmovilización enzimática se plantean dos vías. La primera de ellas es la inmovilización de forma aleatoria en forma de CLEAs que posteriormente serán absorbidos a la superficie del material piezoeléctrico mediante interacciones electrostáticas. Con este sistema de inmovilización se optimizará y evaluará la capacidad de reutilización de estos biocatalizadores. También se plantea la coagregación en forma de combi-CLEA de las enzimas CAT y GOX que permitirá el uso de glucosa como combustible alternativo.

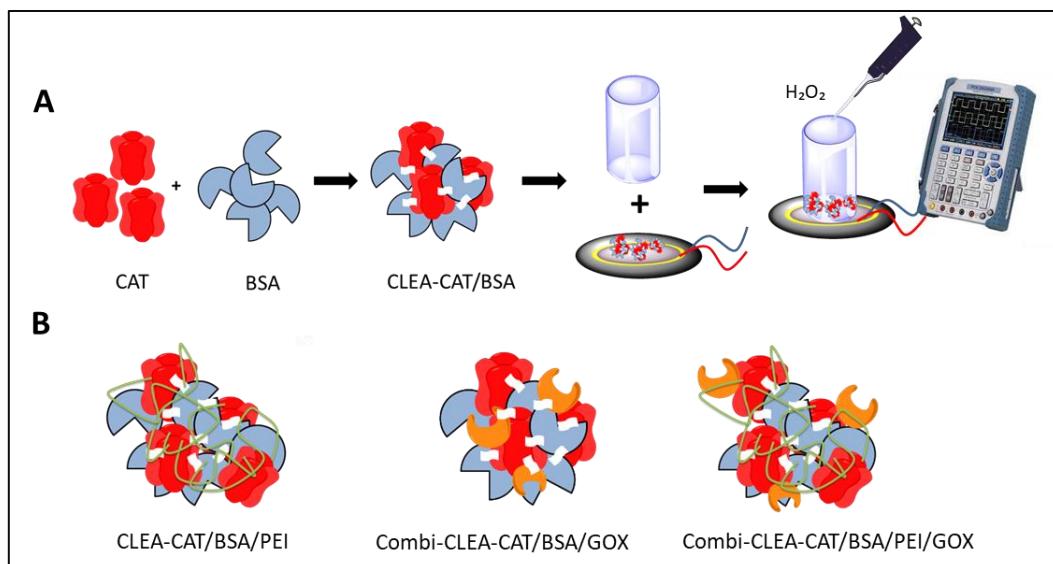


Figura 4. A. Esquema de la inmovilización de CAT en forma de CLEA y posterior adsorción al disco de PZT para la medida de la energía generada por el peróxido de hidrógeno. En rojo se representa la catalasa, en azul la proteína albúmina de suero bovino (BSA) y en blanco el agente entrecruzante bifuncional. **B.** Esquema de los tipos de CLEAs propuestos para mejorar la respuesta energética del bio-generador. En verde se representa polietilenimina (PEI) y en naranja la glucosa oxidasa (GOX).

La segunda estrategia planteada es la inmovilización organizada y ordenada mediante la formación de andamios proteicos específicos basados en interacciones cohesina -

dockerina. Proponemos que este tipo de inmovilización mejorará aún más el proceso de transmisión de los estímulos mecánicos (burbujas) al encontrarse dispuestos en una disposición específica. Por otro lado la construcción de estos ensamblados enzimáticos con más de una enzima aumentará la efectividad de la cascada enzimática, lo que supondrá una mayor eficiencia de transformación de los combustibles químicos, como la glucosa, en estímulos mecánicos (el burbujeo), con su consecuente aumento de energía generada.

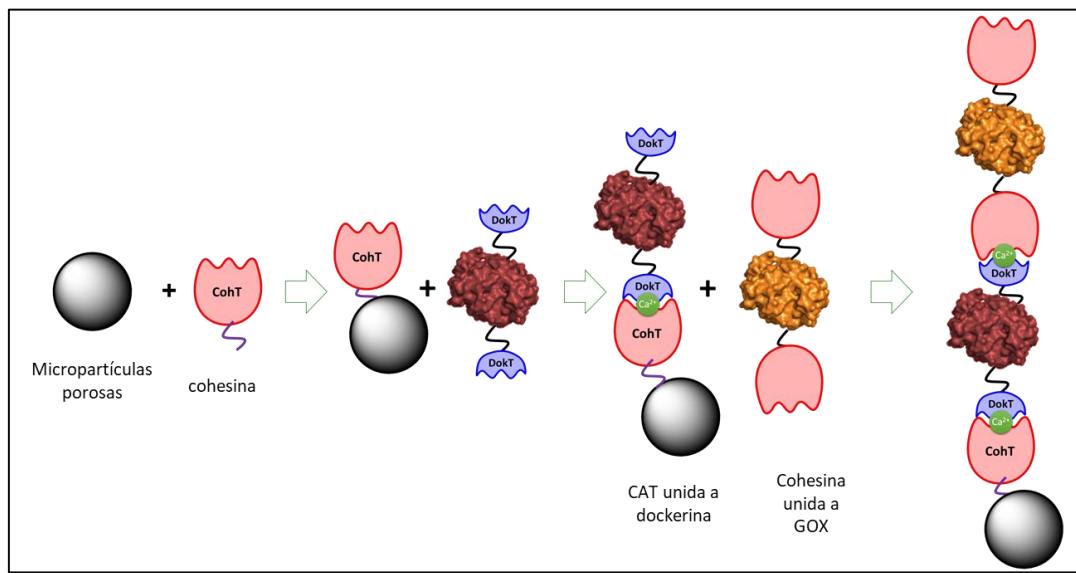


Figura 5. Esquema de la construcción la construcción e inmovilización de los andamios moleculares a micropartículas porosas. En rojo se representa CAT y en naranja GOX.

2. Motivación e Hipótesis

El objetivo de este proyecto es la construcción de sistemas bio-inorgánicos reutilizables capaces de generar energía a partir de fuentes químicas renovables. El laboratorio de biocatálisis donde he realizado este trabajo fin de master ha descrito recientemente la fabricación de generadores bio-inorgánicos que acoplan biocatalizadores enzimáticos a materiales piezoelectricos para convertir la energía química almacenada en moléculas renovables, en energía eléctrica (Velasco-Lozano, et al., 2018a). Sin embargo, dichos bio-generadores tienen la desventaja de que las enzimas se encuentran en forma soluble por lo que el sistema no puede ser reutilizable.

La hipótesis de este trabajo está basada en que la inmovilización de sistemas multi-enzimáticos oxidasa-catalasa sobre la superficie piezoelectrica de bio-generadores inorgánicos, permitirá una mayor eficiencia en la recolección de la energía mecánica

(burbujeo de gas) para su posterior transformación en energía eléctrica. Además, dicha inmovilización permitirá la aplicación de los bio-generadores inorgánicos para la producción de energía eléctrica de forma repetida o en continuo, lo que supondrá una mejora en la sostenibilidad del proceso.

3. Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es la construcción de un bio-generador de energía enzimático reutilizable mediante la inmovilización de sistemas enzimáticos en la superficie de los materiales piezoeléctricos. Para ello se plantea los siguientes objetivos parciales:

1. Producción y optimización de CLEAs de catalasa y combi-CLEAs catalasa, glucosa oxidasa.
2. Cuantificación de la energía generada por estos bio-generadores que contienen diferentes CLEAs absorbidos a la superficie del material piezoeléctrico
3. Re-utilización de esta nueva generación de bio-generadores durante varios ciclos de generación de energía
4. Construcción, expresión e inmovilización de la cohesina de tipo II mediante etiqueta de poli-histidinas.
5. Expresión recombinante de proteínas fusionadas a dominios dockerina tipo II
6. Optimización de las uniones específicas cohesina-dockerina.

4. Materiales y Métodos

4.1. Materiales.

En la Tabla 1 se detalla los materiales utilizados para la optimización y fabricación de CLEAs.

Tabla 1. Materiales fabricación de CLEAs

Producto	CAS	Proveedor	Detalles
Catalasa de hígado bovino (CAT)	9001-05-2	Sigma-Aldrich	
Albúmina de suero bovino (BSA)	9048-46-8	Sigma-Aldrich	
Polietilenimina ramificada (PEI)	9002-98-6	Sigma-Aldrich	600000 de longitud
Glucosa oxidasa (GOX) de <i>Aspergillus niger</i>	9001-37-0	Sigma-Aldrich	
Glutaraldehído	111-30-8	Sigma-Aldrich	Al 25% v/v
n-butanol	71-36-3	Sigma-Aldrich	
Sulfato de amonio	7783-20-2	Sigma-Aldrich	
Peroxido de hidrógeno al 70%		Sigma-Aldrich	Medidas de actividad catalasa a concentración inicial de 35 mM
Peroxidasa de rábano picante (HRP)	9003-99-0	Sigma-Aldrich	Medida de la actividad GOX
Ácido 2,2'-azino-bis (3- etilbenzatiazolin-6-sulfónico (ABTS)	30931-67-0	Sigma-Aldrich	
Glucosa			
Tampón fosfato de sodio			pH7
Piezoelectricos		Farnell Element14 Components	Diaphragma, 6.3kHz, 1 kΩ, 0.01 μF, 20 mmx 0.42 mm cat. 7BB-20-610, Murata

La Tabla 2 detalla los plásmidos utilizados para la construcción de andamios sintéticos, así como todos los materiales utilizados para su expresión, purificación e inmovilización.

Tabla 2. Materiales construcción de andamios sintéticos

Código	Producto	Detalles
Coh	* pET28a-cohct	Cohesina de <i>C. Thermocellum</i>
Coh-His	* pET28a-coh-histag	Mutación hecha mediante “quick change” de Cohesina de <i>C. Thermocellum</i> que posee una etiqueta de poli-histidinas
Dock-Cian	*pET28b_docnt/ECFP/docnt	Proteína fosforescente cyan unida mediante dos linkers (EFGSGSGSSRGS y GSGSSGSSH) a dos secciones de dockerina de <i>Clostridium thermocellum</i>
Dock-wTa	*pET28b_docnt/wTaAt/docnt-histag	Enzima w-transaminasa de <i>Aspergillus terreus</i> unida mediante dos linkers (GSGSGS y GSSGSS) a dos secuencias de dockerinas de <i>Clostridium thermocellum</i>
Buffer 10X NZP		
dNTPs mix (10 mM)		Empleados para la mutagénesis dirigida del plásmido pET28a-cohct
NZP 2.5 U		
H ₂ O estéril		
**Cebador: Coh_deletion_TAA_F		sentido-5'- ttgggtgacgaggcctaagaattcgagctcc-3'
**Cebador: Coh_deletion_TAA_R		antisentido-5'- ggagctcgattcttaggctcgacccc-3'
Células competentes DH5α y BL21 de <i>Escherichia coli</i>		
isopropil-β-tiogalactoriranósido (IPTG)		Expresión y purificación de las proteínas
kanamicina		
Medio de cultivo LB		
Tampón TRIS		
Piruvato		
Metilbencilamina		
Acetonitrilo		Mezcla de reacción actividad transaminasa
Piridoxal fosfato		
Tampón HEPES		

*Los plásmidos fueron sintetizados por la empresa Genescrypt **Los cebadores pertenecen a la biblioteca de cebadores del Laboratorio de biocatálisis heterogénea.

4.2. Métodos

4.2.1. Producción de enzimas entrecruzadas covalentemente (CLEA)

4.2.1.1. Producción del CLEA de catalasa (CLEA-CAT/BSA).

El proceso de inmovilización en CLEA consta de tres pasos; 1) se precipitan las enzimas para formar agregados, 2) se añade un agente reticulante que permite la auto-inmovilización, posteriormente se incuba con agitación a 4 °C y 3) se realiza dos lavados. En todos los experimentos se mantuvo una relación de CAT: BSA de 1:3.

Se prepararon diferentes disoluciones de proteína (80 mg/mL, 8 mg/mL y 0.8 mg/mL) en tampón fosfato de sodio 100 mM pH 7.

Para preparar el CLEA, se agrega 100 µL de la disolución a 900µL de agente precipitante (disolución saturada de sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ o n-butanol) y se mezcla mediante agitación con vigorosa (vortex). A continuación, se añaden 50 µL de glutaraldehído a distintas concentraciones (25mM, 50mM y 100mM) a la solución de precipitación, y se deja incubar durante una hora en agitación suave. Durante ese tiempo se formaran pequeñas partículas de agregados proteicos (CLEA) que posteriormente se lavan dos veces con un 950 µL de tampón de lavado (tampón fosfato de sodio 25mM a pH 7) para quitar el exceso de glutaraldehído con el objetivo de detener el proceso de reticulación. Los lavados se llevan a cabo mediante centrifugación a 7840 x g durante 10 minutos, lo que permite la separación de los agregados de la disolución. Después de la primera centrifugación y antes del primer lavado se toma una muestra de sobrenadante (S1). Del mismo modo, después de la segunda centrifugación, y antes del segundo lavado, se toma otra muestra de sobrenadante (S2). Finalmente, los agregados lavados se incuban con 950 µL de tampón fosfato 25 mM pH7 para su almacenamiento a 4 °C en suspensión.

4.2.1.2. Producción de CLEA de catalasa y polietilenimina (PEI) (CLEA-CAT/BSA/PEI)

Para la preparación de estos agregados se disolvieron 8 mg de proteína (2 mg CAT y 6 mg BSA) en una disolución que contenía 25 mg/mL de PEI en tampón fosfato 100 mM pH 7 y se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente en el punto 4.2.1.1

4.2.1.3. Producción de combi-CLEAs de catalasa (CAT) y glucosa oxidasa (GOX) (CLEA-CAT/BSA/GOX)

Para la preparación de estos CLEAs mixtos se mantuvo la siguiente relación en masa de proteína: 1 CAT: 3 BSA: 4 GOX. Se siguió el mismo procedimiento descrito en el apartado 4.2.1.1.

4.2.1.4. Producción de CLEA de catalasa (CAT), polietilenimina (PEI) y glucosa oxidasa (GOX) (CLEA-CAT/BSA/PEI/GOX)

En este caso la preparación del CLEA se realizó en dos pasos; 1) siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 4.2.1.2 se preparó un CLEA de catalasa usando 0.8 mg/mL de proteína en el proceso de precipitación, 2) después de los lavados se adicionan 950 µL de una solución de 0.85 mg/mL de GOX en tampón fosfato de sodio 25 mM pH 7 y se dejan incubando con rotación durante 1 hora. Posteriormente se centrifugan a 7840 x g por 10 min y se toma una muestra de 100 µL a la que llamamos “S3”, decantamos el sobrenadante y el pellet resultante lo resuspedemos en 950 µL de tampón fosfato de sodio 25mM pH7 para su almacenamiento a 4° C.

4.2.2. Cuantificación de proteína en los CLEAs

Para la cuantificación de la concentración de proteína se utilizó el método de Bradford (Bradford, 1976) que se basa en el cambio de color del colorante Coomassie brilliant blue G-250 en respuesta a diferentes concentraciones de proteína. La unión de este colorante con los aminoácidos básicos y aromáticos de las proteínas provoca un cambio en el máximo de absorción desde 465 nm a 595 nm. Experimentalmente se mide la absorbancia a 595 nm y los valores resultantes se extrapolan mediante el uso de una recta de calibrado, usando BSA como proteína patrón. Esta recta de calibrado nos permiten saber la concentración de cada muestra.

