



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 325 802**

⑫ Número de solicitud: 200702294

⑬ Int. Cl.:

C12N 9/06 (2006.01)

C12N 11/10 (2006.01)

C12N 11/14 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A2

⑫ Fecha de presentación: **16.08.2007**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **17.09.2009**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
17.09.2009

⑰ Solicitante/s: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas** (Titular al 70 %)
c/ Serrano, nº 117
28006 Madrid, ES
Universidad Autónoma de Madrid (Titular al 30 %)

⑱ Inventor/es: **Bolívar Bolívar, Juan Manuel;**
Mateo González, César;
Rocha Martín, Javier;
Fernández Lafuente, Roberto;
Guisán Seijas, José Manuel;
Cava Valenciano, Felipe y
Berenguer Carlos, José

⑳ Agente: **Ungría López, Javier**

② Título: **Procedimiento de inmovilización de una glutamato deshidrogenasa.**

③ Resumen:

Procedimiento de inmovilización de una glutamato deshidrogenasa.

Esta solicitud describe la preparación de un derivado de una glutamato deshidrogenasa (GDH) de *Thermus spp* inmovilizado-estabilizado por unión covalente multipuntual. La enzima soluble ya es muy estable desde pH 6 a pH 10, incluso a 60°C, reconoce NAD, NADH, NADP, y NADPH. Su inmovilización en soportes glioxil permite la estabilización tanto de su estructura multimérica como de la rigidez de cada monómero, aumentando aún más su termoresistencia, y ampliando el rango de utilización a pH inferiores a 5 (donde la enzima soluble se inactiva por disociación). El derivado inmovilizado es resistente a disolventes, alta temperatura, pHs drásticos, etc. Este derivado inmovilizado de la GDH, por lo tanto tendría excelentes posibilidades de utilización como enzima regeneradora de cofactores en procesos de reducción-oxidación enzimáticos o como biosensor.

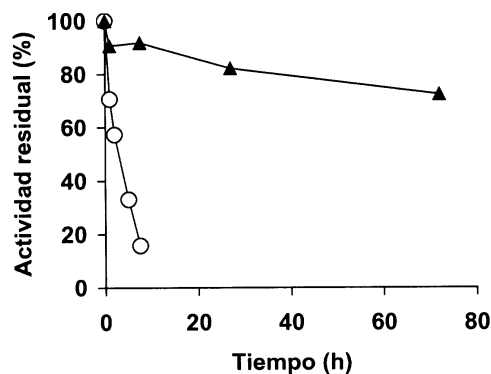


FIG. 3

ES 2 325 802 A2

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de inmovilización de una glutamato deshidrogenasa.

5 Sector de la técnica

La presente invención se encuadra en el sector de la química fina y farmacéutica, más concretamente dentro del campo de la biocatálisis para la regeneración de cofactores (pudiendo usarse para la regeneración de NADH, NADPH, NAD⁺ O NADP⁺). También se refiere al campo de los biosensores, y específicamente a biosensores en procesos fermentativos, control de aguas, etc. Así, la presente invención se refiere a la preparación de una GDH de *Thermus spp* inmovilizada-estabilizada, así como su uso en biotecnología, biocatálisis, fermentación, biomedicina, medio-ambiente, alimentación, control de aguas, etc.

Estado de la técnica

La enzima glutamato deshidrogenasa (GDH) y el sistema enzimático dual, glutamina sintetasa (GS) y glutamato sintasa (GOGAT), son las rutas más importantes mediante las cuales se asimila el amonio (Reitzer y Magasanik (1987), American Society for Microbiology: 302-320). GDH es una enzima extremadamente importante que une el metabolismo de los carbohidratos con el del nitrógeno (Smith *et al.* (1975), The enzymes 11: 293-367), y la función fisiológica de las GDHs como enzimas anabólicas y/o catabólicas se define generalmente por su especificidad por el cofactor. La comparación de las GDHs de bacterias con las de arqueas muestra que las GDHs microbianas pueden dividirse en tres tipos dependiendo del coenzima usado: NADP dependientes (EC 1.4.1.4) (Aalen *et al.* (1997), Arch. Microbiol. 168: 536-539; Ha *et al.* (2003), J. Mol. Catal. B: Enzymatic 26: 231-240; Kobayashi *et al.* (1995), J. Biochem. 118: 587-592; Yip *et al.* (1998), Eur. J. Biochem. 255: 336-346), NAD dependientes (EC 1.4.1.2) (Kujo y Ohshima (1998), Appl. Environ. Microbiol. 64: 2152-2157), y GDHs con doble especificidad para el coenzima (EC 1.4.1.3), siendo estas últimas las más frecuentes entre eucariotas.

La enzima GDH tiene dos aplicaciones biotecnológicas principales: como catalizador en biotransformaciones de reducción-oxidación (red-ox) regenerando el cofactor reducido (usando ácido glutámico) u oxidado (utilizando alfa-ceto glutámico y amoniaco) y como biosensor (Chenault *et al.* (1988), Biotechnology and genetic engineering reviews 6: 221-245; Ha *et al.* (2003), J. Mol. Catal. B: Enzymatic 26: 231-240; Van der Donk y Zhao (2003), Current Opinion in Biotechnology 14: 421-426; Zhao y Van der Donk (2003), Current Opinion in Biotechnology 14: 583-589).

En la primera aplicación, en biocatálisis, esta enzima se acoplaría a otras enzimas red-ox que catalizarían una reacción de interés utilizando cofactores nicotínicos oxidados o reducidos (NAD, NADH, NAP, NADPH), encargándose de su regeneración a partir de un sustrato como el ácido glutámico (para regenerar cofactores reducidos) o el ácido alfa-ceto glutámico y amoniaco (para regenerar cofactores oxidados). La regeneración de cofactor es conveniente ya que de otra forma la reacción transcurriría de forma estequiométrica (y los cofactores son relativamente caros) y sería complicado dirigir la reacción hacia transformaciones cuantitativas del producto deseado (Chenault *et al.* (1988), Biotechnology and genetic engineering reviews 6: 221-245; Van der Donk y Zhao (2003), Current Opinion in Biotechnology 14: 421-426; Zhao y Van der Donk (2003), Current Opinion in Biotechnology 14: 583-589)].

