

INMOVILIZACIÓN DE LA ENZIMA FDH EN UNA MATRIZ METALORGÁNICA MAGNÉTICA Y SU UTILIZACIÓN EN LA REDUCCIÓN DE CO₂

Aguirre Matías E.^{1,2}, Ramírez Cristina L.¹, González Pablo J.³ y Churio María S.^{1,2}

1 Departamento de Química y Bioquímica, FCEyN, Universidad Nacional de Mar del Plata (UNMDP). Funes 3350, CP 7600, Mar del Plata, Argentina.
2 Instituto de Investigaciones Físicas (UNMDP-CONICET). Mar del Plata, Argentina.
3 Departamento de Física, FBCB, Universidad Nacional del Litoral. Paraje El Pozo s/n (Ciudad Universitaria), CP S3000ZAA, Santa Fe, Argentina.
meaguirre@mdp.edu.ar



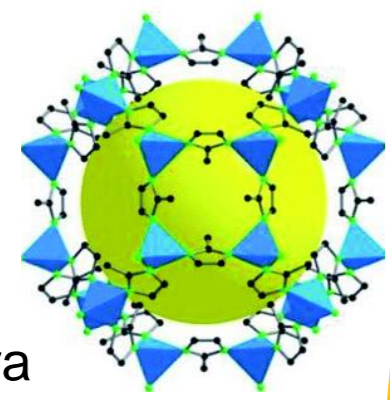
1. Introducción

La catálisis enzimática permite conducir reacciones con alta especificidad y bajo costo energético pero se encuentra limitada por la pérdida de actividad y la dificultosa recuperación de los biocatalizadores. La inmovilización de enzimas en matrices sólidas es un recurso frecuente que reduce la desnaturalización y facilita el reciclado y, en casos selectos, también puede aumentar la actividad. La gran porosidad y orden estructural de los armazones metalorgánicos (MOFs) los posicionan como excelentes materiales para tal fin [1]. En esta presentación, se informa la síntesis y caracterización de un sistema formado por un MOF basado en Zn(II) y 2-metilimidazol (ZIF-8) modificado con magnetita (Fe₃O₄), adecuado para la encapsulación en fase acuosa de la enzima formiato deshidrogenasa (FDH) y su aplicación en la reacción de reducción de CO₂.

Los MOFs (*Metal Organic Frameworks*) son materiales cristalinos compuestos por redes 3D de iones metálicos o pequeños *clusters* conectados mediante ligandos orgánicos. Poseen estructuras jerárquicas de alta porosidad con canales y cavidades de forma y tamaño regular. Sus propiedades son modulables mediante la elección de precursores.