Brevemente, el método consiste en añadir 200 µL de la disolución de Bradford comercial y 5 µL de una solución de BSA a distintas concentraciones (0.063-1mg/mL) en una placa multi-pocillo. La reacción colorimétrica se deja incubar 5 min antes de cada medida. Las medidas en placas multi-pocillo se realizaron en un lector de placas EPOCH de BioTek.

Para la medida de la concentración de las muestras problema, se sigue el mismo procedimiento asegurándonos de que los valores absorbancia, siempre entre dentro del rango de valores de la curva de calibrado. En el caso de que los valores sean superiores a los de la curva, se realiza diluciones de las muestras. Todas las medidas se realizan mínimamente por duplicado.

4.2.2.1. Rendimiento de precipitación

El rendimiento de precipitación es la cantidad de proteína que precipita en el CLEA después de la hora de incubación. Este rendimiento se calcula mediante la ecuación 1, que se mide con la muestra “S1” mediante el método de Bradford descrito anteriormente. Para ello previamente se calcula la concentración de proteína inicial a la que llamaremos disolución de referencia. Para preparar esta disolución se añade 100 µL de la disolución de proteína (0.8, 8 o 80 mg/mL) con la que preparamos los CLEAs a 950 µL de tampón fosfato de sodio 100 mM pH7. En el caso de las referencias de los CLEAs que contienen PEI, para preparar la disolución de referencia, la disolución de proteína no debe contener PEI. La concentración de proteína se calcula con el método de Bradford.

Ecuación 1:

$$\Psi\% = 100 - \frac{\text{concentración de S1}}{\text{concentración de referencia}} * 100$$

4.2.2.2. Rendimiento de Inmovilización

El rendimiento de inmovilización es el porcentaje de proteína efectiva que se queda formando CLEA (ecuación 2). Para calcular este porcentaje, previamente se calcula la concentración de proteína que no se une covalentemente y que se pierde durante los dos lavados “S1 y S2”. La concentración de S2 corresponde a la cantidad de proteína que ha precipitado pero que no se ha unido covalentemente, es decir, que se ha lixiviado. Se mide también por Bradford.

Ecuación 2:

$$\Psi\% = 100 * \left(\frac{\text{concentración de referencia CAT} - \text{concentración de S1} - \text{concentración de S2}}{\text{concentración de referencia}} \right)$$

4.2.2.3. Rendimiento de unión GOX

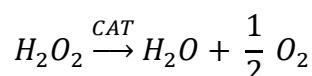
En el caso de los combi-CLEAs con GOX, se mide la cantidad de proteína que se tiene en la muestra S3 que corresponde con la cantidad de proteína de GOX que no se une al CLEA tras la incubación de una hora.

Ecuación 3:

$$\Psi\% = 100 * \left(\frac{\text{concentración de referencia GOX} - \text{concentración de S1} - \text{concentración de S2} - \text{concentración S3}}{\text{concentración de referencia}} \right)$$

4.2.3. Determinación de la actividad enzimática de la catalasa.

Para determinar la actividad enzimática se monitorizó la descomposición del peróxido de hidrógeno a lo largo del tiempo en un lector de placas multi-pocillos, midiendo la absorbancia de las muestras $\lambda = 240$ nm y usando el coeficiente de extinción $\epsilon=0.046$. La reacción enzimática que se sigue es la siguiente:



Brevemente, la medida consiste en adicionar por triplicado 5 μL de la disolución enzimática en diferentes pocillos de placas de UV, y posteriormente añadir 200 μL de una disolución de 35mM de H_2O_2 . Los valores de actividad se calcularon con la ecuación 4. Para concentraciones altas de catalasa es necesario realizar diluciones para tener cinéticas más fiables, ya que la aparición de burbujas debido a la reacción interfiere en la medida.

Ecuación 4:

$$\text{Actividad } \left(\frac{\text{U}}{\text{mL}} \right) = \frac{\frac{\text{Abs}}{\text{min}} * \text{volumen del pocillo (mL)}}{\epsilon_{H_2O_2} * \left(\frac{\text{volumen del pocillo (\mu L)}}{\text{volumen equivalente a 1 cm (360\mu L)}} \right) * \text{volumen de enzima}}$$

4.2.4 Actividad expresada de las enzimas inmovilizadas en forma de CLEAS

La actividad de las enzimas inmovilizados se mide y calcula mediante los ensayos colorimétricos anteriormente descritos, usando una suspensión de los agregados enzimáticos. La actividad medida de esta suspensión se referirá a la cantidad de proteína en esa suspensión para calcular la actividad enzimática aparente de las enzimas inmovilizadas (ecuación 5).

Ecuación 5:

$$\% \text{ Actividad específica recuperada} = \left(\frac{A_{\text{específica CLEA}}}{A_{\text{específica referencia}} * \% \Psi_{\text{inmovilización}}} \right) * 100$$

4.2.5. Integración de CLEAS en bio-generadores inorgánicos

Se depositan 12 µg de CAT inmovilizada en forma de CLEA-CAT en la superficie de un disco piezoeléctrico. Brevemente, se depositó el volumen de suspensión de CLEA necesario para obtener la cantidad deseada de enzima en el centro del disco. Posteriormente, se sometió a un proceso de desecación mediante el uso de un desecador a vacío y temperatura ambiente durante 1 hora. Finalmente se pegó con silicona una columna plástica de 1.5 cm de alto y 1 cm de diámetro para crear el reservorio de reacción.

4.2.6. Caracterización funcional de los CLEAS integrados en un bio-generador inorgánico

El disco piezoeléctrico modificado y sin modificar con los CLEAs se conecta a un oscilloscopio (Siglent, modelo SHS806) que permite el registro del voltaje en circuito abierto en función del tiempo. Todas las medidas se realizaron con un volumen final de 400 µL.

Para las medidas de las enzimas libres se utilizaron piezos no modificados, es decir sin CLEA, a los cuales se les añadió 392.3 µL de tampón fosfato 50 mM pH 7. Previamente a la reacción enzimática se equilibró el sistema hasta tener un voltaje de salida sea entorno 0 ± 10 Voltios. Posteriormente se añadieron 1.3 µL de una solución madre de H₂O₂ al 70% (29.81 M) y 6 µL de catalasa a 2 mg/mL, y se registró la medida de voltaje abierto a lo largo del tiempo. El mismo bio-generador se lavó con agua destilada para repetir cada medida por triplicado y así tener datos significativos. Como control negativo, el generador bio-inorgánico se operó de igual manera (con 398.7 µL de tampón fosfato 50 mM pH 7) pero sin añadir catalasa para demostrar que la señal eléctrica es producida por el borboteo generado enzimáticamente.

Para los CLEAS depositados, se procede de forma similar, adicionando cuidadosamente 398.7 7 µL de tampón fosfato 50 mM pH7. En primer lugar se espera estabilizar el voltaje de salida para posteriormente añadir 1.3 µL de H₂O₂. (Velasco-Lozano, et al., 2018a) Una vez terminado el ciclo de reacción se retira el volumen de la columna

cuidadosamente evitando que el CLEA se desprenda de la base del piezoelectrónico. Todas las muestras con CLEA se lavan como máximo con tres volúmenes de 200 µL de agua destilada para eliminar los restos de peróxido de hidrógeno y otros subproductos. Se repite la medida las veces que sea posible, hasta que la adición de peróxido de hidrógeno ya no genere ninguna señal eléctrica.

4.2.7. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Para la observación de la morfología de los CLEAs se utilizó la microscopía electrónica de barrido (SEM del inglés “Scanning Electron Microscope”). Para ello previamente se lavaron con tres volúmenes de H₂O y se mandaron al servicio de microscopía del Instituto de Nanociencia de Aragón (INA), donde se recubrió la superficie de las muestras con una capa de grafito para su análisis.

4.2.8. Mutagénesis dirigida

La mutagénesis dirigida o “quick change” es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, de las siglas en inglés *polymerase chain reaction*) que permite cambiar, delecciónar o introducir nucleótidos en secuencias de ADN. Uno de los pasos más importantes de esta técnica es la selección de los cebadores, estos deben tener una longitud de 25-35 pares de bases y del 40-60% de GC, además debe tener en el centro de su secuencia la mutación a introducir.

Para realizar la PCR se preparan dos tubos de plástico de 0.5 mL, uno de ellos con el cebador directo y el otro para el cebador reverso. A cada uno de los tubos de plástico se añaden 5 µL del tampón NZP 10X, 1 µL de dNTPs mix (10 mM), 1 µL del plásmido modelo, 0.5 µL de ADN polimerasa NZP (5 U/µL), 0.5 µL del cebador correspondiente y 42 µL de H₂O estéril. El programa de PCR utilizado se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Condiciones mutagénesis dirigida

Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	Ciclos
98	5	1
98	1	30
55	0.5	30
72	6.5	30
72	10	1

Después de la PCR se cogen 15 µL de cada uno de los tubos y se realiza una digestión rápida del plásmido modelo con la enzima de restricción DpnI. Para ello a la mezcla final se le añade 5 µL de tampón 10X de digestión rápida DpnI y 2 µL de DpnI. Esta mezcla se incuba en el termociclador durante 5 minutos a 37 °C, seguidamente se realiza la inactivación de DpnI a 80 °C durante 5 minutos. Finalmente los dos fragmentos de ADN digeridos se mezcla en una relación 1:1 (v:v) y se incuban a 90 °C durante 15 minutos para facilitar la desnaturación de las hebras de ADN. En último paso, la mezcla de las dos cadenas de ADN se incuban 1 hora a temperatura ambiente para permitir que las hebras de ADN renaturalicen lentamente.

4.2.9. Transformación

Los fragmentos de ADN obtenidos del protocolo de mutagénesis dirigida se transformaron en células competentes de *Escherichia coli* DH5α, esta cepa posee una alta estabilidad de inserción, además de un alto rendimiento y calidad de ADN. Para ello, se adicionan 5 µL de plásmido a un tubo de plástico de 50 µL de células competentes, la mezcla fue incubada 20 minutos en hielo, posteriormente se realiza un choque térmico que consta de 45 segundos a 42 °C seguido de una incubación de 2 minutos en hielo. Al cabo de este tiempo se añaden 700 µL de medio LB y la mezcla se incuba durante 1 hora a 37 °C y 250 rpm. Después de la incubación se centrifuga durante 1 minuto a 3136 x g y se retiran 600 µL del sobrenadante, el volumen restante se resuspende suavemente y se siembra sobre una placa de Petri de agar-LB suplementado con el antibiótico correspondiente para finalmente incubar las placas durante toda la noche a 37 °C.

4.2.10. Obtención y cuantificación de plásmido

En primer lugar se preparan pre-inóculos en tubos estériles de 15 mL a los que se les adiciona 3mL de medio LB, 3 µL de antibiótico (solución madre 1000X) y se añade una colonia procedente de la placa Petri. Estos tubos se dejan incubando durante toda la noche a 37 °C y 250 rpm. Este proceso se realiza con 5 colonias diferentes para cada plásmido. Todo el proceso se realiza en campana de flujo laminar.

La obtención del plásmido se realiza a través de un kit comercial “Mini-prep” (Metabion). En primer lugar se deben recolectar las células obtenidos durante el cultivo de los pre-inóculos. Para ello, los pre-inóculos se centrifugan a 7840 x g durante

2 minutos y se elimina el sobrenadante. El pellet resultante se utiliza para obtener el ADN plasmídico mediante un método de purificación de ADN comercial de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

Una vez se ha purificado los plásmidos correspondientes, la cantidad de ADN en cada muestra se cuantifica mediante la medida de absorbancia característica a 280 nm, para esta medida se empleó el lector de placas multipocillo con la placa Take3, además se evalúa la calidad del ADN obtenido a través del cálculo de del ratio de absorbancia a 260/280 nm

4.2.11. Secuenciación

La secuenciación de los plásmidos obtenidos tras la mutagénesis dirigida fue realizada por el servicio de secuenciación del Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA). Los resultados obtenidos fueron analizados con los programas Finch TV (<https://finchtv.software.informer.com/1.4/>) y ApE (<http://en.bio-soft.net/plasmid/ApE.html>.)

4.2.12. Expresión de las proteínas

Para la expresión de las proteínas, se transformó el plásmido de interés en células competentes de *Escherichia coli* BL21, cepa optimizada para la expresión de proteínas a partir del promotor T7 por inducción de isopropil-β-tiogalactoriranósido (IPTG), siguiendo el protocolo descrito en el apartado 4.2.9 con la variante de que solamente se añade 1 μL de plásmido circular a una alícuota de 50 μL de células competentes.

Primeramente, se crece un pre-inóculo de 3mL en el medio de cultivo adecuado y con la resistencia precisa a partir de una de las colonias obtenidas en los experimentos de transformación. Para la expresar la proteína, se cultivó un volumen de 50 mL de medio LB en un matraz de 250 mL dopado con 30 μg/mL del antibiótico correspondiente (en todos los casos kanamicina) e inoculado con 1 mL de pre-inóculo. En primer lugar, el cultivo se incubó a 37 °C y 250 rpm hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm (DO) de 0.6 (aproximadamente 2 horas). Una vez alcanzada la DO adecuada, el cultivo se indujo con IPTG y se deja incubando a 250 rpm según las características óptimas para cada plásmido (Tabla 4).

Tabla 4. Condiciones óptimas de inducción

Código	Plásmido	T. (°C)	IPTG óptimo	Tiempo. de inducción óptimo
Coh-His	* pET28a-coh-histag	37 °C	1 mM	3 horas
Dock-Cian	*pET28b_docnt/ECFP/docnt	37 °C	1 mM	3 horas
Dock-wTa	*pET28b_docnt/wTaAt/docnt-histag	21 °C	0.1 mM	Toda la noche

Pasado el tiempo de inducción se traspasa el cultivo a un tubo de centrifuga y se centrifuga a 12096 x g durante 30 min a 4 °C, se decanta el sobrenadante y finalmente se guarda el pellet a -20 °C para su uso en estudios posteriores.

4.2.13. Gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para saber si las proteínas de interés se expresan de forma soluble se realiza un análisis electroforético en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (en inglés SDS-PAGE)

Previamente a cargar las muestras en el gel, el pellet obtenido se resuspende en 5 mL de tampón TRIS 25 mM pH7. Posteriormente se realiza el lisado de las células mediante sonicación con ultrasonidos (Bondelin Somo plus) durante 20 minutos con pulsos de 5 segundos de sonicación a una amplitud del 40%. Una vez finalizado este proceso, se coge una alícuota de 30 µL para realizar el gel de electroforesis. Posteriormente, el extracto crudo sonificado se centrifuga a 7840 x g durante 20 min y el sobrenadante se traspasa a un tubo nuevo para su almacenamiento a 4 °C. Previamente se coge una alícuota de ese sobrenadante (“fracción soluble o extracto crudo”) para su posterior análisis por electroforesis.

Las muestras de electroforesis se preparan mezclando 15 µL de cada alícuota obtenida como se ha descrito arriba y 15 µL de tampón de ruptura y la mezcla se sumerge a 100°C durante 5 min para desnaturalizar las proteínas. Finalmente, se cargan 10 µL de cada muestra en cada carril del gel se corre el gel a 100 mV hasta que las proteínas pasan el gel de empaquetamiento y a 150 mV cuando las proteínas se encuentran en el gel de resolución. Para determinar el peso molecular de las proteínas analizadas, se cargan también una muestra que contienen un patrón de pesos moleculares.