La segunda aplicación de la enzima podría ser como biosensor. La aplicación principal sería en la detección y control de la concentración de ácido glutámico, pero también se ha descrito que esta enzima puede ser utilizada para detectar metales pesados, amoniaco, urea, etc, usualmente acoplándola a otras enzimas (Bertocchi *et al.* (1996), Biosens. Bioelectron. 11: 1-10; Rodríguez *et al.* (2004), Anal. Bioanal. Chem. 380: 284-292; Rodríguez *et al.* (2004), Biosens. Bioelectron. 19: 1157-1167).

En la mayoría de los casos, las GDHs son bastante específicas para el cofactor (NAD o NADP), por lo que resulta necesario utilizar una enzima para cada caso Aalen *et al.* (1997), Arch. Microbiol. 168: 536-539; Ha *et al.* (2003), J. Mol. Catal. B: Enzymatic 26: 231-240; Kobayashi *et al.* (1995), J. Biochem. 118: 587-592; Yip *et al.* (1998), Eur. J. Biochem. 255: 336-346). Además, algunas GDH funcionan de forma óptima solo en un sentido (normalmente oxidando el ácido glutámico). Por ello, sería interesante disponer de enzimas que fueran capaces de reconocer ambos cofactores.

El uso de enzimas de microorganismos termófilos puede tener ciertas ventajas en ambas aplicaciones, como por ejemplo una mayor estabilidad térmica, en ocasiones correlacionada con una mayor estabilidad frente a disolventes y otros agentes inactivantes (Cowan (1997), Comp. Biochem. Phys. A 118: 429-438; Daniel y Cowan (2000), Cell Mol. Life Sci. 57: 250-264; Jaenicke *et al.* (1996), Adv. Prot. Chem. 48: 181-269; Owusu y Cowan (1989), Enzyme Microb. Technol. 11: 568-574). De hecho, se han descrito varias GDHs de origen termófilo que muestran una gran termoestabilidad (Aalen *et al.* (1997), Arch. Microbiol. 168: 536-539; Britton *et al.* (1999), J. Mol. Biol. 293: 1121-1132; Díaz *et al.* (2006), Extremophiles 10: 105-115; Ha *et al.* (2003), J. Mol. Catal. B: Enzymatic 26: 231-240; Hudson *et al.* (1993), Biochim. Biophys. Acta 1202: 244-250; Kort *et al.* (1997), Extremophiles 1: 52-60; Kujo y Ohshima (1998), Appl. Environ. Microbiol. 64: 2152-2157; Robb *et al.* (2001), Methods Enzymol. 331: 26-41; Ruiz *et al.* (2003), J. Prot. Chem. 22: 295-301).

Por otro lado, el uso de enzimas inmovilizados sobre soportes sólidos porosos tiene ventajas, aunque para ambas aplicaciones propuestas en esta patente para las GDHs las enzimas se encuentran habitualmente "inmovilizadas" por

atrapamiento. En el caso del uso como biocatalizadores, las enzimas red-ox suelen utilizarse atrapadas en reactores de ultrafiltración (utilizando cofactores poliméricos) [Hummel (1999), Trends Biotechnol. 17: 487-492; Leonida (2001), Curr. Med. Chem. 8: 345-369; Nakamura *et al.* (1988), Electro-Enzymology Coenzyme Regeneration: 87-161]. Sin embargo, se ha demostrado que la inmovilización de enzimas en sólidos porosos tiene muchas ventajas (Bolívar *et al.* (2006), Biomacromolecules 6: 1027-1030; Bolívar *et al.* (2006), J. Biotechnol. 125: 85-94): se evita cualquier proceso intermolecular (interacción con burbujas de gas, agregación, etc), permite el uso de concentraciones muy altas de enzimas eliminando el riesgo de precipitación, es posible evitar la adsorción de las proteínas a la membrana del reactor, etc. Las enzimas red-ox también se “atrapan” en sistemas bifásicos acuosos (donde está la enzima y el cofactor) mientras que sustratos y productos estarían repartidos en ambas fases (Eckstein *et al.* (2004), Biocat. Biotrans. 22: 89-96). El uso de enzimas pre-inmovilizadas evitará interacciones deletéreas entre la enzima y la superficie hidrofóbica de las gotas de disolvente (Bolívar *et al.* (2006), Biomacromolecules 6: 1027-1030; Bolívar *et al.* (2006), J. Biotechnol. 125: 85-94).

De una forma similar, las enzimas normalmente se usan de forma inmovilizada cuando se emplean como biosensores, pero por atrapamiento en polímeros con los que se “pinta” la superficie del sensor (Basu *et al.* (2006), Bioelectron. 21: 1968-1972; Bertocchi *et al.* (1996), Biosens. Bioelectron. 11: 1-10; Doong and Shih (2006), Biosens. Bioelectron. 22: 185-191; Rodríguez *et al.* (2004), Anal. Bioanal. Chem. 380: 284-292; Rodríguez *et al.* (2004), Biosens. Bioelectron. 19: 1157-1167). También para este tipo de aplicaciones la pre-inmovilización de las enzimas en soportes porosos tiene un cierto interés. En primer lugar, el tamaño de la partícula del sólido será muy grande, permitiendo atrapar la enzima en cualquier tipo de entramado polimérico, por ejemplo sol-geles de gran tamaño de poro (y por lo tanto donde la difusión de sustratos será más sencilla). Además, al tener la enzima dentro de un poro podemos evitar la interacción de la misma con el polímero, que quizás no sea muy compatible con la actividad y estabilidad de las enzimas (Betancor (2005), Biomacromolecules 6: 1027-1030).