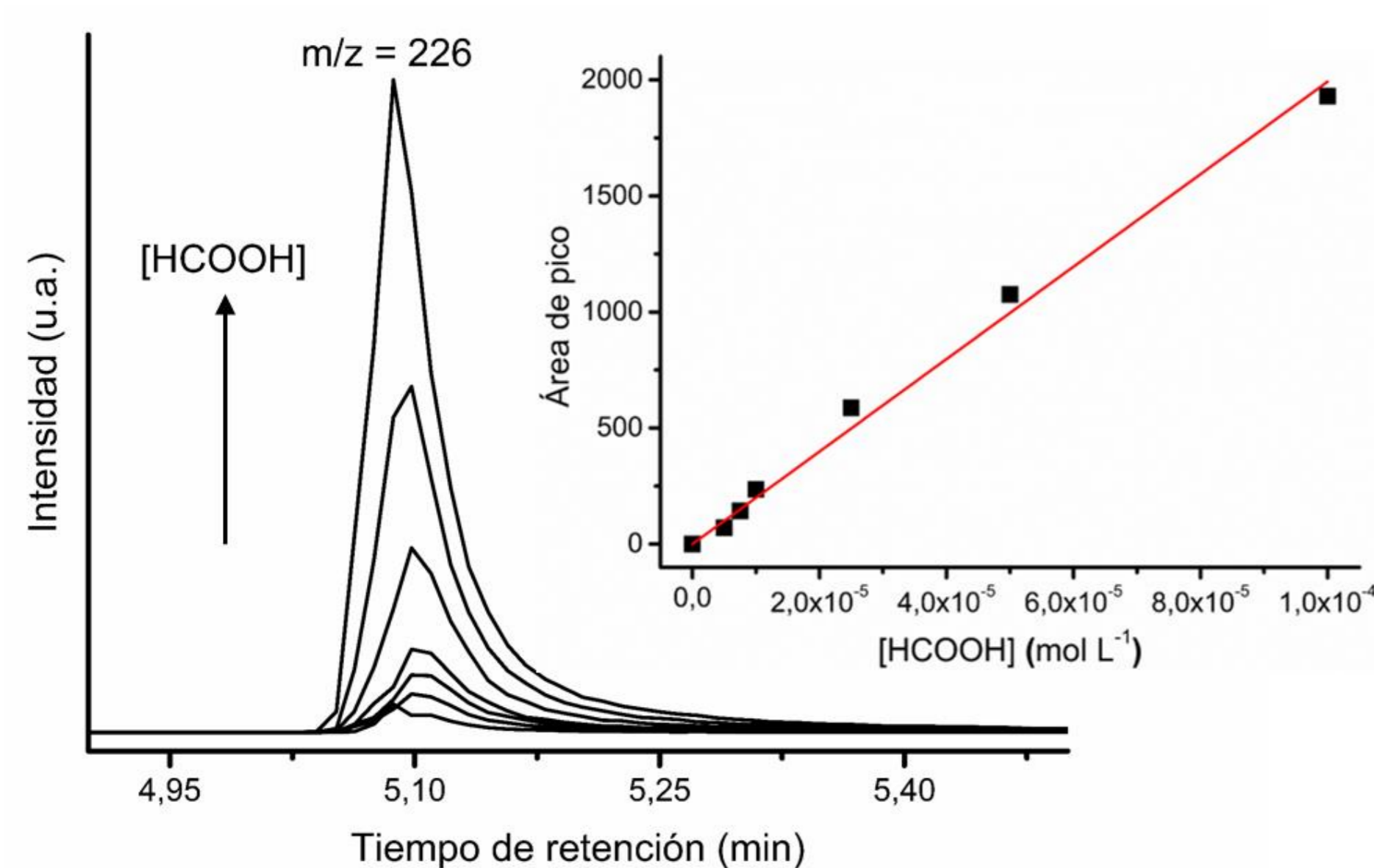
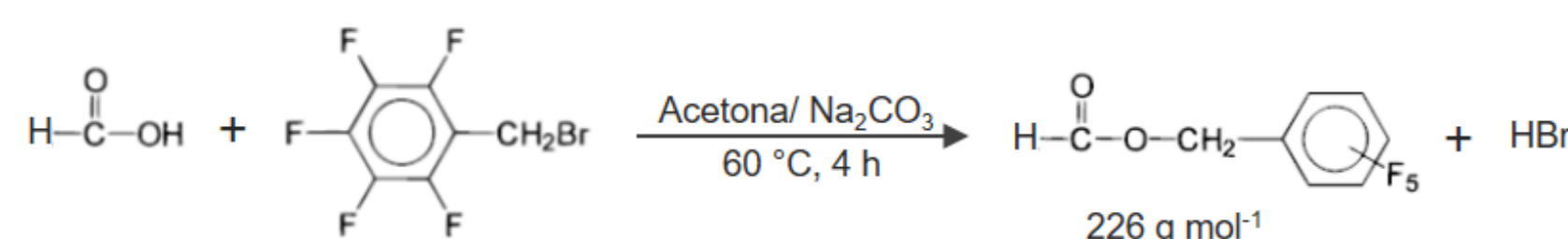
ZIF-8

- # Fácil modificación con partículas magnéticas.
- # Gran estabilidad en condiciones óptimas de FDH.
- # Sintetizable en agua a temperatura ambiente [2].



4. Seguimiento de la reacción

El ácido fórmico (HCOOH) se derivatizó con bromuro de pentafluoro bencilo, se extrajo el éster generado con acetato de etilo y se analizó por cromatografía gaseosa con detección por espectrometría de masas (GC-MS) bajo la modalidad de *Single Ion Monitoring* (SIM), evaluando el fragmento con m/z=226.