4.2.14. Purificación mediante cromatografía de afinidad

Las resinas de agarosa activadas con quelatos de cobalto se emplean para purificar proteínas etiquetadas con colas de poli-histidina. Esta técnica se conoce como de cromatografía de afinidad de metal inmovilizado reticulado (IMAC) y emplea los metales divalentes inmovilizados para unirse mediante un enlace de coordinación a histidinas de manera específica

Brevemente, el proceso de purificación consiste en una suspensión de 100 mg de una resina de cobalto comercial mezclado 1 mL de extracto crudo soluble obtenido por sonicación y posterior centrifugación. Esta suspensión se incuba en rotación durante 1 hora a 4 °C. Pasado este tiempo, la suspensión se filtra a vacío y el sobrenadante (flujo atreves) se guarda para su posterior análisis electroforético. A continuación, la resina se lava con 5 volúmenes de tampón TRIS 25 mM pH7, y finalmente tras el último lavado se añade 1 volumen de imidazol 300 mM en tampón TRIS 25 mM pH7 y se deja nuevamente incubando con rotación durante 1 hora a 4 °C. Finalmente se recoge el eluido que contiene la proteína purificada. Se guarda a 4 °C.

4.2.15. Ensamblaje en fase sólida de andamios Coesina-Dockerina artificiales: Dock-Cian

Para inmovilizar y construir andamios proteicos sobre resina de agarosa-IDA-Cobalto es necesario que una de las proteínas contenga una etiqueta de poli-histidinas y a su vez que posea un dominio cohesina complementario a un dominio dockerina fusionado a una segunda proteína.

La inmovilización de la primera proteína etiquetada con una cola de poli-histidina se realiza de forma similar a la de una purificación IMAC pero evitando el paso de elución. Un extracto crudo de la proteína Coh-His codificada en el plásmido pET28a-coh-histag, se incuba con la resina agarosa IDA-Cobalto activada (al 10%) durante 1 hora y se lava con 5 volúmenes. Se almacena a 4 °C.

Para la construcción del andamio molecular, el extracto crudo de una segunda proteína etiquetada con un dominio dockerina (Dock-Cian) se incuba con la resina que contiene inmovilizada la proteína Coh-His en una relación 1:10 (p:v) en presencia de diferentes concentraciones de CaCl₂ (0.1-10 mM), y imidazol (0-50 mM) para evitar adsorciones inespecíficas de la segunda proteína. Esta incubación se lleva a cabo

durante una hora con rotación a 4 °C. Después de la hora se filtra la suspensión a vacío y se recoge el sobrenadante. Finalmente, la resina se lava con 5 volúmenes de tampón TRIS 25 mM pH7 y CaCl₂ (se guarda una alícuota de 50 µL de la resina con el ultimo lavado). Para eluir y desensamblar el andamio molecular, la resina fue incubada con 1 volumen de imidazol 300 mM y CaCl₂ en tampón TRIS 25 mM pH 7. La muestra eluida se analizó por electroforesis y se guardó a 4 °C para estudios posteriores.

4.2.16. Medida de Fluorescencia Dock-Cian

Para cuantificar los efectos que produce la adición de 50 mM de imidazol y 1 mM de CaCl₂ en la inmovilización de Dock-Cian, se realizó los espectros de fluorescencia de las muestras de extracto crudo soluble, flujo a través y eluido final), con los cuales se calculó la diferencia de absorbancia a la longitud emisión máxima (λ_{em} = 480 nm) tras la excitación a λ = 430 nm (ecuaciones 6). Debido a que la proteína Dock-Cian es la única que presenta fluorescencia, la diferencia de absorbancia será proporcional a la cantidad de proteína presente en cada muestra.

$$\text{Ecuación 6: } \% \Psi \text{ Inmovilización} = 100 - \frac{\text{Fluorescencia eluido final}}{\text{Fluorescencia extracto crudo soluble}} * 100$$

$$\text{Ecuación 7: } \% \text{ eluido vs inmv} = \frac{\text{Fluorescencia eluido final}}{\Psi \text{ Inmovilización} * \text{Fluorescencia extracto crudo soluble}} * 100$$

4.2.17. Ensamblaje en fase sólida de Dock-wTa

Para la construcción del andamio Coh-His- Dock-wTa se sigue el mismo procedimiento que en el apartado 4.2.15 con la condición óptima de cloruro de calcio y sin imidazol inicial (no posee etiqueta de poli-histidinas).

4.2.18. Medidas de la actividad transaminasa

La actividad transaminasa se sigue por absorbancia en ultravioleta a λ = 245 nm. Para esta medición se prepara una mezcla de reacción que contiene 4.927 µL de Tampón HEPES 100 mM pH 8, 13.3µL de piruvato 0.75 M, 10 µL de una mezcla que contiene (12.8 µL de metilbencilamina y 87.2 µL de acetonitrilo), 50 µL de piridoxal fosfato (PLP).

Las medidas de actividad se realizan en placas multi-pocillo, donde se adicionan 200 µL de la mezcla de reacción a 5µL de enzima.

5. Resultados

En este trabajo se plantea la inmovilización de enzimas sobre materiales piezoeléctricos, permitiendo así el reúso de los bio-generadores inorgánicos en varios ciclos de generación de energía. Para ello nos planteamos dos estrategias de inmovilización de enzimas que permiten orientar a las enzimas en diferentes posiciones con respecto al material piezoeléctrico: inmovilización aleatoria (en forma de CLEAs) (Fig. 4) e inmovilización ordenada (en andamios moleculares cohesina dockerina) (Fig. 5). Estos dos tipos de organización de las enzimas inmovilizadas, buscan lograr una ventaja en la eficiencia de conversión de la energía mecánica (burbujas de gas producidas por las enzimas) en energía eléctrica (función que lleva a cabo el material piezoeléctrico)

5.1. Inmovilización aleatoria de enzimas

5.1.1. Producción de CLEA-CAT

La primera versión de bio-generadores inorgánicos utilizados en este trabajo se encuentran compuestos por la catalasa (CAT), una enzima capaz de descomponer el peróxido de hidrógeno en oxígeno (en forma de burbujas de gas) y agua. Para inmovilizarla como en agregados enzimáticos entrecruzados de forma aleatoria (CAT-CLEA), tomamos como referencia el trabajo descrito por el grupo de (Mafra, et al., 2016) donde optimizaron la preparación de CLEAs de esta enzima.

5.1.1.1. Agente precipitante

Siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 4.2.1.1. El primer parámetro estudiado fue el efecto del agente precipitante en la actividad específica inmovilizada de los agregados enzimáticos. Puesto que en el artículo de referencia (Mafra, et al., 2016) se realizó un estudio de agentes precipitantes con distintos grupos funcionales tales como polietilenglicol, dimetoxietano, acetona, tert-butanol y sulfato de amonio; nosotros comparamos el mejor agente precipitante descrito (sulfato de amonio) y un agente precipitante utilizado anteriormente en el grupo de investigación para la preparación de CLEAs (n-butanol). Probamos la eficacia de ambos agentes precipitantes al 50% y al 90 % en la preparación de los CAT-CLEAs (Tabla 5).

Tabla 5. Parámetros de inmovilización de CAT-CLEA con diferentes agentes precipitantes.

Agente Precipitante (AP)	AP (%)	Proteína precipitada ^a (%)	Ψ ^b (%)	Actividad específica (U/mg)	Ae _i ^c (%)
(NH ₄) ₂ SO ₄	50	89	88	14.1	3
(NH ₄) ₂ SO ₄	90	96	93	66.0	15
n-butanol	50	100	91	2.11	0.4
n-butanol	90	99	99	21.6	4

*AP(%)= Porcentaje de agente precipitante. ^a Porcentaje de proteína precipitada = 100 – $\left(\frac{\text{Concentración de proteína en S1}}{\text{concentración de proteína inicial}}\right) * 100$.^b Rendimiento de inmovilización

$$\Psi\% = 100 * \left(\frac{\text{concentración de referencia CAT} - \text{concentración de S1} - \text{concentración de S2}}{\text{concentración de referencia}} \right).$$

Actividad específica inmovilizada está calculada a partir de la actividad específica inicial 531.1 ± 54.5 U/mg de proteína total (CAT/BSA 1:3)

$$\% \text{ Actividad específica inmovilizada} = \frac{A_{\text{específica CLEA}}}{A_{\text{específica referencia}} * \% \Psi_{\text{inmovilización}}} * 10000.$$

Todos los CLEAs se entrecruzaron con 50 mM de GA y 0.8 mg/mL de proteína final.

Para continuar con los siguientes experimentos, seleccionamos al sulfato de amonio al 90% como agente precipitante, ya que permitió lograr la mayor actividad recuperada en los CAT-CLEA con rendimientos de inmovilización mayores al 90%.

5.1.1.2. Concentración de Glutaraldehído

En esta etapa, evaluamos el efecto de la concentración de GA en el paso de entrecruzamiento de los CLEA-CAT/BSA (Fig. 6 A). Las tres concentraciones probadas lograron rendimientos de inmovilización mayores al 95%, mientras que la mayor actividad específica inmovilizada se obtuvo con 50 y 100 mM de GA. Por este motivo, seleccionamos 50 mM de GA como concentración óptima de agente entrecruzante para la producción de CAT-CLEA.

5.1.1.3. Concentración de proteína inicial

En este apartado estudiamos el efecto de la concentración de proteína inicial en el rendimiento de inmovilización y actividad específica inmovilizada de los CLEA (Fig. 6 B). Se escogió 0.8 mg/mL de proteína final como concentración óptima de proteína ya que permitió obtener iguales rendimientos de inmovilización y actividad específica

recuperada que el de 8 mg/mL, y nos permitía tener CLEA con un tamaño de partícula más homogéneo (entre 55.4 ± 8.3 nm para CLEAs sin PEI y 50.18 ± 7.4 nm para CLEAs con PEI (Fig. 2 (anexos)).

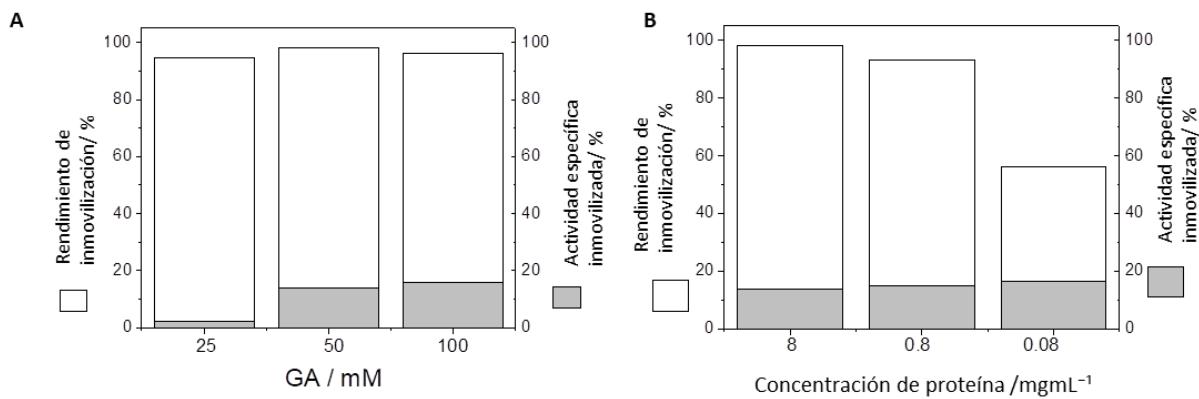


Figura 6. Efecto de la concentración de glutaraldehído y la proteína inicial en los CAT-CLEA. **A.** Efecto de la concentración de GA, todos los CAT-CLEA preparados a 0.8 mg/mL de proteína inicial. **B.** Efecto de la concentración de proteína inicial, todos los CAT-CLEA preparados a 50 mM de GA.

5.1.1.4 Producción de CLEA-CAT/BSA/PEI

Una vez optimizada la producción de los CLEAs, el objetivo es ensamblar el biocatalizador sobre el material piezoelectrónico.

Para mejorar la adsorción del CLEA a la superficie del material piezoelectrónico se propone producir CLEAs dopados con polietilenimina (PEI); un polímero ramificado catiónico. De este modo se podrá formar complejos polielectrolito-proteína de carga positiva favoreciendo una mayor interacción iónica con la superficie de óxido de silicio (SiO_2) que recubren el material piezoelectrónico. (Cooper, et al., 2005).

Para producir el CLEA se siguió el procedimiento descrito en el apartado 4.2.1.2. Al introducir la PEI como parte del CAT-CLEA se obtienen los mismos rendimientos de inmovilización, sin embargo la actividad específica recuperada del CAT/PEI-CLEA es 3 veces menor (Fig. 7).

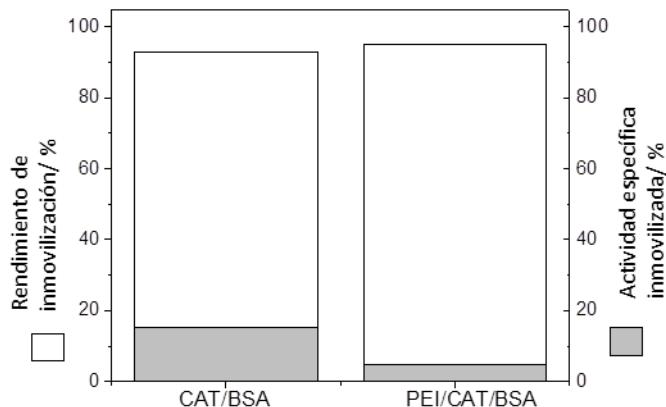


Figura 7. Efecto del PEI en la preparación de CLEA-CAT/BSA. Todos los CLEA se prepararon con sulfato de amonio saturado al 90%, 0,8 mg/mL de proteína final, 50 mM de GA. La concentración de PEI utilizada fue de 25 mg/mL.