Evidentemente las ventajas de usar una enzima pre-inmovilizada para ambas aplicaciones aumentan mucho si el proceso de inmovilización supone una cierta estabilización de las mismas, por ejemplo por enlace covalente multipuntual o multi-subunidad (Fernández-Lafuente *et al.* (2001), Biomacromolecules 2: 95-104; Gupta (1991), Biotechnol. Appl. Biochem. 14: 1-11; Klivanov (1979), Anal. Biochem. 93: 1-25; Klivanov (1983), Biochem. Soc. Trans. 11: 19-20).

En muchos casos, las enzimas multiméricas (como es el caso de la gran mayoría de las GDH descritas) comienzan su inactivación por la disociación de las subunidades, lo que hace que en condiciones de uso continuo o en forma diluida, el catalizador se “inactive” al liberar enzimas al medio (incluso siendo una enzima de un microorganismo termófilo). Esto supone además que la enzima podría contaminar el medio de reacción (no deseable si es un alimento). Por otro lado, el aumento de la rigidez de cada monómero por unión covalente multipuntual podría aumentar de forma muy significativa la estabilidad de las enzimas, incluso en el caso de que ésta sea muy elevada inicialmente, y esta estabilización debería de reflejarse contra cualquier agente que provocara la distorsión de la estructura de la enzima (Nakkharat y Haltrich (2006), Appl. Biochem. Biotechnol. 129: 215-225; Nawani *et al.* (2006), Electron. J. Biotechnol. 9: 559-565; Pessela *et al.* (2003), Biomacromolecules 4: 107-113; Tardioli *et al.* (2006), Enzyme Microb. Technol. 39: 270-278).

Sin embargo, la estabilización de enzimas para esta estrategia requiere el uso de sistema y condiciones adecuados (Gupta (1991), Biotechnol. Appl. Biochem. 14: 1-11; Klivanov (1979), Anal. Biochem. 93: 1-25; Klivanov (1983), Biochem. Soc. Trans. 11: 19-20), y en cada caso el sistema idóneo puede ser diferente. Los soportes glioxil agarosa podrían estar entre los más efectivos para este fin: inmovilizan las enzimas por la región de su superficie más rica en Lisinas, son grupos estables, que no ofrecen impedimentos estéricos, etc. (Mateo *et al.* (2006), Enzyme Microb. Technol. 39: 274-280; Mateo *et al.* (2005), Enzyme Microb. Technol. 37: 456-462).

Anteriormente, ha sido descrita una GDH hexamérica específica para NAD procedente de cultivos de *Thermus thermophilus* HB8 (Ruiz *et al.* (1998), FEMS Microbiol. Lett. 159: 15-20; Ruiz *et al.* (2003), J. Prot. Chem. 22: 295-301). Sin embargo, en el genoma público de la cepa HB27 aparece un segundo gen (código TTC1211) codificante de otra posible actividad GDH. La inmovilización y estabilización de la enzima codificada por este segundo gen, así como su uso en biocatálisis y como biosensor, es el objeto de la presente patente.

Descripción de la invención

Descripción breve

El gen codificante de una glutamato deshidrogenasa (GDH) fue clonado y expresado en *E. coli*. Se ha demostrado que de esta forma se produce una GDH que reconoce NAD y NADP, y que puede catalizar tanto la oxidación de ácido glutámico como la reducción de ácido alfa-ceto-glutárico para regenerar los cofactores reducidos u oxidados respectivamente. La enzima es muy termoestable, pero a pH moderadamente ácido, de especial interés en el reciclaje de cofactores reducidos, sufre un proceso de inactivación por disociación de subunidades que la convierte en una enzima inestable incluso a temperatura ambiente. Esta enzima ha sido inmovilizada en diferentes soportes, entre los que se encuentra el soporte glioxil, que ha permitido mantener un elevado porcentaje de actividad catalítica y ha mejorado de forma significativa su estabilidad en todas las condiciones (diferentes pH, presencia de disolventes, etc). De especial relevancia es el hecho de que su inmovilización en estos soportes permite estabilizar su estructura cuaternaria, aumentando de forma muy significativa su estabilidad a pH ácido.

Descripción detallada

La presente invención se enfrenta al problema de proporcionar un enzima altamente estable, incluso a pH ácido y altas temperaturas, y que presente actividad tanto con NAD(H) como con NADP(H), para su uso como catalizador en reacciones red-ox y como biosensor en la detección de ácido glutámico, metales pesados u otros compuestos.