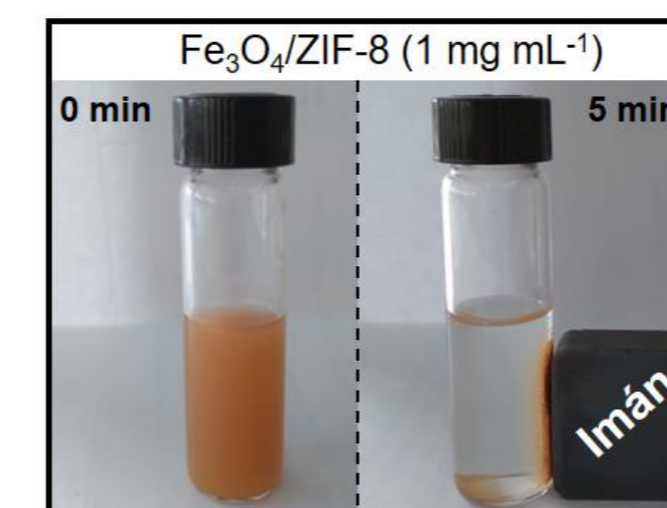


6. Conclusiones

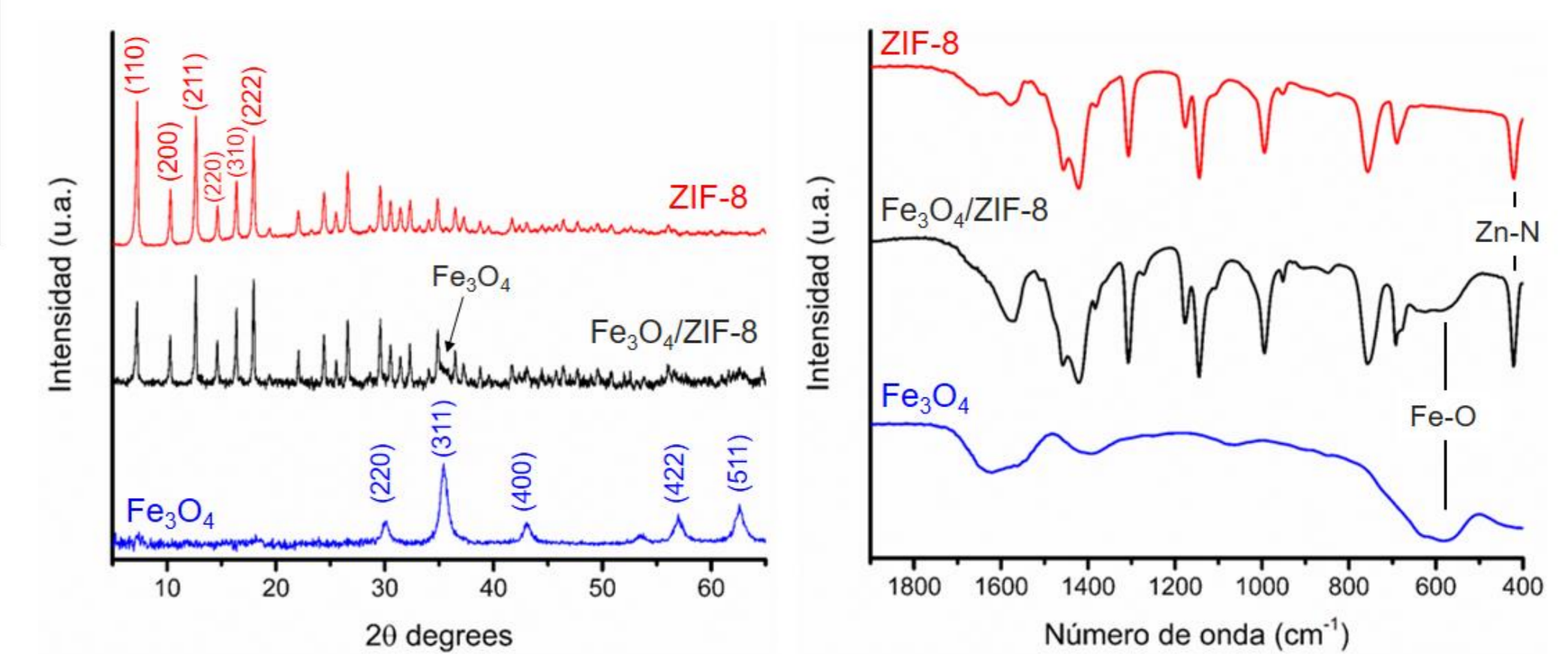
- # La síntesis en agua da lugar a un MOF altamente cristalino con gran control morfológico. El soporte obtenido consistió en dodecaedros rómbicos truncados de ZIF-8, decorados superficialmente con partículas esféricas de Fe₃O₄.
- # Si bien la FDH comercial presentó baja actividad en la reacción reversa, se pudo demostrar que su integridad estructural no se ve afectada en la inmovilización debido a las suaves condiciones de obtención de la matriz metalorgánica.
- # Como consecuencia de la estrategia de inmovilización aplicada, la enzima confinada en el MOF magnético presenta una actividad 3,5 veces superior en la reducción de CO₂ respecto a cuándo opera en forma homogénea, es decir libre.
- # Las marcadas propiedades magnéticas del sistema biocompuesto permitirán su reciclado y reutilización.