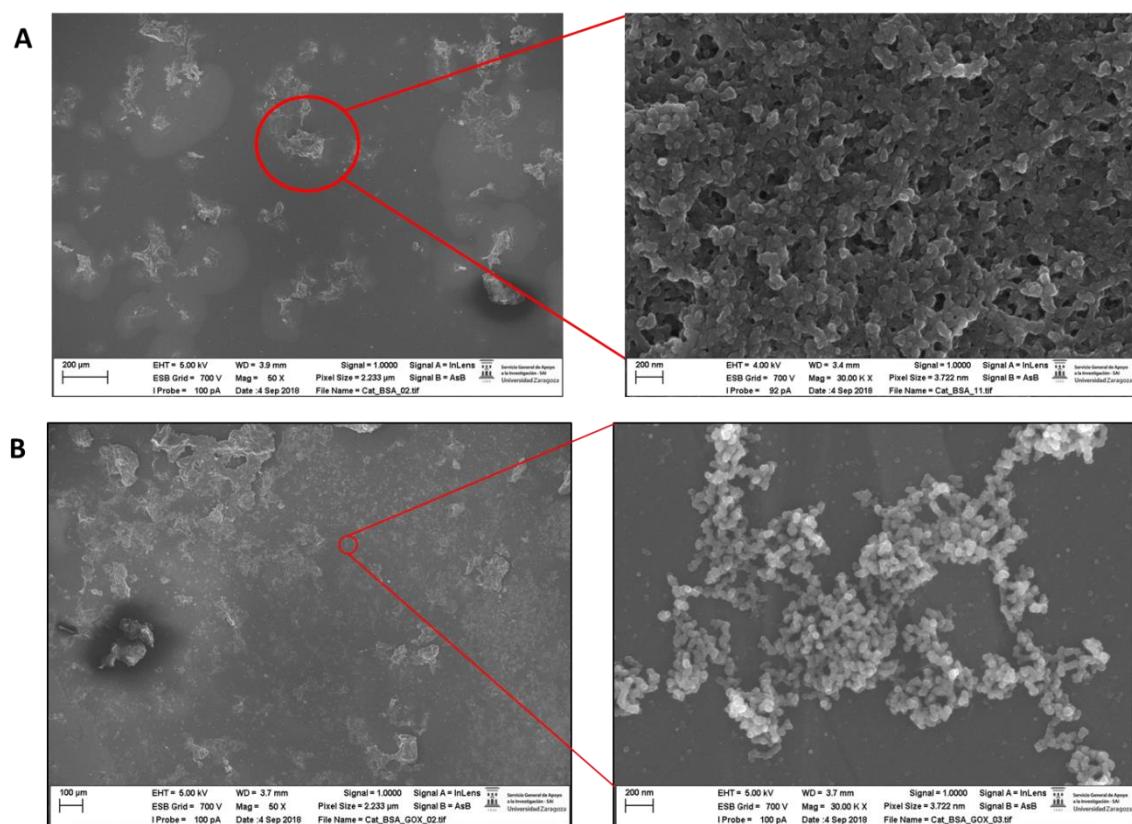
5.1.1.5. Producción de combi-CLEAs: CAT/BSA/GOX y CAT/BSA/PEI/GOX

Debido a que el peróxido de hidrógeno no es el combustible renovable ideal, y en vista a una posible aplicación industrial, procedimos con el acoplamiento de la catalasa con oxidases, una familia de enzimas que generan peróxido de hidrógeno *in situ* como subproducto de la oxidación de otros combustibles renovables como la glucosa. (Velasco-Lozano, et al., 2018a)

Para esto fabricamos un combi-CLEA que contenía agregadas las CAT y GOX junto con la PEI y la proteína BSA. Este combi-CLEA será capaz de oxidar la glucosa a ácido glucónico por acción de la GOX, generando como sub-producto peróxido de hidrógeno que es descompuesto de forma concurrente a agua y oxígeno por acción de la CAT. Esta cascada enzimática es capaz de generar burbujas que activan el material piezoeléctrico para producir energía. Además, se preparó una arquitectura adicional mediante un proceso en dos etapas. En primer lugar, se forma y se entrecruza el CLEA CAT/BSA/PEI, que posteriormente se incuba con una solución de GOX favoreciendo la inmovilización de la GOX en la superficie más exterior de este CLEA. Esta segunda inmovilización es posible gracias a los grupos reactivos tanto de la PEI como del glutaraldehído que quedaron remanentes y no han intervenido en los procesos de agregación y entrecruzamiento.

5.1.1.6. SEM

Mediante la microscopía electrónica de barrido (SEM) fuimos capaces de caracterizar la morfología de los distintos tipos de CLEAs producidos en este trabajo. En la figura 8, podemos observar que la distribución de las partículas de CLEA depende de la composición de cada CLEA. En todos los casos la adición de PEI da lugar a partículas de CLEA de mayor tamaño. Hay que destacar que los CLEAs que co-inmovilización CAT y GOX dan lugar a partículas mucho más homogéneas de morfología esférica y menor tamaño. Cuando el CLEA CAT/BSA/PEI se recubre con GOX después del proceso de agregación y entrecruzamiento, la porosidad del material cambian significativamente, dando lugar a estructuras menos porosas y más compactas, donde no se observan macroporos (dimensiones micrométricas) como ocurre en el caso de los CLEAS CAT/BSA (Fig. 8).



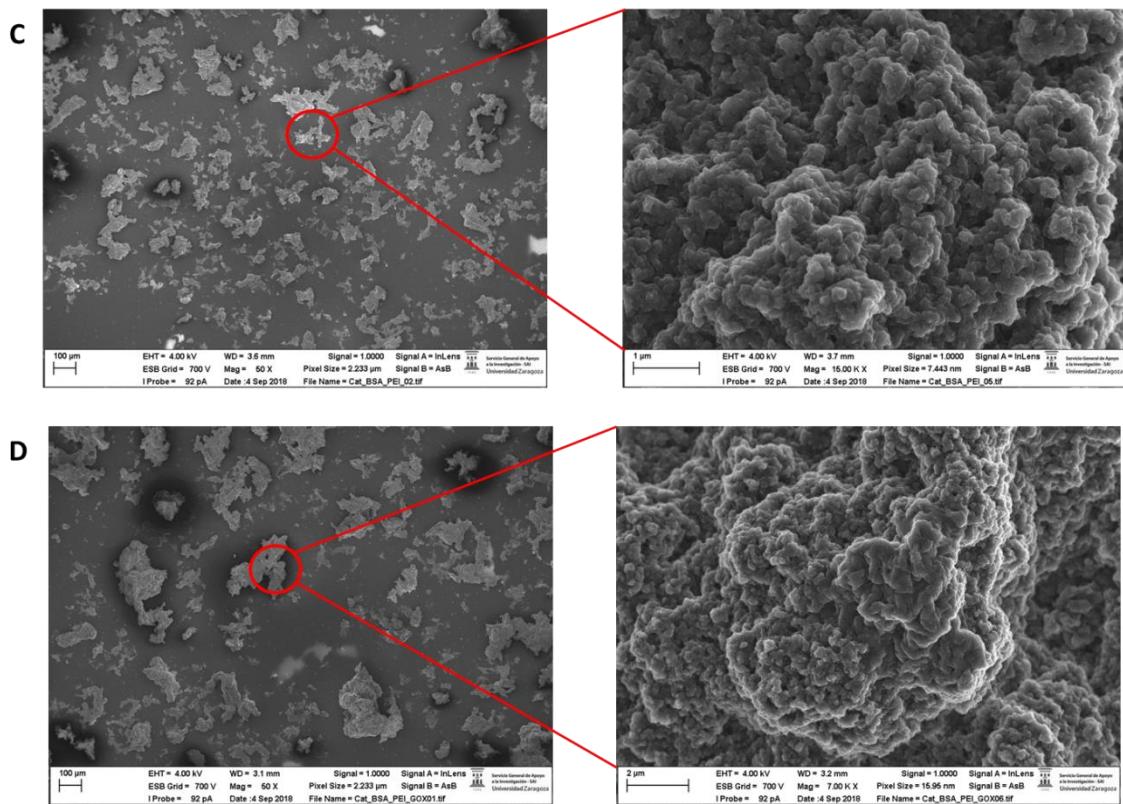


Figura 8. Imágenes SEM. **A.** CLEA-CAT/BSA a la izquierda amplificación X 50, a la derecha amplificación X 3000k. **B.** CLEA-CAT/BSA/GOX a la izquierda amplificación X50, a la derecha amplificación X 3000k. **C.** CLEA-CAT/BSA/PEI a la izquierda amplificación X 50, a la derecha X 1500k. **D.** CLEA-CAT/BSA/PEI/GOX a la izquierda amplificación X 50, a la derecha amplificación X 7000k.

5.1.2. Respuesta energética: Bio-generadores inorgánicos

Una vez encontradas las condiciones óptimas de preparación de los CAT-CLEA (apartado 5.1.1.3.), se fabricó el bio-generador inorgánico como se describe en el apartado 4.2.6. (Fig. 4 A).

La energía generada se miden mediante un osciloscopio en modo de circuito abierto y se calcula siguiendo la ecuación 6 descrita en (Velasco-Lozano, et al., 2018a).

$$\text{Ecuación 8: } E = \int_{t_1}^{t_2} \frac{V^2(t)}{R} dt$$

Donde E es la energía eléctrica generada, V es el voltaje generada desde el inicio (t_1) hasta el fin (t_2) de un ciclo, a una carga de resistencia constante R, cuyo valor se fijó en 60Ω (valor experimental determinado a la máxima tensión producida por enzimas)

Tabla 6. Producción de energía eléctrica por bio-generadores inorgánicos con biocatalizadores en forma soluble e inmovilizados.

Biocatalizador	^a Energía / nJcm ⁻²
CAT-Libre	1.64
CLEA-CAT-BSA	1.41
CLEA-CAT-BSA-PEI	1.53

Energía producida por 12 µg de CAT con 100 mM H₂O₂ en 400 µL de volumen de reacción.^a
La energía se calcula de acuerdo con la ecuación E = $\int_{t_1}^{t_2} \frac{V^2(t)}{R} dt$

La inmovilización de las enzimas en forma de CLEA no mostró un efecto negativo considerable en la generación de energía por superficie, comparado con el sistema que integra la enzima soluble (Tabla 6).

Posteriormente, se estudió de la capacidad del bio-generador inorgánico de producir energía tras ciclos de generación consecutivos. Este estudio fue realizado tanto para el CLEA-CAT/BSA como para el CLEA-CAT/BSA/PEI. El porcentaje de energía producida por los CLEA-CAT/BSA desciende por debajo del 50% tras el primer uso, manteniéndose constante en el resto de ciclos de generación (Fig. 9 gris oscuro). Por el contrario, los CLEA-CAT/BSA/PEI consiguieron recuperar una energía superior al 50% de la inicial durante los primeros tres ciclos de uso. La Tabla 6 muestra que la energía producida en el primer ciclo de generación usando el CLEA-CAT/BSA/PEI absorbido a la superficie del piezoeléctrico es ligeramente inferior (93%) a la energía producida por sistema que usa la enzima en disolución. En los sucesivos reusos se observa que el segundo ciclo de generación, el sistema que integra el CLEA dopado con PEI consigue un 80% de la energía inicial (1.22 nJcm⁻²) mientras que en el tercer genera un 60% de la inicial (0.92 nJcm⁻²). Por el contrario, los CLEAS que no incorporan PEI, generan ya en el segundo ciclo una energía 50% menor que en el primer ciclo. No obstante, estos bio-generadores inorgánicos que integran CAT inmovilizada se han podido reusar hasta 6 veces manteniendo más del 40% de la respuesta eléctrica inicial. Por tanto, estos resultados demuestran que la PEI promueve la inmovilización de los biocatalizadores sobre el material piezoeléctrico, permitiendo la reutilización los bio-generadores inorgánicos en ciclos consecutivos de generación eléctrica.

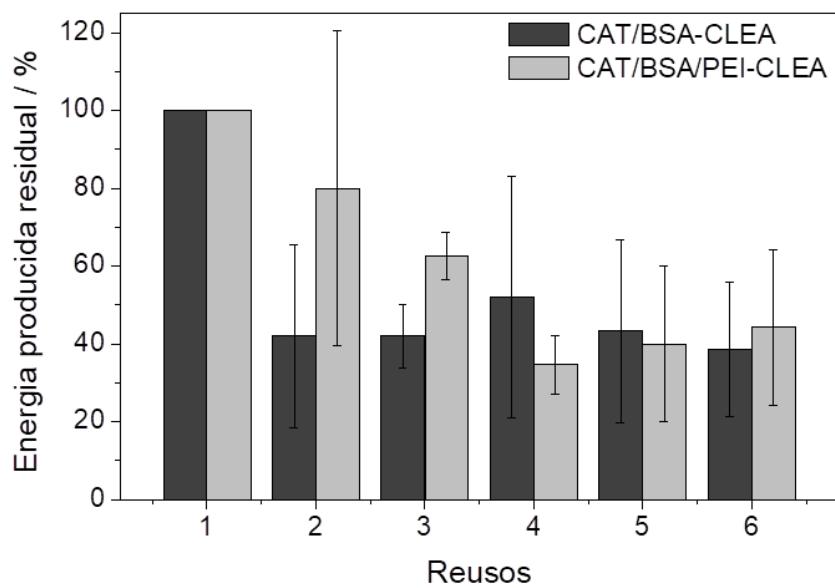


Figura 9. Energía producida por bio-generadores inorgánicos tras usos consecutivos. Las condiciones de medición fueron 12 µg de catalasa en forma de CLEA, 100 mM de H₂O₂ en tampón fosfatos 50 mM pH 7. El volumen total de reacción para todos los experimentos fue de 400 µL.

Como se explicó en el apartado 4.1.1.5. Preparamos combi-CLEAs compuestos de las enzimas catalasa y glucosa oxidasa para poder proveer una fuente de peróxido de hidrógeno a partir de combustibles renovables como la glucosa. Se probaron dos procedimientos de inmovilización distintos. El primero de ellos mediante el entrecruzamiento de GOX con CAT/BSA, este tipo de inmovilización disminuye considerablemente la capacidad de generar energía en comparación con las correspondientes enzimas en disolución (Fig. 10). El segundo procedimiento para formar el combi-CLEA consta de una primera etapa de formación de un CLEA-CAT/BSA/PEI y la posterior adición de GOX que permite su inmovilización a través de interacciones iónicas con la PEI y los grupos aldehído remanentes después del paso de entrecruzamiento. Este procedimiento recupera una mayor actividad en la GOX inmovilizada, posiblemente debido a que la enzima solamente interacciona con aquellos grupos presentes en la superficie de los agregados pre-existentes, sin sufrir modificaciones no deseadas debido a la modificación química no selectiva que ocurre en el paso de entrecruzamiento. Esto puede explicar que esta arquitectura GOX CAT tenga una respuesta más eficiente en el bio-generador inorgánico (Fig. 10).

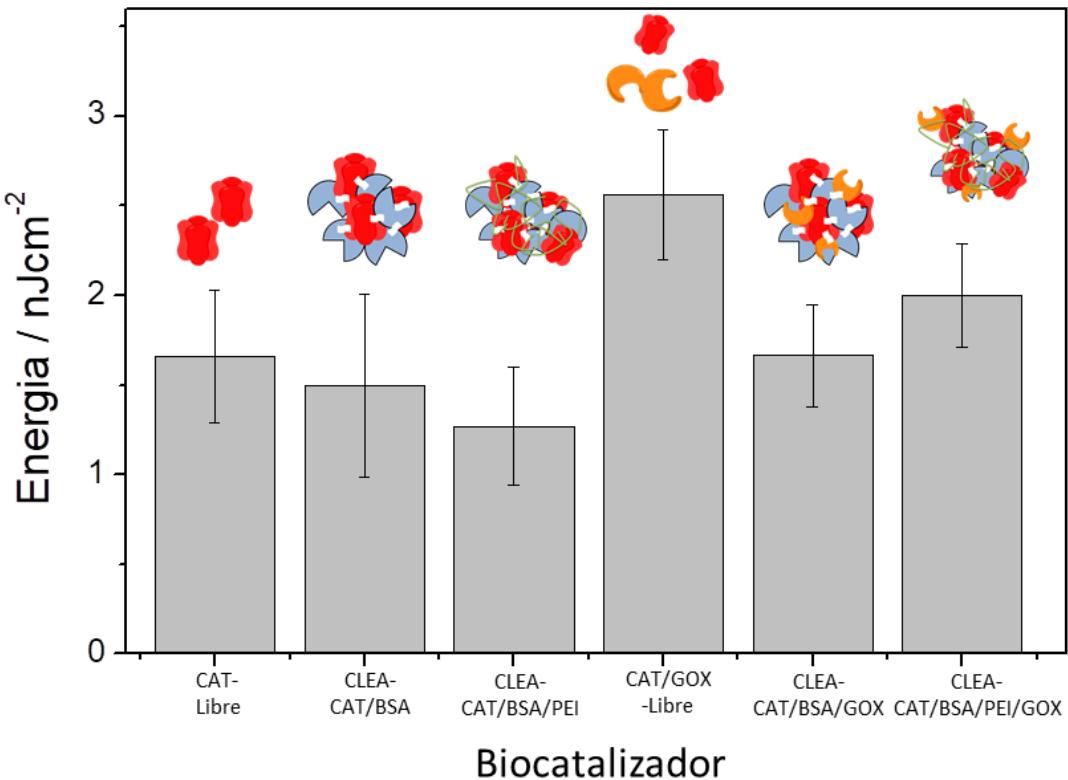


Figura 10. Energía producida por en el primer eso por los distintos sistemas. En el caso de los CLEAs CAT/BSA/GOX y CAT/BSA/PEI/GOX se añade 117 mM de glucosa al medio de reacción y 50 mM de H_2O_2 . El volumen total de reacción para todos los experimentos fue de 400 μL .