En la presente invención, los inventores han identificado en el genoma público de la cepa *Thermus thermophilus* HB27 el gen codificante de una glutamato deshidrogenasa (código TTC1211) (<http://wishart.biology.ualberta.ca/BacMap>) utilizando el programa Blastp como herramienta bioinformática en línea. El gen se amplifica mediante la técnica de PCR con dos oligonucleótidos, uno capaz de hibridar sobre el extremo 5' del gen, como por ejemplo el cebador gdh2sense (51-cgcatatgaagagcgaa-3') y que incluye una diana de corte para la enzima de restricción NdeI (subrayada), y otro que hibride sobre su extremo 3', como por ejemplo el denominado gdh2antisense (5'-ttaagggtatagcctccc-3'), con o sin diana de restricción. El producto de la amplificación es clonado en un vector para su replicación y amplificación en *E. coli*, como por ejemplo el vector pCR2.1TOPO (Invitrogen), desde el que es extraído mediante digestión con dos enzimas de restricción, tales como NdeI y HindIII que permiten la inserción dirigida del gen en un plásmido de sobre-expresión que contenga dichas dianas de restricción, como por ejemplo el vector pET28b (Novagen) o el pMKE2, que permiten la inclusión de una secuencia de polihistidinas en el extremo amino terminal. De esta forma se obtiene un plásmido de expresión, como por ejemplo el denominado pET28gdh2, desde el que el gen de la glutamato deshidrogenasa es transcrito de forma masiva a partir de un promotor inducible mediante la adición de una sustancia química, como por ejemplo el isopropil beta galactopiranosido, azúcares o incluso nitrato. Para la producción de la GDH, el plásmido de expresión es transferido a una cepa bacteriana adecuada, como por ejemplo *Escherichia coli* BL21DE3, *Streptomyces spp*, *Bacillus subtilis* o *Thermus thermophilus*, o a una levadura como *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia pastoris*. El microorganismo así obtenido es posteriormente sometido a crecimiento en las condiciones medioambientales propicias, en un medio de cultivo adecuado al que se le puede añadir o no un compuesto inductor de la transcripción como los anteriormente mencionados, prolongando las condiciones adecuadas de cultivo para la transcripción del gen clonado en el vector de expresión. Tras el periodo de expresión apropiado, variable según sea el organismo productor elegido, se procede a la recogida de las células, o en su caso del material secretado al medio de cultivo, para proceder a su tratamiento mediante rotura celular en el primer caso o ultrafiltración en el segundo. En el caso de las células rotas, éstas son sometidas a centrifugación para eliminar el material insoluble. La fracción soluble obtenida puede ser sometida a tratamiento térmico entre 60 y 75°C durante 15 a 60 minutos para desnaturalizar y eliminar posteriormente por centrifugación las proteínas del organismo productor en el caso de que éste no sea termófilo. En todo caso, la fracción soluble de cualquiera de estos procesos es sometida a cromatografía de afinidad en columnas con metales quelados tales como cobalto, níquel o hierro, a los que se unen con alta afinidad las colas de histidina incorporadas a la secuencia del gen de la GDH durante la construcción del vector de expresión. Tras lavados a distintas fuerzas iónicas, la proteína es recuperada en un grado de gran pureza mediante tratamiento con imidazol u otros potenciales agentes quelantes. Finalmente, la solución obtenida de la proteína es dializada para eliminar estos agentes frente a un tampón adecuado para su almacenamiento a baja temperatura.

La enzima así obtenida presentaba actividad tanto con NAD(H) como NADP(H), catalizando la reacción tanto en la dirección de oxidación como en la de reducción, lo que aumentaba en gran medida el interés de esta enzima y la hacía adecuada para todas las posibles aplicaciones de la misma. La enzima es muy estable a pH superior a 6 (manteniendo la actividad casi inalterada incluso a 50°C durante 24 h), pero muestra una estabilidad muy reducida a pH 4 o 5 (donde se inactiva en pocos minutos incluso a 25°C). Los investigadores han mostrado que esta baja estabilidad de la enzima a pH ácido se debía a que en estas condiciones la inactivación de la enzima comenzaba por la disociación de las subunidades y esta se producía de forma muy rápida.

Para mejorar su estabilidad se ha inmovilizado sobre una batería de soportes activados con diferentes grupos (amino, glutaraldehído, epóxido, glioxil, etc). En cada caso se eligieron las condiciones óptimas descritas en la literatura para la inmovilización y rigidificación posterior por unión covalente multipuntual, siendo el que mejor resultado dio la inmovilización sobre soportes glioxil (p.e., glioxil agarosa, glioxil-silica, glioxil- vidrio poroso).

La inmovilización en este tipo de soportes glioxil debía de realizarse a pH alcalino ya que la inmovilización en este soporte debe de producirse directamente a través de varios enlaces imina débiles simultáneamente establecidos entre los grupos amino de la enzima y los grupos aldehído del soporte. Solo a valores de pH cercanos o superiores a 10, las Lisinas (con un pK de 10.7) serán reactivas con los grupos aldehídos permitiendo esta primera inmovilización bipuntual. En estas condiciones la inmovilización es muy rápida, pero dado que deseamos conseguir una unión covalente multipuntual intensa, dejamos que la enzima ya inmovilizada continúe reaccionando con el soporte.

El pH alcalino sigue siendo necesario para conseguir una unión covalente multipuntual intensa, que era el objetivo si se pretende aumentar la rigidez de la estructura de la enzima e implicar las 3 subunidades de la misma en la inmovilización. Por otro lado, el soporte y la enzima no son estructuras complementarias, por lo que el proceso de multi-interacción enzima-soporte requiere condiciones donde la movilidad de las cadenas de la enzima se vea favorecida, es decir, temperaturas moderadamente elevadas (e.g, 35-50°C) y periodos largos de reacción (p.e., 3 horas). También es importante el tampón que se utiliza, no debiendo de contener grupos amino (descartándose el Tris, la etanolamina, etc) ni derivados del ácido bórico, que es capaz de formar complejos con los grupos aldehído reduciendo la reactividad de los grupos. El bicarbonato sería un tampón adecuado para esta reacción (p.e., 100 mM). Dada la importancia del valor de pH, este debe de ser estrictamente controlado para evitar sobre todo que descienda de 10. En el caso de esta enzima extremadamente estable a pH alcalino, es posible trabajar a pH superior a 10. Una variable

clave era la densidad superficial de grupos glioxil en el soporte, que controla el numero de grupos reactivos debajo de cada molécula de proteína y por lo tanto las posibilidades de reacción enzima-soporte (p.e., soportes agarosa 4BCL con 55 micromoles de glioxiles/g húmedo tienen unos 17 aldehído por 1000 Å²).

Tras el periodo de reacción entre la enzima y el soporte, los soportes glioxil tienen una ventaja adicional, pueden reducirse con borohidruro sódico transformando los enlaces imina entre la enzima y el soporte en amino secundario y los aldehídos en hidroxilos, generando enlaces irreversibles y una superficie extremadamente inerte en el soporte. Para ellos se añadía 1 mg de borohidruro sódico en polvo por ml de suspensión (manteniendo el pH en torno a 10 para evitar que el borohidruro se destruya).

El tamaño de poro del soporte es importante, ya que debe de ser el menor posible para permitir que toda la superficie del mismo se recubra de la enzima, no tan pequeño como para que las moléculas de enzima puedan “taponar los poros” ni tan grande que la capacidad de carga se vea muy reducida. Utilizando agarosa 4 BCL, se podían inmovilizar hasta 30 mg de enzima por g de soporte.