2. Síntesis y caracterización del soporte

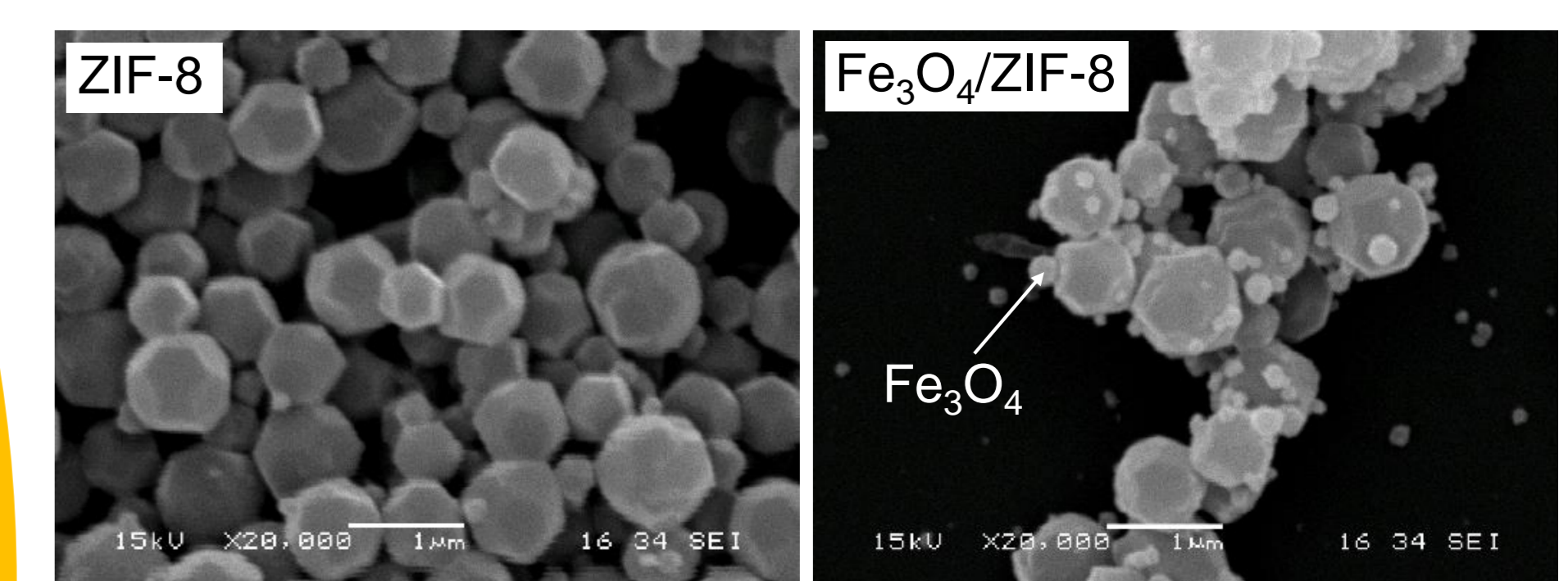
Estrategias sintéticas	Fe ₃ O ₄	Síntesis solvotermal (150 °C, 8 h) en etilenglicol a partir de FeCl ₃ ·6H ₂ O en presencia de citrato de sodio y acetato de sodio.
	ZIF-8	Método hidrotérmico (25 °C, 30 min) a partir de Zn(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O y 2-metilimidazol (2-Hmim). Relación molar de precursores R= Zn ²⁺ :2Hmim:H ₂ O = 1:40:2222.
	Fe ₃ O ₄ /ZIF-8	Síntesis de ZIF-8 en presencia de partículas de Fe ₃ O ₄ pre-sintetizadas (12 mg).
Caracterización		Los sólidos se caracterizaron por difracción de rayos X (XRD), espectroscopia infrarroja (FTIR), microscopía electrónica de barrido (SEM).