La energía eléctrica producida por la catalasa en forma soluble es similar a la que se genera con los sistemas inmovilizados, alrededor de 1.5 nJ/cm^2 , de manera que la catalasa inmovilizada en forma de CLEA permite el acoplamiento de esta enzima sobre la superficie del material piezoeléctrico, permitiendo la reutilización del bio-generador inorgánico varios ciclos de generación (Fig. 9). Cuando incorporamos a la GOX al bio-generador inorgánico, observamos 1.6 veces mayor energía producida por el sistema, debido a la generación *in situ* de más peróxido de hidrógeno proveniente de la glucosa. Sin embargo, cuando no podemos generar la misma respuesta eléctrica que genera el par enzimático en solución. No obstante, estos estudios demuestran que la unión de la GOX sobre la PEI de los CAT/PEI-CLEAs genera una mayor respuesta eléctrica que aquellos CLEAs donde la GOX y la CAT son co-agregadas y entrecruzadas de manera simultánea (Fig. 10).

5.2. Inmovilización ordenada de enzimas

5.2.1. Diseño y expresión de andamios proteicos basado en celulosoma

Los ensamblajes enzimáticos basados en celulosomas o andamios proteicos permiten controlar la disposición espacial de varias enzimas a la vez. La idea es que esta organización espacial permita mejorar la eficiencia catalítica de los agregados enzimáticos, sobre todo en aquellos casos donde dos o más enzimas necesitan trabajar en tándem. Este es el caso de los sistemas oxidasa/catalasa donde el peróxido de hidrógeno generado por la oxidasa debe ser inmediatamente utilizado por la CAT vecina. A su vez, estos andamios aportarán versatilidad a los bio-generadores con respecto al combustible utilizados, puesto que una vez se obtengan las construcciones genéticas, están podrán servir de andamio para integrar otros sistemas multi-enzimáticos que conviertan combustibles químicos en gases, bajo condiciones de saturación (donde se produce el burbujeo).

5.2.2. Diseño y síntesis de plásmidos

El plásmido pET28a-cohct perteneciente a la biblioteca de plásmidos del laboratorio de biocatálisis heterogénea (Universidad de Zaragoza) codifica para una Cohesina de tipo II de *Clostridium thermocellum*, a la que denominamos Coh. Este plásmido posee un codón de parada previo a la secuencia que codifica para 6 histidinas en el extremo 3', que da lugar a un domino cohesina sin etiqueta de poli-histidinas, lo que dificulta su purificación y ensamblaje en fase sólida (Figura 11).

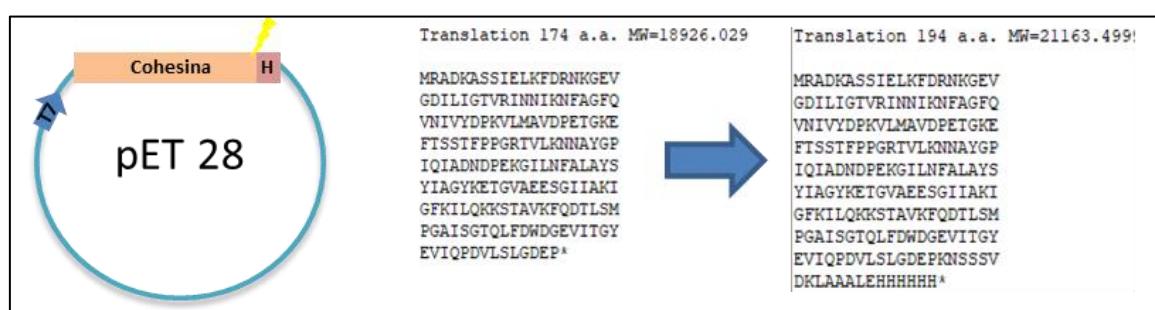


Figura 11. Diseño de plásmidos pET28a-cohct que posee una cohesina junto a la etiqueta de poli-histidinas. A la derecha se muestra el efecto en la traducción de los genes antes y después de las correspondientes mutaciones.

Para meter en fase de lectura abierta a esta etiqueta de poli-histidinas, se realizó mutagénesis dirigida del plásmido pET28a-cohct como se detalla en el apartado 4.2.8.

utilizando los cebadores Coh_deletion_TAA_F y Coh_deletion_TAA_R para delecciónar una base nitrogenada (timina), que da como resultado un gen que expresa el domino Coh etiquetado con 6 His en su C-terminal. Los plásmidos resultantes de la mutagénesis dirigida asistida por PCR, fueron secuenciados para comprobar que la delección había tenido lugar, sin que el plásmido hubiese sufrido ninguna otra mutación.

5.2.3 Expresión de proteínas

La tabla 2 describe una colección de plásmidos que codifican para diferentes unidades de andamios moleculares basados en dominios celulosómicos (dockerinas y cohesinas) y que en algunos casos llevan fusionados proteínas fluorescentes o incluso enzimas. Para la expresión de estos plásmidos, se probaron diferentes condiciones de expresión. En primer lugar, las bacterias recombinantes se cultivaron a 37°C hasta alcanzar una biomasa suficiente para ser inducida con 1 mM de IPTG, después la inducción tuvo lugar durante 3 horas a la misma temperatura (Fig. 12). Los plásmidos correspondientes a las proteínas Coh-His y Dock-Cian descritos en la tabla 2 expresan proteínas que se encuentran mayoritariamente en la fracción soluble con pesos moleculares de 21.6 y 68.1 kDa, respectivamente (Fig. 12).

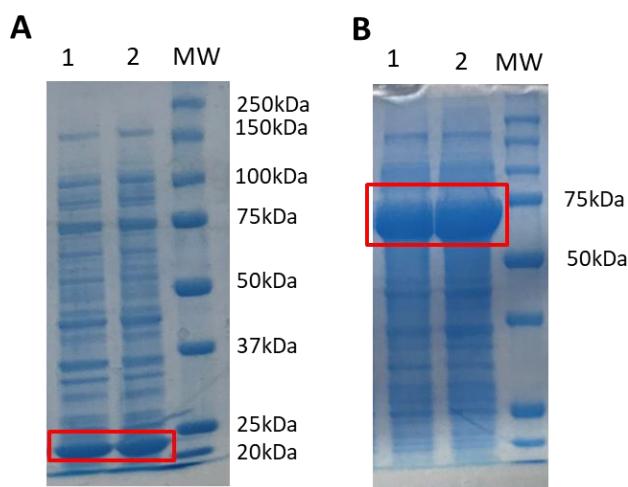


Figura 12. Expresión a 37 °C, durante tres horas con 1 mM de IPTG. **A.** Expresión de Coh-His. **Carril 1:** fracción total; **carril 2:** fracción soluble. **B.** Expresión de Dock-Cian, **carril 1:** fracción soluble, **carril 2:** fracción total. Electroforesis realizadas en geles SDS-Page al 10%.

A diferencia de las otras dos proteínas, la enzima Dock-wTA no se expresó de forma soluble a 37° C (Fig. 13 A). Con el objetivo de aumentar el rendimiento de proteína

soluble, se cambiaron las condiciones de expresión para esta proteína. Las bacterias recombinantes *E.coli* BL21 se crecieron a 37°C hasta alcanzar una DO de 600 para luego hacer la inducción a dos concentraciones de IPTG (1 y 0.1 mM) e incubar los cultivos inducidos durante toda la noche a 21° C. La proteína resultante de la expresión Dock-wTa tiene un peso molecular de 74.4 kDa como se puede ver en la Figura 13.

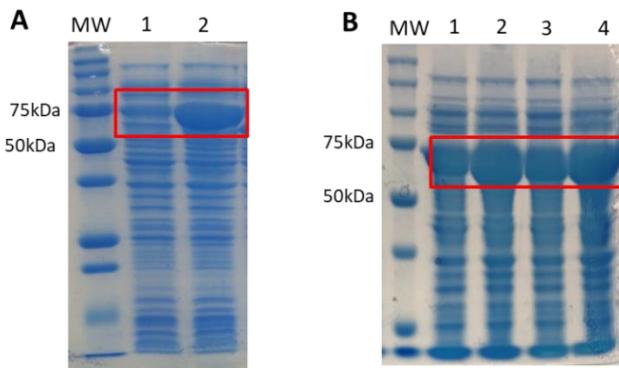


Figura 13. Expresión a 21°C con 1 y 0.1 mM de IPTG durante toda la noche. **A.** Expresión de Dock-wTa, **carril 1:** fracción soluble 1mM IPTG; **carril 2:** fracción total 1mM IPTG. **B.** Expresión de Dock-wTa, **carril 1:** fracción soluble 1mM IPTG; **carril 2:** fracción total 1mM IPTG; **carril 3:** fracción soluble 0.1 mM IPTG; **carril 4:** fracción total 0.1 mM IPTG.

La bajada en la temperatura de inducción tuvo un efecto positivo en la expresión de la proteína Dock-wTa ya que se expresó correctamente y de forma soluble independientemente de la concentración de IPTG (Fig. 13 B). Por tanto seleccionamos como condiciones óptimas de expresión 21°C y 0.1 mM de IPTG.

5.2.4. Anclaje de Cohesina Tipo II a micropartículas porosas activadas con quelatos de cobalto

Tras la expresión de la proteína Coh-His se realizó en primer lugar la purificación de la proteína siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 4.2.14.

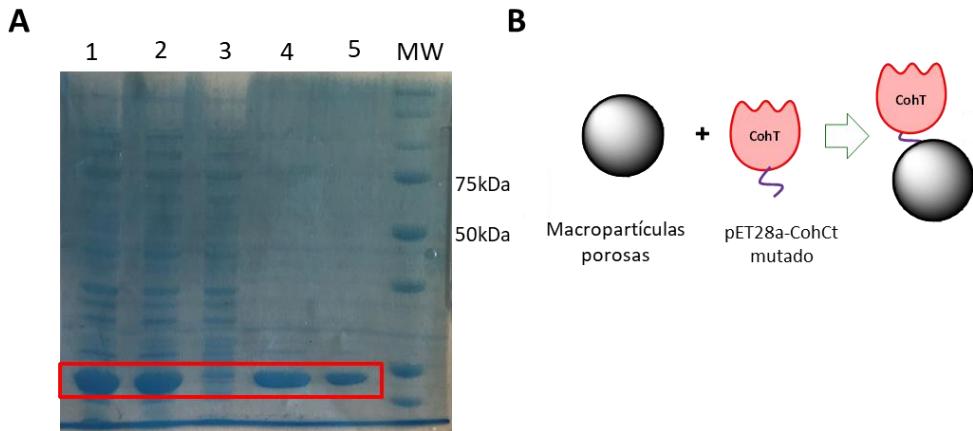


Figura 14. A. Purificación de Coh-His, **carril 1:** fracción total, **carril 2:** fracción soluble, **carril 3:** flujo atreves, **carril 4:** eluido o proteína purificada, **carril 5:** resina final. Electroforesis realizada en gel SDS-PAGE al 10%. B. Esquema de la inmovilización de Coh-His en las micropartículas porosas de agarosa activada con quelatos de cobalto.

Esta purificación demuestra que la adición de etiqueta de poli-histidina permite una unión selectiva de Coh-His sobre resinas de agarosa activadas con cobalto (Fig. 14 A). Además, la unión de la cohesina con los quelatos metálicos es muy fuerte ya que la elución de la proteína con imidazol 300 mM no es cuantitativa. Lo cual demuestra que podemos usar esta construcción como cebador para el ensamblaje en fase sólida de los andamios celulosómicos propuestos en este trabajo.

5.2.5. Unión de Dock-Cian a micropartículas porosas ancladas con Cohesina de tipo II

En primer lugar un extracto crudo de Coh-His se incuba con micropartículas porosas de agarosa activadas con quelatos de cobalto, para atrapar selectivamente esta proteína. Tras la inmovilización de la cohesina, se procedió a la construcción del andamio proteico utilizando otro extracto crudo que contiene la proteína Dock-Cian. El resultado de este procedimiento muestra uniones inespecíficas de la proteína fluorescente a las micropartículas debido a la etiqueta de poli-histidinas presente en su N-terminal (Fig. 15 B).

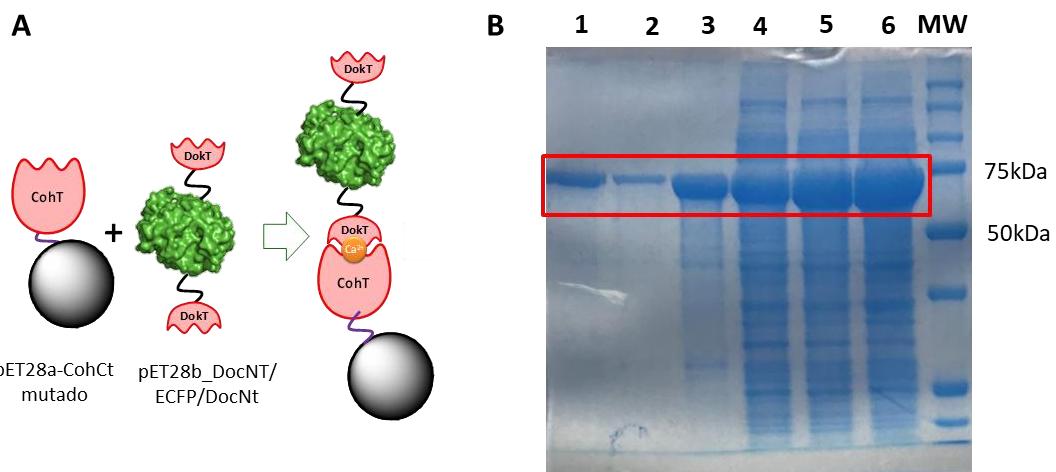


Figura 15. A. Esquema de la unión específica de los dominios cohesina- dockerina mediada por cationes calcio. B. Unión de Dock-Cian a micropartículas porosas de agarosa sin Coh-His inmovilizada. **Carril 1:** resina; **carril 2:** eluido con 1 M de imidazol; **carril 3:** eluido después de incubar con 300 mM de imidazol; **carril 4:** eluido antes del lavado; **carril 5:** fracción soluble; **carril 6:** fracción total. Electroforesis realizadas en geles SDS-PAGE al 10%.

Para evitar estas uniones inespecíficas y favorecer las uniones específicas cohesina-dockerina se realizó el mismo experimento a distintas concentraciones de imidazol (0-50 mM) y cloruro de calcio (0-10 mM). Los resultados se cuantificaron mediante fluorescencia $\lambda_{\text{excit}}=430 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 480 \text{ nm}$.