Estos derivados eran mucho más estables que la enzima soluble en todas las condiciones de pH y T, presencia de codisolventes, etc.

Se comprobó que esta preparación tenía las 3 subunidades de la enzima unidas al soporte de forma covalente, ya que no se liberaba proteína al medio cuando se hervía en presencia de SDS, lo que evitaba que la enzima se pudiera disociar, con las consiguientes ventajas de estabilidad a pH ácido y ausencia de proteína soluble en el medio de reacción que pudiera contaminar los productos. Por otro lado, la enzima inmovilizada era totalmente estable en sistemas agitados, al no interaccionar la enzima directamente con las burbujas de gas.

La enzima inmovilizada en glioxil-vidrio poroso pudo ser atrapada en polímeros de tetrametil ortosilicato (TI-MOS) sin ningún tipo de pérdida de actividad (lo que la convertía en un posible biosensor con una elevadísima termoestabilidad). Además, no se apreció liberación de la enzima al medio de reacción, incluso utilizando los grados de polimerización menores del sol-gel.

Ejemplos de la invención

1.- Producción de la enzima recombinante

El gen TTC1211 fue amplificado por PCR desde DNA cromosómico de la cepa *Thermus thermophilus* HB27 (<http://wishart.biology.ualberta.ca/BacMap>) con los oligonucleótidos gdh2sense (5'-cgcatatgaagagcgaa-3'), que incluía una diana de corte para la enzima de restricción NdeI (subrayada), y gdh2antisense (5'-ttaagggtataggcccc-3'). El producto de la amplificación fue clonado en el vector pCR2.1TOPO (Invitrogen) para su replicación y amplificación en *E. coli*, y posteriormente extraído mediante digestión con NdeI y HindIII. El fragmento fue clonado en el plásmido pET28b (Novagen) empleando las mismas dianas de restricción, de forma que al gen de la GDH se le añadió una secuencia codificante de 6 histidinas en el extremo 5' en fase con la secuencia codificante. El plásmido de expresión obtenido, denominado pET28gdh2, fue transferido a la cepa *Escherichia coli* BL21DE3 para la producción de la proteína. La cepa resultante fue cultivada en medio LB a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica a 550 nm de 0.5, momento en el que se añadió al cultivo una solución de Isopropil beta D-galactopiranosido hasta alcanzar una concentración final de 1 mM. El cultivo fue mantenido en las mismas condiciones durante 4 horas, momento en el que las células fueron recogidas por centrifugación. Las células fueron resuspendidas en tampón, y se les añadió alúmina como abrasivo necesario para su ruptura mecánica. Los restos celulares y de alúmina fueron eliminados por centrifugación, y el sobrenadante fue utilizado para la purificación de la enzima. Ésta se llevó a cabo en dos pasos. En el primero, el extracto celular fue sometido a calentamiento a 70°C durante 30 minutos para desnaturalizar la mayor parte de las proteínas de *E. coli*, que fueron retiradas mediante centrifugación. En un segundo paso, empleamos cromatografía de afinidad en columnas de Níquel-agarosa y posterior elusión con un gradiente de imidazol, lo que permitió obtener una fracción casi pura de la enzima.

2.- Inmovilización de GDH en glioxil agarosa

La inmovilización se realizó añadiendo a dos gramos de glioxil agarosa 6BCL (funcionalizada con 75 µmol/mL de grupos glioxil por mL de soporte empaquetado) 40 mL de bicarbonato de sodio 100 mM a pH 10.05 que contenía 200 Unidades enzimáticas (U) de glutamato deshidrogenasa. La suspensión se sometió a una agitación suave a 25°C.

A diferentes tiempos de incubación se tomaron muestras tanto de sobrenadante como de suspensión y se determinó la actividad enzimática: un determinado volumen (25-400 µL) de suspensión enzimática se añadió a una celda que contenía 2 mL de ácido glutámico 250 mM y 100 µL de NAD(P) + 100 mM en fosfato de sodio 100 mM a pH 8, a 66°C. La actividad enzimática se mide recogiendo en un espectrofotómetro UV el incremento de absorbancia a 340 nM promovido por la formación de NAD(P)H durante la oxidación de ácido glutámico. Se define una unidad enzimática (U) de actividad como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 pmol de ácido glutámico por minuto a pH 8 y 66°C.

Después de la inmovilización completa de la enzima en el soporte, la suspensión se siguió incubando a 25°C durante diferentes 1,5 h para permitir una interacción más intensa entre la enzima y el soporte. A continuación, se

ES 2 325 802 A2

añadió 40 mg de borohiduro de sodio a estas preparaciones enzimáticas para reducir los enlaces formados entre la proteína y el soporte, la reducción se dejó bajo agitación suave durante 30 minutos a 25°C. Finalmente el derivado enzimático se lavó con abundante agua destilada y fosfato de sodio 100 mM a pH 7.

3.- Inmovilización de GDH en glioxil-vidrio poroso

La inmovilización se realizó añadiendo a dos gramos de vidrio poroso (tamaño 1000A) (funcionalizada con 30 $\mu\text{mol/mL}$ de grupos glioxil por mL de soporte empaquetado) 40 mL de bicarbonato de sodio 100 mM a pH 10.05 que contenía 50 Unidades enzimáticas (U) de Glutamato deshidrogenasa. La suspensión se sometió a una agitación suave a 25°C.

A diferentes tiempos de incubación se tomaron muestras tanto de sobrenadante como de suspensión y se determinó la actividad enzimática: un determinado volumen (25-400 μL) de suspensión enzimática se añadió a una celda que contenía 2 mL de ácido glutámico 250 mM y 100 μL de NAD(P) + 100 mM en fosfato de sodio 100 mM a pH 8, a 66°C. La actividad enzimática se mide recogiendo en un espectrofotómetro UV el incremento de absorbancia a 340 nM promovido por la formación de NAD(P)H durante la oxidación de ácido glutámico. Se define una unidad enzimática (U) de actividad como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 μmol de ácido glutámico por minuto a pH 8 y 66°C.

