

BV19. Inmovilización de la enzima de hiosciamina 6β-hidroxilasa a hidrogeles de quitina para su reutilización en la producción de anisodamina y escopolamina

Minoia, J.M. (1)*; Villanueva, M.E. (2); Copello, G.F. (2); Rodríguez Talou, J. (1); Cardillo, A.B. (1).

(1) Instituto de Nanobiotecnología (NANOBIOTEC), Universidad de Buenos Aires-CONICET, Argentina (2) Instituto de Química y Metabolismo del Fármaco (IQUIMEFA), Universidad de Buenos Aires-CONICET, Argentina. *jminoia@docente.fyb.uba.ar

La enzima hiosciamina 6β-hidroxilasa (H6H) es el catalizador final de la ruta biosintética de escopolamina y se encuentra en diversas especies de plantas de la familia Solanacea. Tanto el sustrato de la enzima —hiosciamina— como sus productos —anisodamina y escopolamina— poseen propiedades farmacológicas y son utilizados como principios activos en diferentes fármacos. El método de producción actual se basa en el cultivo de las plantas y su posterior extracción. Sin embargo, la planta no es capaz de producir anisodamina y escopolamina —esta última de mayor valor comercial— en elevadas concentraciones aun encontrándose presente su precursor.

En este trabajo se investiga la utilización in vitro de la H6H proveniente de la planta *Brugmansia candida* fusionada a un dominio de afinidad a quitina (ChBD) e inmovilizada en partículas de hidrogel de quitina con el objetivo de transformar hiosciamina en sus productos. Para ello, la construcción ChBD-H6H se clonó en el vector pET-22(b) y se expresó de forma recombinante en cepas de *E.coli* Origami (DE3). Posteriormente, se evaluó la inmovilización y actividad enzimática utilizando buffer Tris-CIH 50 mM pH 7,6 en dos condiciones de fuerza iónica diferente, A=750 mM (n=3) y B=1 M NaCl (n=2). Cada inmovilización se llevó a cabo por exposición de los extractos de proteína solubles clarificados con las matrices de quitina en una relación 1,5 ml volumen de matriz – 3 mg proteínas solubles totales, evaluándose la unión específica de la enzima ChBD-H6H mediante SDS-PAGE teñidos con azul brillante de Coomassie y Western-Blot contra la proteína H6H. De forma seguida, las enzimas inmovilizadas fueron sometidas a cinco ciclos de reacción (24h/ciclo, 30°C, 200 rpm) y la conversión de hiosciamina fue evaluada mediante cromatografía líquida de alta performance. El porcentaje de bioconversión a anisodamina comparando las condiciones A y B en los ciclos de reacción 1 (75,9±3,6 vs 31,0 ±2,5) y 2 (53,7±2,0 vs 35,8±0,8) fue significativamente diferente (p<0,05). De igual manera, la obtención de escopolamina (%) fue significativamente diferentes (p<0,05) entre ambas condiciones para los ciclos de reacción 1 (2,5±0,4 vs 0,3±0,1) y 2 (1,4±0,2 vs 0,5±0,04). A partir del ciclo 3, las conversiones no fueron significativamente diferentes para ninguno de los productos, obteniéndose para anisodamina los siguientes valores para las condiciones A y B, respectivamente: ciclo 3 (34,3±1,7 vs 29,1±5,0); 4 (23,4±0,7 vs 22,6±1,4) y 5 (7,2±1,8 vs 8,4±0,8).

En conclusión, se demuestra la capacidad de la enzima de fusión ChBD-H6H de unirse a matrices de quitina y la viabilidad de este sistema para su uso en ciclos sucesivos de producción de anisodamina y escopolamina. Por otro lado, se describe la condición más favorable para su inmovilización y utilización, lo cual además sienta las bases para los futuros ensayos en los que se evalúe la tolerancia a diferentes condiciones operacionales.