Tabla 7. Efecto de la adición de imidazol y efecto de la concentración de CaCl_2

	Sin Cohesina con X Imidazol			Con Cohesina		
	0 mM	10 mM	50 mM	0,1 mM	1 mM	10 mM
	Imidazol	Imidazol	Imidazol	CaCl2	CaCl2	CaCl2
^a Ψ% de inmovilización	55	57,6	41,6	73,1	84,5	85,2
^b % Eluido vs inmovilizado	56,4	65	65,8	25,2	25,5	29,1

Los datos se calculan como diferencias en la intensidad de fluorescencia emitida a 480 nm después de ser excitada a 430 nm. ^a Rendimiento de inmovilización, se calcula utilizando la fórmula $\Psi\% \text{ Inmv.} = 100 - (\text{fluorescencia}_{\text{em}} \text{ eluido antes de la adición de } 300 \text{ mM de imidazol}/682)*100$. ^b % eluido vs inmovilizado= $(\text{fluorescencia}_{\text{em}} \text{ eluido final } *100) / (\Psi\% \text{ Inmv.} *682/100)$

Analizando el efecto que produce la concentración de imidazol se observa que al añadir 50 mM de imidazol inicial la cantidad de proteína que se une por coordinación a quelatos de cobalto es menor. Sin embargo, tras añadir los 50 mM de imidazol para la elución, la cantidad de proteína eluida es prácticamente la misma que a 10 mM (Tabla 7). También se observa el aumento de uniones específicas coesina-dockerina al aumentar la concentración de calcio. Este aumento alcanza su máximo valor alrededor de 1 mM de cloruro de calcio, lo que indica que esa concentración es suficiente para establecer las uniones específicas cohesina-dockerina. Por tanto, se escoge 50 mM de imidazol y 1 mM de CaCl_2 como las condiciones óptimas para llevar a cabo la inmovilización de Dock-Cian sobre las microparticulas de agarosa activadas con Coh-His.

La inmovilización con 50 mM de imidazol y 1 mM de CaCl_2 aumenta las uniones específicas cohesina-dockerinas como demuestra la disminución del porcentaje de proteína eluida (25%) en presencia de 300 mM de imidazol comparado con los rendimientos de elución (66%) de Dock-wTA inmovilizadas sobre partículas no activadas con Coh-His (Tabla7). Resultados similares se encontraron en los análisis electroforéticos. En la Figura 16 se observa como la intensidad correspondiente a la banda de Dock-Cian aumenta en la resina pero disminuye en la fracción eluida con 300 mM de imidazol.

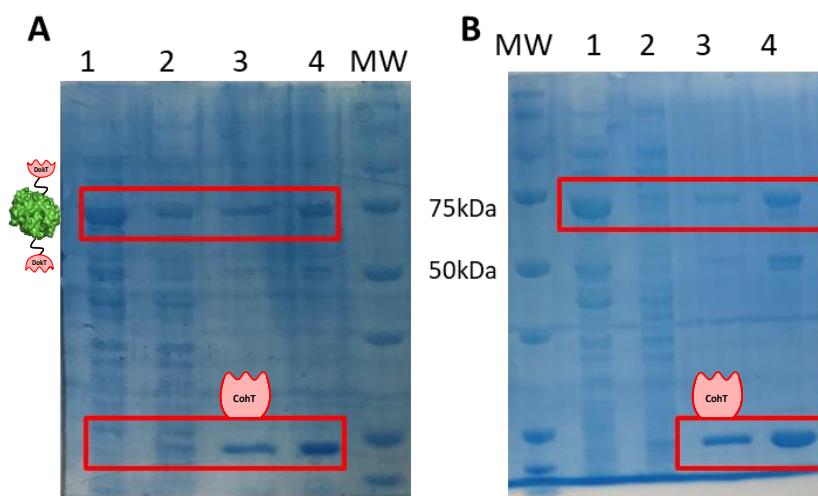


Figura 16. Comparación de la unión de Dock-Cian en micropartículas porosas con cohesina anclada y 1 mM de cloruro de calcio. **A.** Unión sin imidazol. **Carril 1:** crudo o fracción soluble **carril 2:** flujo atraves, **carril 3:** eluido después de incubar con 300 mM de imidazol; **carril4:** resina tras elución. **B.** Unión con 50 mM de imidazol. **Carril 1:** crudo o fracción soluble **carril 2:** flujo atraves, **carril 3:** eluido después de

incubar con 300 mM de imidazol; **carril 4**: resina tras elución. Electroforesis realizadas en geles SDS-PAGE al 10%.

En la parte inferior de los geles (Fig. 16) se observan las bandas correspondientes a la Cohesina que se liberan tras la elección con imidazol o que queda unida a la resina a pesar de las condiciones de elución.

5.2.6. Unión de Dock-wTa a micropartículas porosas ancladas con Cohesina de tipo II

La proteína Dock-wTa está fusionada a dominios dockerinas de igual manera que la proteína Dock-Cian, con la diferencia de que carece de etiqueta de poli-histidinas. La unión de esta construcción a la cohesina inmovilizada se observa en la Figura 17.

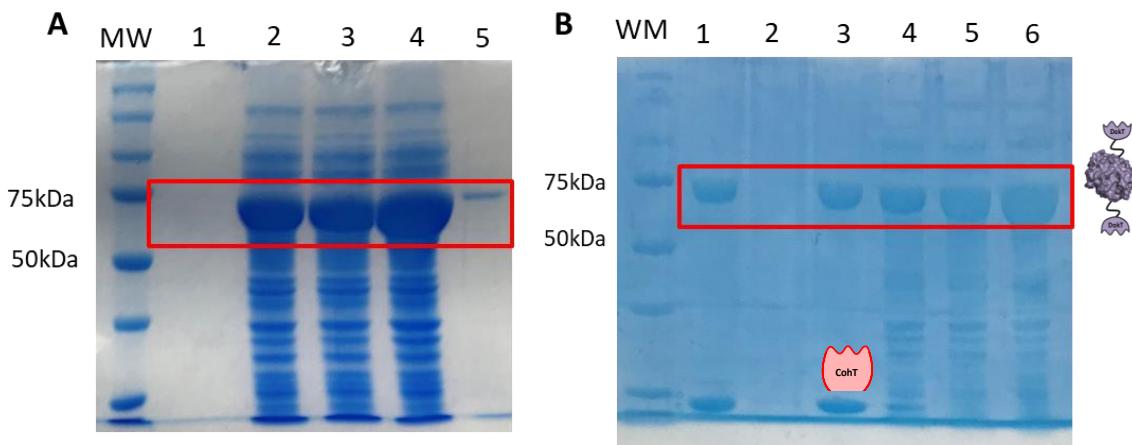


Figura 17. Unión de Dock-wTa a micropartículas porosas de agarosa. **A.** Unión de Dock-wTa a micropartículas porosas de agarosa sin Coh-His inmovilizada. **Carril 1:** eluido con 300 mM de imidazol, **carril 2:** flujo atreves, **carril 3:** fracción soluble, **carril 4:** fracción total; **carril 5:** resina final. **B.** Unión de Dock-wTa a micropartículas porosas de agarosa con cohesina inmovilizada y 1 mM de cloruro de calcio. **Carril 1:** resina final, **carril 2:** eluido con 300 mM de imidazol, **carril 3:** resina antes de añadir los 300 mM de imidazol, **carril 4:** elido antes del lavado, **carril 5:** fracción soluble, **carril 6:** fracción total. Electroforesis realizadas en geles SDS-PAGE al 10%.

Como se observa, la proteína Dock-wTa al no poseer etiqueta de poli-histinas, no se une con los quelatos de cobalto (Fig. 17 A), sin embargo si se immoviliza específicamente a través de interacciones cohesina-dockerina cuando la resina está activada con el domino Coh-His. Cabe destacar que a pesar de añadir 300 mM de imidazol, esta concentración no es suficiente para eluir el ensamblado enzimático. De la medida de la actividad transaminasa descrito en el apartado 4.2.18 se calculó la actividad enzimática inmovilizada y recuperada en las micropartículas porosas tras la

inmovilización de un extracto crudo de Dock-wTa ofrecido a una resina activada con Coh-His en presencia de 1 mM de cloruro de calcio.

Tabla 8. Actividad wTA-andamio

^a Ψ Inmovilización (%)	58
^b Act (IU/g)	1,4
^c Ae (%)	128

^a Actividad inmovilizada Ψ(%) =(Act. Fracción soluble - Act flujo a través)*100/ (Act. Fracción soluble). ^bActividad inmovilizada por gramo de soporte (U/g)=((U/mL fracción soluble – U/mL flujo a través)*10). ^cActividad específica inmovilizada (Ae)=(Actividad soporte (U/g)/Actividad inicial (U/g))*100.

6. Discusión

La utilización de enzimas solubles acoplados a materiales piezoeléctricos para la producción de energía a partir de combustibles químicos renovables, es una alternativa para la producción sostenible de electricidad (Velasco-Lozano, et al., 2018a). Proponemos que el mecanismo por el cual se produce la conversión de energía química en electricidad puede llegar a ser más eficiente, y los dispositivos que generan esa electricidad pueden ser reutilizables durante varios ciclos de generación, si anclamos de forma estable las enzimas a las superficies del material piezoeléctrico. Para probar este concepto propusimos dos vías de inmovilización: 1) la inmovilización aleatoria de agregados enzimáticos (CLEA) adsorbidos a los materiales piezoeléctricos, y 2) la inmovilización ordenada mediante el ensamblaje molecular de sistemas enzimáticos en celulosomas artificiales.

6.1 Inmovilización en CLEA y fabricación de generadores bio-inorgánicos.

Para el proceso de inmovilización se utilizó la enzima comercial catalasa de hígado bovino (CAT), la cual después de someterse a un proceso de agregación y entrecruzamiento, generó unos agragados micrométricos que se adsorbieron de forma iónica a un material piezoeléctrico comercial compuesto de zirconato titanato de

plomo (PZT) con un electrodo inferior de cobre y un electrodo superior de plata recubierto por una capa de óxido de silicio (Fig. 4 A).

Este sistema es capaz de convertir el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular (Switala, et al., 2002) formando burbujas en la disolución. La velocidad de este proceso catalítico de gasificación estimula mecánicamente el material piezoeléctrico, dando como respuesta un estímulo eléctrico.

6.1.1. Optimización de la preparación de CLEA-CAT/BSA y su respuesta energética

El agente precipitante juega un papel fundamental en la preparación de CLEA. Escoger un agente precipitante que induzca una conformación más activa de la enzima no es trivial, ya que no se puede generalizar el uso de un solo agente precipitante para todas las enzimas.(Velasco-Lozano, et al., 2016). Es por ello que partimos del estudio previo descrito específicamente para la enzima catalasa (Mafra, et al., 2016) y la comparamos con n-butanol, un agente precipitante utilizado anteriormente en el laboratorio. Como se observa en la Tabla 5, el n-butanol tiene un porcentaje de precipitación cercano al 100% pero presenta una actividad específica recuperada casi nula (<4 %). Por tanto se produce una inactivación de la enzima que puede deberse a cambios conformacionales en la estructura terciaria y/o cuaternaria (ya que es un homotetrámero) producidos al pasar de un solvente muy polar a uno más apolar.(Schoevaart, et al., 2004b). Por ello se escoge el sulfato de amonio como agente precipitante.

Como agente entrecruzante empleamos el glutaraldehído (GA) ya que es el agente entrecruzante más utilizado debido a su eficiencia de entrecruzamiento y bajo coste. El GA lleva a cabo la reacción de entrecruzamiento inter e intramolecular entre los grupos amino libres de residuos de lisina y sus grupos aldehídos laterales, dando como resultado una base de Schiff. (Sheldon, 2011a) (Zhou, et al., 2015). La concentración de glutaraldehído determina el grado de entrecruzamiento de los CLEA lo que afecta considerablemente su actividad y estabilidad final. La Figura 6 A muestra el aumento de la actividad específica inmovilizada al aumentar la concentración de GA de 25 mM a 50 mM, mientras que se mantiene sin diferencia significativa entre 50 y 100 mM. Mientras que no se observó ningún efecto de la concentración de GA en el rendimiento de inmovilización. Es decir que la concentración de GA a la que se obtiene la máxima actividad específica inmovilizada se alcanza a 50 mM, y por tanto la adición de más GA es innecesaria.

Varios estudios demuestran que los CLEA retienen una mayor actividad catalítica al prepararse en presencia de albumina de suero bovino (BSA) (Shah, et al. 2006; (Cabana, et al., 2007; Montoro-García, et al., 2010). Es por ello que todos los CAT-CLEA de este trabajo fueron preparados en co-agregación con BSA. La BSA funciona como una fuente de grupos amino (capaces de entrecruzarse con GA) para proteínas con baja cantidad de lisinas (Mafra, et al., 2016; Majumder, et al., 2008; Shah, et al., 2006). En este estudio observamos que la concentración de proteína inicial (mezcla 1:3 de CAT y BSA) no afecta a la actividad específica inmovilizada de los CAT-CLEA, pero que si modifica el rendimiento de inmovilización (Fig. 6 B); obteniendo la misma actividad específica inmovilizada y más del 90% de rendimiento de inmovilización a 0.8 y a 8 mg/mL. Sin embargo a concentraciones de proteínas más bajas, los rendimientos de inmovilización fueron inferiores al 60%. Estos resultados demuestran la capacidad de escalar el proceso de preparación del CLEA sin afectar la actividad recuperada. Además de la BSA, existen otros polímeros multi-aminados que se han usado para la preparación de CLEAs y que presentan varias ventajas como la mejora de la actividad recuperada, mayor rendimiento de inmovilización y mayor estabilidad (Velasco-Lozano, et al., 2014). Sin embargo la motivación para usar la PEI en la fabricación de agregados enzimáticos consiste en enriquecer estos agregados con cargas positivas que favorezcan la posterior absorción iónica del CAT-CLEA sobre el material piezoeléctrico. Los CLEA-CAT/BSA/PEI presentan menor actividad catalasa que en ausencia del polímero (Fig. 7). Esto se puede deber a un mayor grado de modificación química (mayor entrecruzamiento) ya que la PEI al tener muchos grupos amino es capaz de formar muchos más enlaces imina con el GA (Fig. 8). Por otro lado, este mayor entrecruzamiento podría impedir la difusión de los sustratos hasta el sitio activo de la CAT, ya que la morfología que presenta las partículas individuales de CLEA son más compactas llegando a perder la forma esférica que se muestra en los CLEAs sin PEI, lo que podría explicar la disminución de su actividad (Fig. 8 C). Sin embargo, la utilización de este polielectrolito permite una mejor adhesión del CLEA al piezoeléctrico generando mayor energía que el CLEA-CAT/BSA tras los primeros tres reúsos (Fig. 9). Esto demuestra que la PEI fomenta la interacción iónica del CLEA con el material, impidiendo su desprendimiento tras los usos y lavados. Mientras que con el CLEA-CAT/BSA se genera menos de la mitad de la energía producida en el primer uso (Tabla 6) y se mantiene constante en los siguientes reúsos. Lo anterior puede deberse

al desprendimiento de parte de la enzima que no se encuentra adherida de forma eficiente al material piezoelectrónico.

Finalmente, estudiamos la capacidad de generación de energía eléctrica de los distintos tipos de CLEAs en comparación con las enzimas acopladas en forma soluble. Los resultados nos muestran que los bio-generadores inorgánicos pueden producir la misma respuesta eléctrica con la catalasa acoplada en forma soluble o inmovilizada en forma de CLEAs, permitiendo la reutilización de estos últimos. Sin embargo, los bio-generadores inorgánicos alimentados con glucosa y peróxido de hidrógeno, producen una menor respuesta eléctrica cuando con las enzimas están inmovilizadas que cuando están libres. Sin embargo la eficiencia para generar burbujas, y por tanto la respuesta eléctrica del sistema aumenta ligeramente cuando la GOX se adsorbe iónicamente a las partículas de los CLEAS-CAT/BSA/PEI. Esto se puede deber a que la GOX se inactiva más al entrecruzarse durante la preparación del CLEA, mientras que si se adsorbe iónicamente después de la preparación del CLEA-CAT/BSA/PEI, la inactivación de la GOX es menor. No obstante, en cualquiera de las dos arquitecturas de inmovilización, la actividad de la GOX se ve dramáticamente disminuida, lo que limita la eficacia del sistema bi-enzimático inmovilizado comparado con el sistema en solución.