Después de la inmovilización completa de la enzima en el soporte, la suspensión se siguió incubando a 25°C durante diferentes períodos de 1,5 h para permitir una interacción más intensa entre la enzima y el soporte. A continuación, se añadió 40 mg de borohiduro de sodio a estas preparaciones enzimáticas para reducir los enlaces formados entre la proteína y el soporte, la reducción se dejó bajo agitación suave durante 30 minutos a 25°C. Finalmente el derivado enzimático se lavó con abundante agua destilada y fosfato de sodio 100 mM a pH 7.

4.- Actividad de derivados con los diferentes cofactores y direcciones de reacción

Se utilizó un derivado al que sólo se inmovilizaron 4 UI/g de soporte para evitar problemas de difusión.

La influencia del pH en la actividad enzimática de la preparación glioxil agarosa de la GDH se analizó midiendo la actividad enzimática en la reacción de oxidación de glutamato de sodio con NAD⁺ y NADP⁺, y la reacción de reducción del α -cetoglutarato (α -KGO) con NADH (figura 2). La reacción de oxidación del glutamato se analiza como sigue: un determinado volumen (25-400 μL) de suspensión enzimática se añadió a una celda que contenía 2 mL de glutamato 250 mM y 100 μL de NAD(P)⁺ 100 mM a 66°C. La actividad enzimática se mide recogiendo en un espectrofotómetro UV el incremento de absorbancia a 340 nM promovido por la formación de NAD(P)H durante la oxidación de glutamato de sodio. La reacción de reducción del α -cetoglutarato de amonio se analizó añadiendo un determinado volumen de suspensión enzimática (25-400 μL) a una celda que contenía 2 mL de α -cetoglutarato 250 mM y 100 μL de NADH 10 mM a 66°C. La actividad enzimática se mide recogiendo en un espectrofotómetro ultravioleta el descenso de absorbancia a 340 nm promovido por la oxidación del NADH a NAD⁺, usando 100 mM de fosfato de sodio o amonio al pH indicado. La actividad expresada se recogió durante los primeros 50 segundos de reacción.

La máxima actividad en los 3 casos se encontró a pH 9, siendo la actividad con NADH mayor que con NADPH y la de oxidación mayor que la de reducción a pH ácidos.

La actividad relativa se calculó tomando como 100% la actividad observada en la reacción de oxidación del glutamato con NAD⁺.

5.- Inactivación a pH 7

Todas las inactivaciones se realizaron usando derivados con menos de 4 U/g de soporte, para evitar problemas difusionales que pudieran alterar la caracterización de la estabilidad del catalizador preparado.

Se incubaron en fosfato de sodio 100 mM a pH 7 a 66°C una suspensión de glutamato deshidrogenasa soluble a 0.3 U/mL y el derivado glioxil agarosa 6BCL óptimo a 0.3 U/mL.

A diferentes tiempos se tomaron muestras de suspensión de las dos incubaciones y se determinó la actividad residual según el procedimiento explicado anteriormente, en las mismas condiciones.

La figura 3 muestra la gran estabilidad de la enzima inmovilizada en glioxil agarosa.

6.- Inactivación a pH 4

Todas las inactivaciones se realizaron usando derivados con menos de 4 U/g de soporte, para evitar problemas difusionales que pudieran alterar la caracterización de la estabilidad del catalizador preparado.

Se incubaron en acetato de sodio 100 mM a pH 4 y 25°C una suspensión de glutamato deshidrogenasa soluble y de derivado glioxil agarosa a diferentes concentraciones.

A diferentes tiempos se tomaron muestras de suspensión de las dos incubaciones y se determinó la actividad residual, midiendo la actividad según el procedimiento explicado anteriormente, en las mismas condiciones. La Figura 4 muestra que, mientras la enzima soluble era muy inestable y su estabilidad dependía de la concentración, la del derivado no.

7.- Atrapamiento en tetrametil ortosilicato

El atrapamiento de GDH inmovilizada en tetrametil ortosilicato se realizó preparando capas finas sobre vidrio de 2 x 3 cm.

La placa de vidrio se lavó sucesivamente con tolueno, acetona y etanol. A continuación se incubó en 1M NaOH durante 24 h. Después se lavó con agua y se sonicó durante 20 minutos el vidrio para asegurar su limpieza, secándose a 120°C durante 2 h.

Una solución de TIMOS pre-polimerizado se preparó por catálisis ácida. Para ello, 1.1 g de TIMOS y 2 mL de agua destilada se mezclaron e incubaron durante 5 minutos a -20°C. Esta solución bifásica se agitó vigorosamente mientras se añadió 0.5 mL de HCL 0.1 M. La mezcla se dejó 5 minutos a -20°C y entonces se almacenó a 4°C. Tras 24 h, 0.5 ml de esta solución pre-polimerizada se mezclaron con 0.5 ml de NaOH 50 mM y se agitaron vigorosamente mientras se añadían 0.5 mL de una suspensión de 2 U de GDH inmovilizada en glioxil-vidrio poroso (en una suspensión 1:1). La mezcla se vertió sobre las placas de vidrio y la polimerización fue completa unos 2 minutos después de la adición de la enzima. Más del 80% de la actividad se recuperó, mostrando una estabilidad muy similar a la de la enzima inmovilizada sin atrapar, lo que muestra que la pre-inmovilización evita interacciones no deseadas con el polímero y permite mantener la estabilidad conseguida por unión covalente multipuntual.

Descripción de las figuras

Figura 1

Expresión, purificación y actividad enzimática de la GDH

A) Expresión en *E. coli*. Carriles: 1) Marcadores de tamaño (115.9, 96.7, 51.5, 37.7, 29.2); 2) *E. coli* transformada con pET28b; 3) *E. coli* transformada con pET28gdh; B) Purificación de Gdh. 4) Fracción obtenida tras el calentamiento; 5) Paso de muestra; 6-10) fracciones eluidas con imidazol. C) Actividad GDH detectada por incremento de la absorción a 340 nm debida a la reducción de NAD⁺. 1) Fracción soluble de *E. coli* transformada con pET28b tras el calentamiento a 70°C; 2, 3) Fracciones de enzima purificada correspondiente a las muestras de los carriles 7 y 8 del panel B.

Figura 2

Influencia del pH en la actividad del derivado óptimo de GDH

(●) Glioxil agarosa 6BCL, reacción de oxidación del glutamato de sodio con NAD⁺. (◆) Glioxil agarosa 6BCL, reacción de reducción del α -cetoglutarato de amonio con NADH. (■) Glioxil agarosa 6BCL, reacción de oxidación del glutamato de sodio con NADP⁺. Los ensayos enzimáticos se realizaron a 66°C, tal y como se describe anteriormente.

Figura 3

Cursos de inactivación de diferentes preparaciones de GDH

Las condiciones fueron 66°C, pH 7, 0.3 U /mL. Fosfato de sodio 100 mM

(○) GDH soluble.

(▲) Glioxil agarosa 75 μ mol/g 25°C 1,5 h.

Figura 4

Inactivación a pH 4 de diferentes preparaciones de GDH a diferente concentración, 25°C, acetato de sodio 100 mM, pH 4

(○) Soluble GDH 0.3 U/mL (□) Soluble GDH 0.06 U/mL.

(▲) Glioxil agarosa 75 μ mol/g 25°C 1.5 h 0.3 U/mL

(◆) Glioxil agarosa 75 μ mol/g 25°C 1.5 h 0.06 U/mL.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento de inmovilización de una glutamato deshidrogenasa de *Thermus thermophilus* **caracterizado** porque la enzima se estabiliza por unión covalente multipuntual y multi-subunidades sobre soportes activados con grupos glioxil y porque comprende las siguientes etapas:
- i) inmovilización de la enzima sobre un soporte glioxil
 - 10 ii) incubación de la enzima inmovilizada en condiciones adecuadas para conseguir una unión covalente multipuntual intensa
 - iii) reducción final de la preparación con un agente reductor de aldehídos e iminas (p.e. borohidruro).
- 15 2. Procedimiento según reivindicación 1 en el que el soporte es agarosa, vidrio poroso o soportes de base silíceas.
3. Procedimiento según las reivindicaciones 1 y 2 en el que la inmovilización y la incubación se realizan entre pH 9.5 y 11.
- 20 4. Procedimiento según las reivindicaciones anteriores en el que la enzima se deja reaccionar con el soporte entre 1 h y 24 h.
5. Procedimiento según las reivindicaciones anteriores en el que la temperatura de inmovilización y de incubación está entre 4°C y 50°C.
- 25 6. Procedimiento según las reivindicaciones anteriores en el que el agente reductor de aldehído es el borohidruro sódico.
7. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 6 **caracterizado** porque la glutamato deshidrogenasa inmovilizada-estabilizada presenta actividad tanto con NAD(H) como con NADP(H) y se utiliza en la regeneración de cofactores oxidados o reducidos.
- 30 8. Procedimiento según la reivindicación 7 en el que la enzima inmovilizada-estabilizada finalmente se utiliza para regenerar NAD.
- 35 9. Procedimiento según la reivindicación 7 en el que la enzima inmovilizada-estabilizada se utiliza para regenerar NADH.
- 40 10. Procedimiento según la reivindicación 7 en el que la enzima inmovilizada-estabilizada se utiliza para regenerar NADP.
11. Procedimiento según la reivindicación 7 en el que la enzima inmovilizada-estabilizada se utiliza para regenerar NADPH.
- 45 12. Procedimiento según las reivindicaciones 1-6 en el que la preparación enzimática se atrapa en sol-geles u otros polímeros para depositar en el sensor de biosensores (por ej. de ácido glutámico, metales pesados, amoníaco, urea, etc).
- 50 13. Un biocatalizador de Glutamato deshidrogenasa de *Thermus thermophilus* inmovilizada-estabilizada por el procedimiento según las reivindicaciones 1 a 12.
14. Uso de una glutamato deshidrogenasa de *Thermus thermophilus*, inmovilizada-estabilizada según las reivindicaciones 1 a 12, como enzima regeneradora de cofactores en procesos de reducción-oxidación enzimáticos.
- 55 15. Uso de una glutamato deshidrogenasa de *Thermus thermophilus*, inmovilizada-estabilizada según las reivindicaciones 1 a 12, como biosensor, por ej. de ácido glutámico, metales pesados, amoníaco, urea, etc...
- 60
- 65