6.2. Construcción de andamios artificiales Cohesina-Dockerina

Anteriormente demostramos la capacidad de reúso de los bio-generadores inorgánicos acoplados a biocatalizadores con actividad catalasa inmovilizados en forma de agregados enzimáticos entrecruzados y de su posible combinación con otras enzimas para la generación de energía eléctrica a partir de combustibles renovables. En esta segunda parte se plantea la construcción de andamios artificiales que permitan, además de la inmovilización, poder controlar la organización espacial de las diferentes enzimas acopladas a los bio-generadores inorgánicos.

6.2.1 Diseño y expresión de andamios artificiales basados en celulosa

Como proteína modelo para evaluar la construcción de estos andamios artificiales se utiliza la proteína ciano fluorescente (CFP). Esta proteína facilita la monitorización de las interacciones cohesina-dockerina en fase sólida ya que es fácilmente medible por espectroscopia de fluorescencia. En este trabajo solo hemos podido avanzar hacia la construcción de dos piezas del andamio proteico, pero el objetivo más a largo plazo es

introducir la catalasa y glucosa oxidasa en los andamios, para finalmente anclar estos andamios a la superficie de los materiales piezolectrícos para lograr bio-generadores inorgánicos más eficientes y robustos.

En primer lugar, se introdujó una etiqueta de 6 histidinas a un domino dockerina de tipo II de *Clostridum thermocellum* para posibilitar su unión a microparticulas porosas activadas con quelatos metálicos. Este domino nos permitirá el ensamblaje en fase sólida de andamios moleculares basados en interacciones cohesina-dockerina de tipo II. Posteriormente se optimizó la expresión de las variantes que contienen el dominio cohesina y las que contienen los dominios dockerinas fusionados tanto a CFP como a una enzima de interés industrial; la ω -transaminasa de *Apergillus terreus*. Se observa que las condiciones de expresión e inducción de 37°C y 1mM de IPTG durante 3h es suficiente para obtener las proteínas de interés en la fracción soluble correspondiente para la expresión de la proteína Coh-His y Dock-Cian (Fig. 12). Sin embargo, la quimera que fusiona los dominios cohesina con la Dock-wTa obtiene bajos rendimientos de proteína soluble bajo esas condiciones (Fig. 13). Este fenómeno suele suceder cuando la proteína se sintetiza a una velocidad tan alta que al microorganismo no le da tiempo de plegarla correctamente(Baneyx, 1999; Vera, et al., 2007). Para evitar la formación de estas proteínas mal plegadas (cuerpos de inclusión) y permitir su sobreexpresión en forma soluble, se probó tanto bajar la concentración de IPTG a 0.1 mM como bajar la temperatura de expresión a 21 °C durante toda la noche, lo que afecta directamente a la velocidad de síntesis y con ello a la solubilidad de la proteína recombinante, lo que permitió optimizar la sobre-expresión de la proteína químérica Dock-wTa (Figura 13. B).

Antes de la inmovilización de la proteína Coh-His se demostró la posibilidad de purificar esta proteína por cromatografía de afinidad, lo que a su vez demuestra el éxito de la mutagénesis dirigida. Como se explicó en el apartado 4.2.14. esta purificación se basa en los enlaces de coordinación formados entre los quelatos de cobalto en la superficie del soporte y la etiqueta de poli-histidina fusionada al C-terminal del dominio cohesina. La presencia de la proteína en la resina después de la elución indica que la fuerza de unión de proteína a estos quelatos es alta, por tanto será necesaria una concentración de imidazol más alta para su completa elución. Tras la inmovilización de la cohesina de tipo II se procedió al ensamblaje del andamio proteico en fase sólida con la proteína CFP fusionada a dos dominios dokerina de tipo

II y una etiqueta de poli-histidinas (Dock-Cian). Debido a esta etiqueta de poli-histidinas, parte de la proteína fluorescente se une a las micropartículas porosas mediante enlaces de coordinación. Para minimizar estas uniones se evaluó el efecto que produce en este tipo de unión distintas concentraciones de imidazol. La concentración de imidazol añadidas junto con el extracto crudo son bajas puesto que se necesita un equilibrio entre minimizar la unión inespecífica y mantener toda la cohesina anclada a las micropartículas (Fig. 16). No obstante, ya demostramos previamente que la unión de la cohesina a la resina era muy intensa y no se podía desorber cuantitativamente incluso con 300 mM de imidazol (Fig. 15 B). Por otro lado, es sabido que las uniones específicas cohesina-dockerina son dependientes de calcio (Pagès, et al., 1997), por esta razón se probaron distintas concentraciones de cloruro de calcio, para encontrar aquellas condiciones que favorezcan la unión específica cohesina-dockerina. A partir de los datos de fluorescencia de las muestras del extracto crudo soluble inicial, el paso de muestra y la muestra eluida, se cuantificó la cantidad de proteína presente en cada etapa de la inmovilización. Este procedimiento se pudo llevar a cabo ya que Dock-Cian tiene la capacidad de emitir fluorescencia a 480 nm después de ser excitada a 430 nm. De este modo, encontramos que la concentración de imidazol óptima para minimizar las uniones inespecíficas de la CFP es 50 mM de imidazol, mientras que la concentración óptima de CaCl_2 para lograr una mayor unión específica a través de interacciones cohesina-dockerina es de 1 mM. Además, los análisis de SDS-PAGE de las diferentes muestras obtenidas en los experimentos de unión, se corroboraron los resultados obtenidos mediante las medidas de fluorescencia, observando que la proteína CFP era capturada de forma específica por microparticulas porosas activadas con dominios cohesinas (Fig. 16). Estos resultados indican que se está favoreciendo una interacción cohesina-dockerina multi-puntual entre los dos dominios de cohesina fusionados a la CFP y los dominios de cohesina anclados en la superficie de las micropartículas, ya que si la unión fuese unipuntual a través de las colas de histidinas, las proteínas unidas serían eluidas cuantitativamente en presencia de imidazol.

Finalmente se construyó el sistema cohesina-dockerina sin cola de histidina para evitar cualquier tipo de ruido que pudiese causar interacciones no deseadas. Para ello se utilizó la proteína Dock-wTa, una proteína existente en el laboratorio que fusionada a dominios dockerinas, con la misma arquitectura que la proteína Dock-Cian, pero sin

etiqueta de polihistidinas. La actividad de esta enzima es relevante a nivel industrial ya que cataliza la transferencia de grupos aminos para la síntesis de aminas quirales. Aunque esta enzima se sale de contexto de este proyecto, ya que no participa en ninguna reacción capaz de generar gases, nos permite demostrar que las uniones cohesina-dockerina se producen de forma totalmente específica (Fig. 17), y que además somos capaces de mantener la actividad enzimática a través de este tipo de inmovilización. Por tanto, hemos encontrado el sistema ideal para trasladarlo a la catalasa y construir sistemas ordenados y orientados para mejorar la actividad de esta enzima, además las uniones específicas cohesina-dockerina podrían permitir la combinación de enzimas como con la glucosa oxidasa.

7. Conclusiones

En este trabajo hemos descrito la fabricación de bio-generadores inorgánicos acoplados a enzimas inmovilizadas aleatoriamente en forma de CLEAs y ordenadas sobre andamios proteicos. En primer lugar, las mejores condiciones para la inmovilización de catalasa en forma de agregados aleatorios se obtuvieron mediante la precipitación con sulfato de amonio y su entrecruzamiento con 50 mM de Glutaraldehido como entrecruzante empleando una mezcla de catalasa y BSA 1 a 3 a una concentración inicial de 0.8 mg/mL de proteína. Finalmente, estos agregados optimizados son incorporados a los bio-generadores inorgánicos, los cuales son capaces de producir energía eléctrica a partir de peróxido de hidrógeno y de otras fuentes renovables como la glucosa. Además, pueden reutilizarse en varios ciclos de generación de energía gracias a la inmovilización de las enzimas en forma de CLEAs y su posterior adsorción iónica al material piezoeléctrico. Hasta ahora, hemos logrado usarlos hasta 6 veces manteniendo más del 40% de la respuesta eléctrica inicial.

A pesar de que el PEI disminuye la actividad catalasa y glucosa oxidasa de los agregados mono y multi-enzimáticos, el dopaje con este polielectrolito permite mantener el CLEA adherido al piezoeléctrico durante más reúsos.

Por otro lado, en la construcción de andamios sintéticos hemos construido dos piezas del andamio proteico donde en un futuro próximo se fusionarán la catalasa y glucosa oxidasa.

La concentración óptima para la unión específica cohesina-dockerina se ha fijado en 1 mM de CaCl₂, y en caso de tener enzimas etiquetadas con poli-histidinas se ha demostrado que la adición de imidazol disminuye las uniones inespecíficas. Por otro lado, hemos demostrado la capacidad que tiene este tipo de inmovilización de retener la actividad enzimática de la enzima Dock-wTA en el soporte en fase sólida y la capacidad que tienen las enzimas multivalentes de aumentar las fuerzas de unión con las partículas microporosas al poseer más de un punto de anclaje.

7. Conclusions

In this work we have achieved the manufacturing of bio-inorganic generators coupled to enzymes randomly immobilized as crosslinked random aggregates. First, the best conditions for the immobilization of catalase in the form of random aggregates (CLEAs) were obtained by ammonium sulfate precipitation and crosslinking with 50 mM Glutaraldehyde as a crosslinker using a mixture of catalase and BSA in a ratio 1 to 3 at an initial concentration of 0.8 mg / mL of protein. Finally, these optimized aggregates are incorporated into the inorganic bio-generators, which are capable of producing electrical energy from hydrogen peroxide and other renewable sources such as glucose. In addition, they can be reused in several energy generation cycles thanks to the immobilization of CLEAS and their subsequent ionic adsorption to the surface of the piezoelectric material. So far, we have managed to use them up to 6 times while maintaining more than 40% of the initial electrical response.

Despite that the PEI diminish the activity of the catalase and glucose oxidase of the mono and multi-enzymatic aggregates, the doping with this polyelectrolyte allows to keep the CLEA adhered to the piezoelectric for more reuses.

On the other side, we have designed and constructed genetically encoded building blocks to assemble synthetic scaffolds that spatially organize proteins in the solid-phase. These toolbox will be expanded in the near future to other enzyme like catalase and oxidase to be integrated into bio-inorganic generators.

8. Bibliografía

- An, S., R. Kumar, E. D. Sheets, and S. J. Benkovic. 2008 Reversible compartmentalization of de novo purine biosynthetic complexes in living cells. *Science*, 320(5872):103-106.
- Ba, S., L. Haroune, C. Cruz-Morató, C. Jacquet, I. E. Touahar, J.-P. Bellenger, C. Y. Legault, J. P. Jones, and H. Cabana. 2014 Synthesis and characterization of combined cross-linked laccase and tyrosinase aggregates transforming acetaminophen as a model phenolic compound in wastewaters. *Science of the Total Environment*, 487:748-755.
- Baneyx, F. 1999 Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*, 10(5):411-421.
- Bayer, E. A., J.-P. Belaich, Y. Shoham, and R. Lamed. 2004 The Cellulosomes: Multienzyme Machines for Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides. *Annual Review of Microbiology*, 58(1):521-554.
- Bolívar, J. M., A. Hidalgo, L. Sánchez-Ruiloba, J. Berenguer, J. M. Guisán, and F. López-Gallego. 2011 Modulation of the distribution of small proteins within porous matrixes by smart-control of the immobilization rate. *Journal of Biotechnology*, 155(4):412-420.
- Bowers, P. G., C. Hofstetter, C. R. Letter, and R. T. Toomey. 1995 Supersaturation Limit for Homogeneous Nucleation of Oxygen Bubbles in Water at Elevated Pressure:" Super-Henry's Law". *The Journal of Physical Chemistry*, 99(23):9632-9637.
- Bradford, M. M. 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1):248-254.
- Bruggink, A., E. C. Roos, and E. de Vroom. 1998 Penicillin Acylase in the Industrial Production of β -Lactam Antibiotics. *Organic Process Research & Development*, 2(2):128-133.
- Cabana, H., J. P. Jones, and S. N. Agathos. 2007 Preparation and characterization of cross-linked laccase aggregates and their application to the elimination of endocrine disrupting chemicals. *Journal of Biotechnology*, 132(1):23-31.
- Cooper, C. L., P. L. Dubin, A. B. Kayitmazer, and S. Turksen. 2005 Polyelectrolyte-protein complexes. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 10(1):52-78.
- DeLoache, W. C., and J. E. Dueber. 2013 Compartmentalizing metabolic pathways in organelles. *Nature Biotechnology*, 31:320.
- DiCosimo, R., J. McAuliffe, A. J. Poulose, and G. Bohlmann. 2013 Industrial use of immobilized enzymes. *Chemical Society Reviews*, 42(15):6437-6474.
- García-García, P., J. Rocha-Martin, G. Fernandez-Lorente, and J. M. Guisan. 2018 Co-localization of oxidase and catalase inside a porous support to improve the elimination of hydrogen peroxide: Oxidation of biogenic amines by amino oxidase from *Pisum sativum*. *Enzyme and Microbial Technology*, 115:73-80.