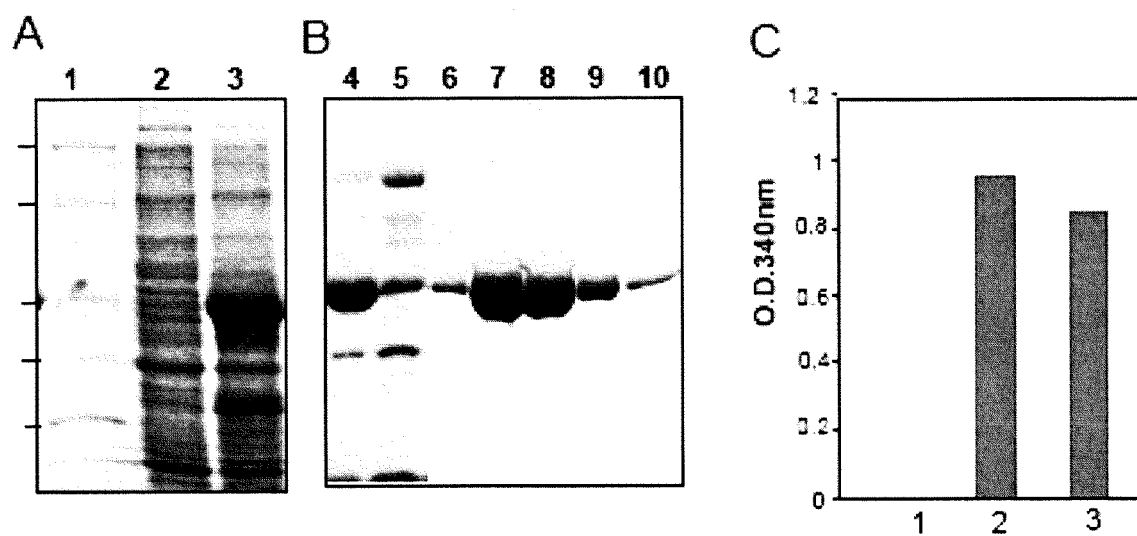


FIG. 1

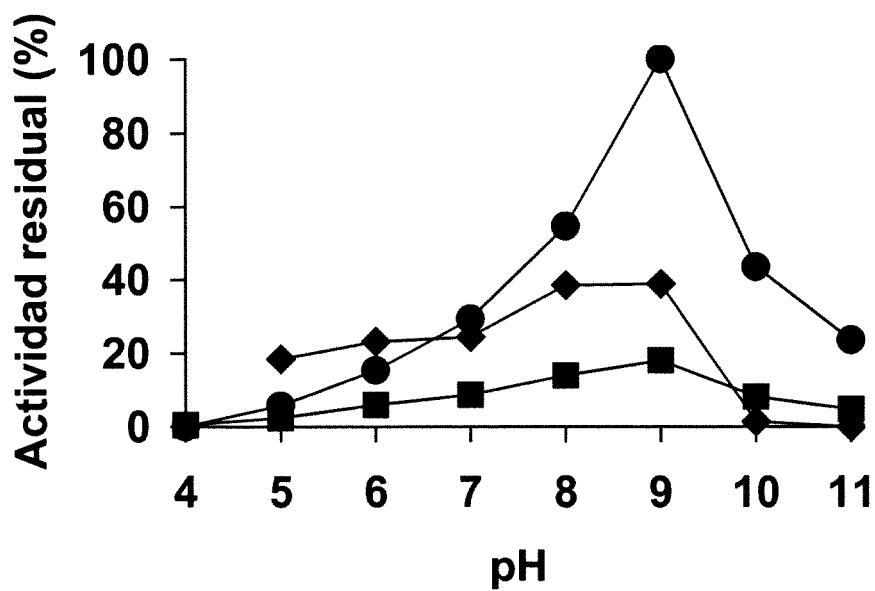


FIG. 2

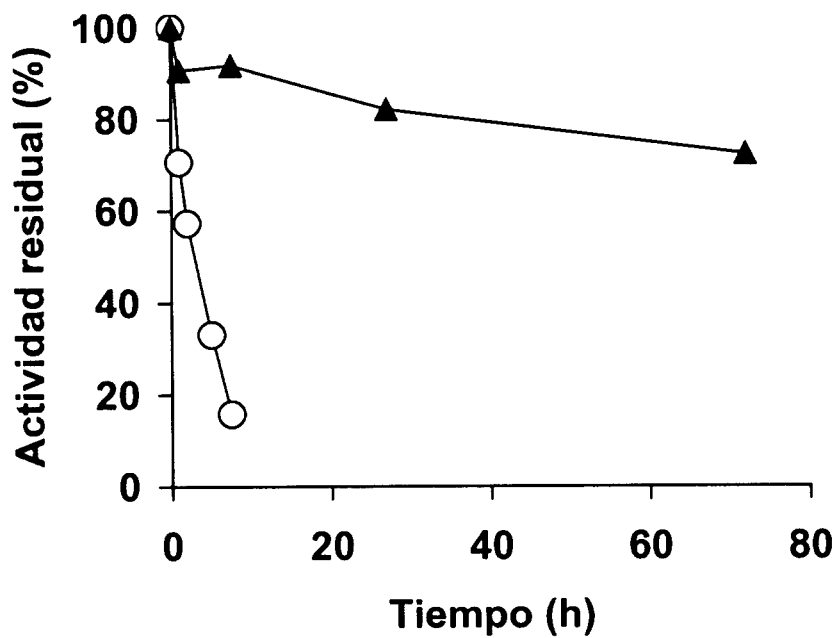


FIG. 3

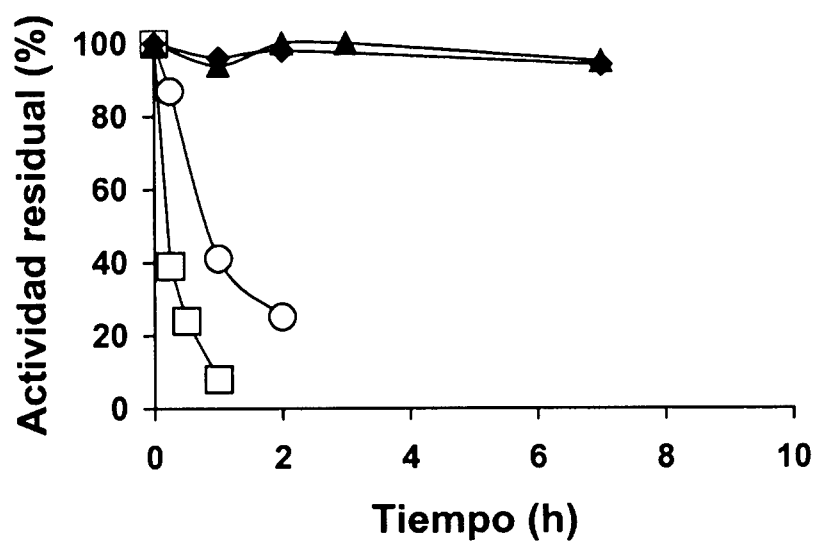


FIG 4