- Garcia-Galan, C., Á. Berenguer-Murcia, R. Fernandez-Lafuente, and R. C. Rodrigues. 2011 Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 353(16):2885-2904.
- Haggie, P., L. Vetrivel, and A. Verkman
- 2001 Diffusion of metabolic enzymes in mitochondria and the cytoplasm measured by fluorescence photobleaching. *BIOPHYSICAL JOURNAL*, 2001. Vol. 80, pp. 280A-281A. BIOPHYSICAL SOCIETY 9650 ROCKVILLE PIKE, BETHESDA, MD 20814-3998 USA.
- Holtgräwe, D., A. Scholz, B. Altmann, and R. Scheibe. 2005 Cytoskeleton-associated, carbohydrate-metabolizing enzymes in maize identified by yeast two-hybrid screening. *Physiologia Plantarum*, 125(2):141-156.
- Homaei, A. A., R. Sariri, F. Vianello, and R. Stevanato. 2013 Enzyme immobilization: an update. *Journal of Chemical Biology*, 6(4):185-205.
- Illanes, A. 2008 Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications. Netherlands: Springer
- Lopez-Serrano, P., L. Cao, F. Van Rantwijk, and R. Sheldon. 2002 Cross-linked enzyme aggregates with enhanced activity: application to lipases. *Biotechnology letters*, 24(16):1379-1383.
- Mafra, A. C. O., W. Kopp, M. B. Beltrame, R. de Lima Camargo Giordano, M. P. de Arruda Ribeiro, and P. W. Tardioli. 2016 Diffusion effects of bovine serum albumin on cross-linked aggregates of catalase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 133:107-116.
- Majumder, A. B., K. Mondal, T. P. Singh, and M. N. Gupta. 2008 Designing cross-linked lipase aggregates for optimum performance as biocatalysts. *Biocatalysis and Biotransformation*, 26(3):235-242.
- Meynial Salles, I., N. Forchhammer, C. Croux, L. Girbal, and P. Soucaille. 2007 Evolution of a *Saccharomyces cerevisiae* metabolic pathway in *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering*, 9(2):152-159.
- Montoro-García, S., F. Gil-Ortiz, J. Navarro-Fernández, V. Rubio, F. García-Carmona, and Á. Sánchez-Ferrer. 2010 Improved cross-linked enzyme aggregates for the production of desacetyl β-lactam antibiotics intermediates. *Bioresource technology*, 101(1):331-336.
- O'Connell, J. D., A. Zhao, A. D. Ellington, and E. M. Marcotte. 2012 Dynamic reorganization of metabolic enzymes into intracellular bodies. *Annual review of cell and developmental biology*, 28:89-111.
- Ovádi, J., and V. Saks. 2004 On the origin of intracellular compartmentation and organized metabolic systems. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 256(1):5-12.
- Pagès, S., A. Bélaïch, J.-P. Bélaïch, E. Morag, R. Lamed, Y. Shoham, and E. A. Bayer. 1997 Species-specificity of the cohesin-dockerin interaction between *Clostridium*

- thermocellum and Clostridium cellulolyticum: Prediction of specificity determinants of the dockerin domain. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 29(4):517-527.
- Roessl, U., J. Nahálka, and B. Nidetzky. 2010 Carrier-free immobilized enzymes for biocatalysis. *Biotechnology letters*, 32(3):341-350.
- Schmid, A., J. Dordick, B. Hauer, A. Kiener, M. Wubbolts, and B. Witholt. 2001 Industrial biocatalysis today and tomorrow. *nature*, 409(6817):258.
- Schmidt-Dannert, C., and F. Lopez-Gallego. 2016 A roadmap for biocatalysis—functional and spatial orchestration of enzyme cascades. *Microbial biotechnology*, 9(5):601-609.
- Schmitt, D. L., and S. An. 2017 Spatial organization of metabolic enzyme complexes in cells. *Biochemistry*, 56(25):3184-3196.
- Schoevaart, R., M. Wolbers, M. Golubovic, M. Ottens, A. Kieboom, F. Van Rantwijk, L. Van der Wielen, and R. Sheldon. 2004a Preparation, optimization, and structures of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). *Biotechnology and Bioengineering*, 87(6):754-762.
- Schoevaart, R., M. W. Wolbers, M. Golubovic, M. Ottens, A. P. G. Kieboom, F. van Rantwijk, L. A. M. van der Wielen, and R. A. Sheldon. 2004b Preparation, optimization, and structures of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). *Biotechnology and Bioengineering*, 87(6):754-762.
- Sedlaczek, L., and L. L. Smith. 1988 Biotransformations of Steroids. *Critical Reviews in Biotechnology*, 7(3):187-236.
- Shah, S., A. Sharma, and M. N. Gupta. 2006 Preparation of cross-linked enzyme aggregates by using bovine serum albumin as a proteic feeder. *Analytical Biochemistry*, 351(2):207-213.
- Sheldon, R.
- 2007 Cross-linked enzyme aggregates (CLEA® s): stable and recyclable biocatalysts: Portland Press Limited.
- Sheldon, R. A. 2011a Cross-Linked Enzyme Aggregates as Industrial Biocatalysts. *Organic Process Research & Development*, 15(1):213-223.
- Sheldon, R. A. 2011b Characteristic features and biotechnological applications of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). *Applied microbiology and biotechnology*, 92(3):467-477.
- Siu, K.-H., R. P. Chen, Q. Sun, L. Chen, S.-L. Tsai, and W. Chen. 2015 Synthetic scaffolds for pathway enhancement. *Current Opinion in Biotechnology*, 36:98-106.
- Srere, P. A. 1985 The metabolon. *Trends in Biochemical Sciences*, 10(3):109-110.
- Sweetlove, L. J., and A. R. Fernie. 2018 The role of dynamic enzyme assemblies and substrate channelling in metabolic regulation. *Nature Communications*, 9(1):2136.

- Switala, J., and P. C. Loewen. 2002 Diversity of properties among catalases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 401(2):145-154.
- Talekar, S., A. Joshi, G. Joshi, P. Kamat, R. Haripurkar, and S. Kambale. 2013 Parameters in preparation and characterization of cross linked enzyme aggregates (CLEAs). *RSC Advances*, 3(31):12485-12511.
- Velasco-Lozano, S., M. Knez, and F. López-Gallego. 2018a Coupling Enzymes and Inorganic Piezoelectric Materials for Electricity Production from Renewable Fuels. *ACS Applied Energy Materials*, 1(5):2032-2040.
- Velasco-Lozano, S., and F. López-Gallego. 2018b Wiring step-wise reactions with immobilized multi-enzyme systems. *Biocatalysis and Biotransformation*, 36(3):184-194.
- Velasco-Lozano, S., F. López-Gallego, C. Mateos-Díaz Juan, and E. Favela-Torres 2016 Cross-linked enzyme aggregates (CLEA) in enzyme improvement – a review. *In Biocatalysis*. Pp. 166, Vol. 1.
- Velasco-Lozano, S., F. López-Gallego, R. Vázquez-Duhalt, J. C. Mateos-Díaz, J. M. Guisán, and E. Favela-Torres. 2014 Carrier-free immobilization of lipase from *Candida rugosa* with polyethyleneimines by carboxyl-activated cross-linking. *Biomacromolecules*, 15(5):1896-1903.
- Vera, A., N. González-Montalbán, A. Arís, and A. Villaverde. 2007 The conformational quality of insoluble recombinant proteins is enhanced at low growth temperatures. *Biotechnology and Bioengineering*, 96(6):1101-1106.
- Wang, C., S.-H. Yoon, H.-J. Jang, Y.-R. Chung, J.-Y. Kim, E.-S. Choi, and S.-W. Kim. 2011 Metabolic engineering of *Escherichia coli* for α -farnesene production. *Metabolic Engineering*, 13(6):648-655.
- Wilner, O. I., S. Shimron, Y. Weizmann, Z.-G. Wang, and I. Willner. 2009 Self-assembly of enzymes on DNA scaffolds: en route to biocatalytic cascades and the synthesis of metallic nanowires. *Nano letters*, 9(5):2040-2043.
- You, C., and Y. H. P. Zhang. 2013 Self-Assembly of Synthetic Metabolons through Synthetic Protein Scaffolds: One-Step Purification, Co-immobilization, and Substrate Channeling. *ACS Synthetic Biology*, 2(2):102-110.
- Zhang, Y., Q. Wang, and H. Hess. 2017 Increasing Enzyme Cascade Throughput by pH-Engineering the Microenvironment of Individual Enzymes. *ACS Catalysis*, 7(3):2047-2051.
- Zhou, Z., F. Piepenbreier, V. R. R. Marthala, K. Karbacher, and M. Hartmann. 2015 Immobilization of lipase in cage-type mesoporous organosilicas via covalent bonding and crosslinking. *Catalysis Today*, 243:173-183.

9. Anexos

Mutagénesis Dirigida

Figura 1. Secuencia del plásmido pET28a-*cohct* antes de la mutagénesis dirigida. En rojo se marca la base nitrogenada que impide la lectura de la etiqueta de poli-histidinas marcadas en rosa.

Imágenes SEM

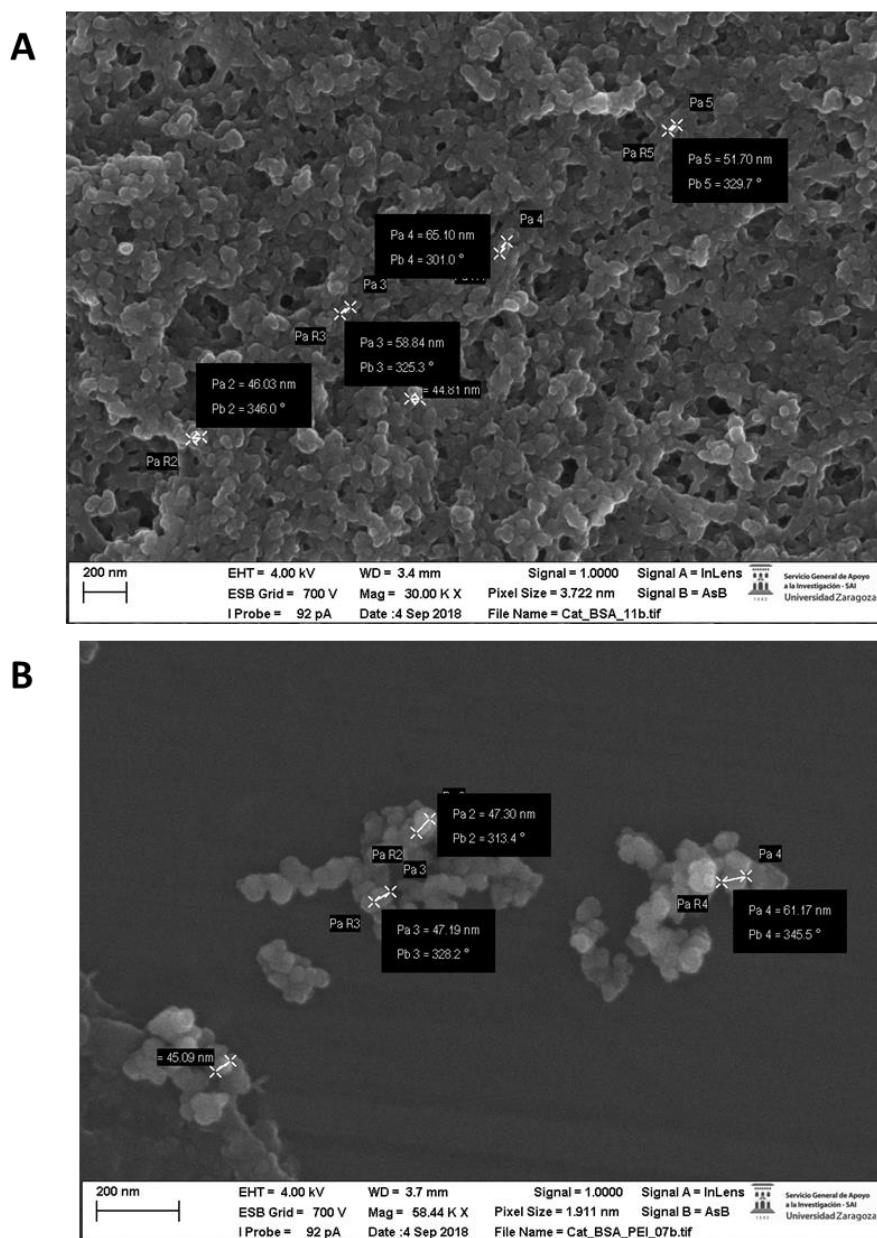


Figura 2.Medida del tamaño de partícula. A. CLEA-CAT/BSA amplificación X 3000k. B.CLEA-CAT/BSA/PEI amplificación X 5844k.

Espectros de Fluorescencia de la inmovilización de Dock-Cian

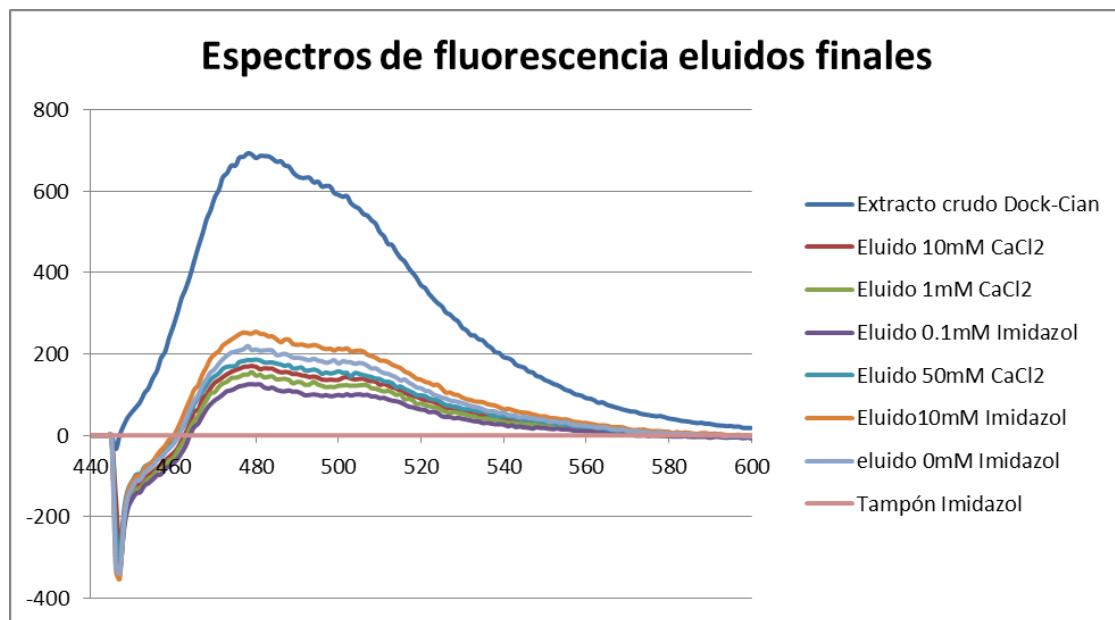


Figura 3. Espectros de Fluorescencia de eluidos finales a distintas concentraciones de imidazol (0-50 mM) y distintas concentraciones de cloruro de calcio (0-10 mM). En azul se representa el extracto crudo soluble.

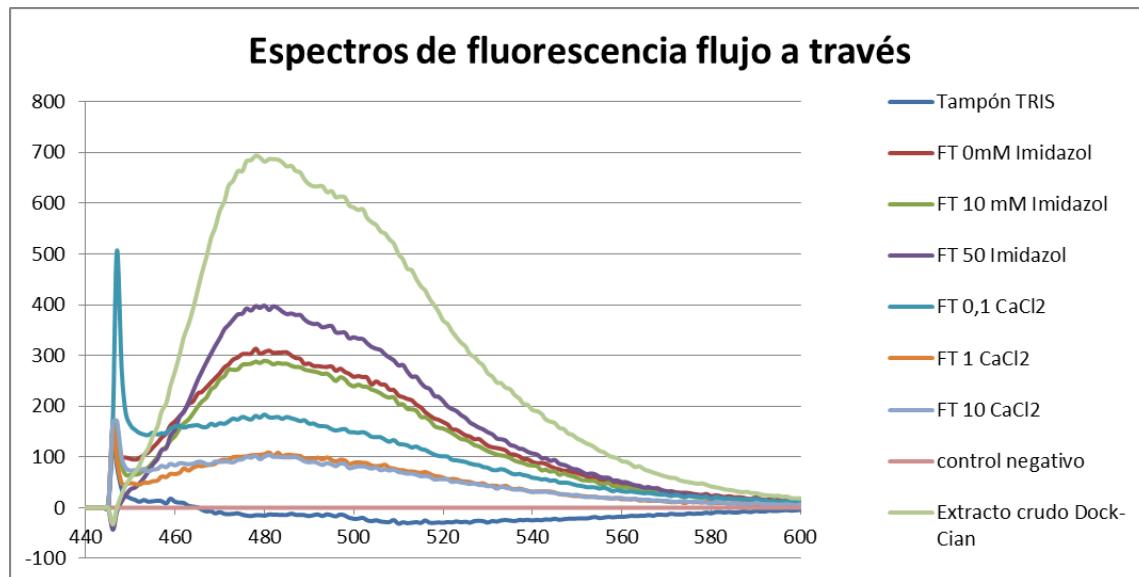


Figura 4. Espectros de Fluorescencia de eluidos finales a distintas concentraciones de imidazol (0-50 mM) y distintas concentraciones de cloruro de calcio (0-10 mM). En verde se representa el extracto crudo soluble.