Propiedades magnéticas, XRD y FTIR

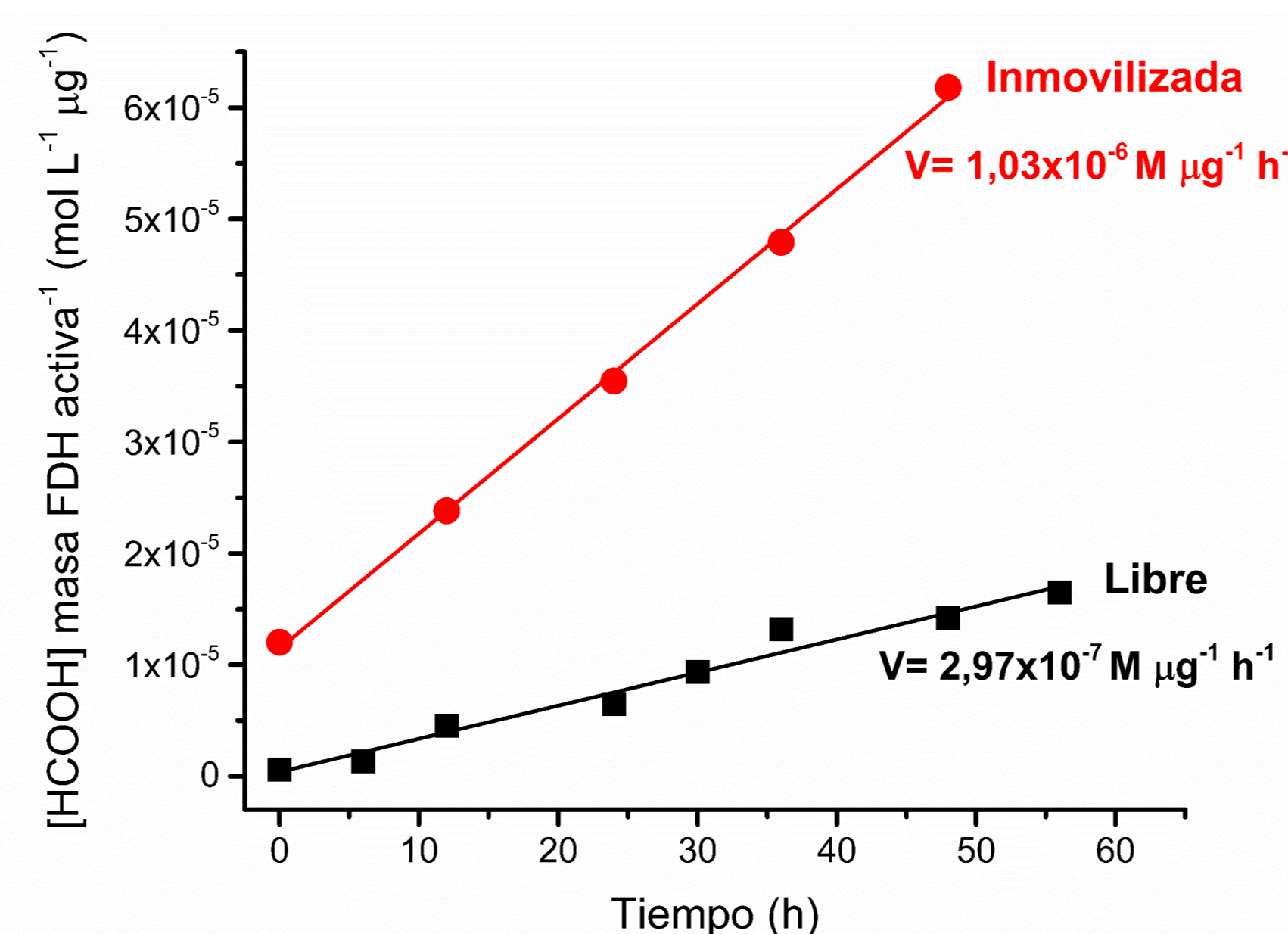


Imágenes de SEM

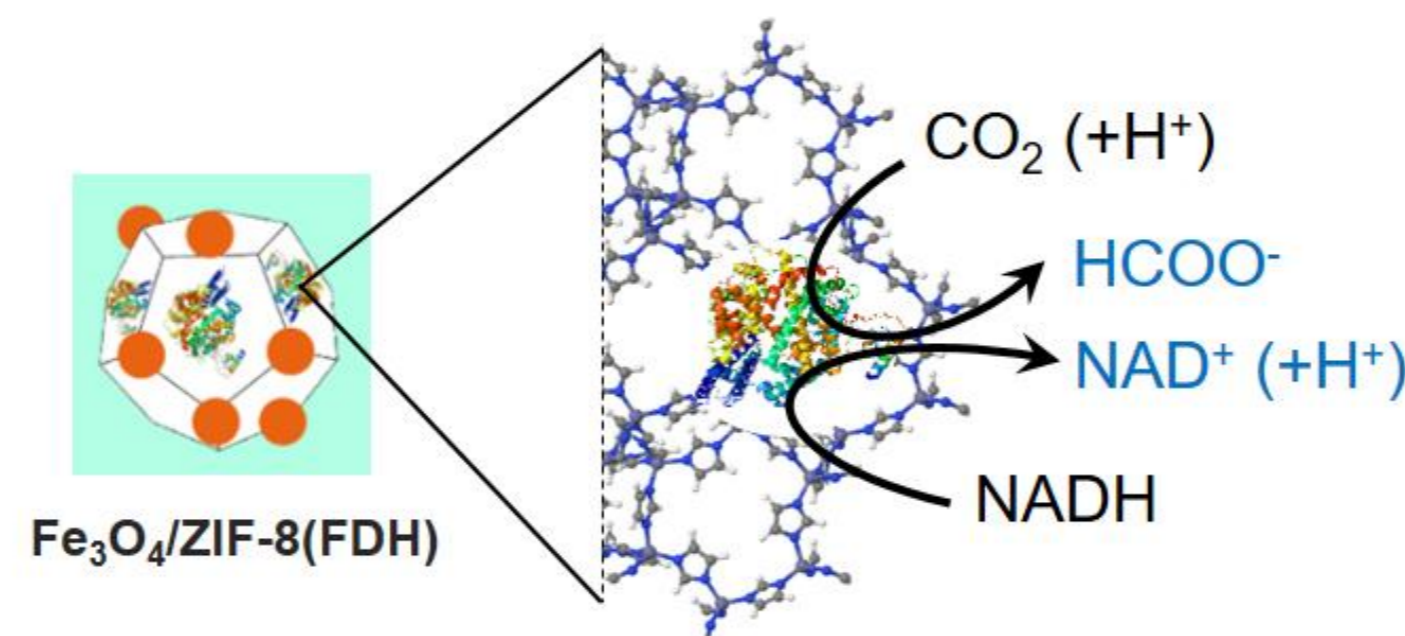


5. Reducción de CO₂

La reacción reversa se llevó a cabo en medio anaeróbico, 37 °C y pH 7 (Tris-HCl 0,05 mol L⁻¹) con NaHCO₃ (0,1 mol L⁻¹) y NADH (0,05 mol L⁻¹) como fuente de CO₂ y donador de electrones y protones, respectivamente. Temporalmente, se evaluó el HCOOH generado.

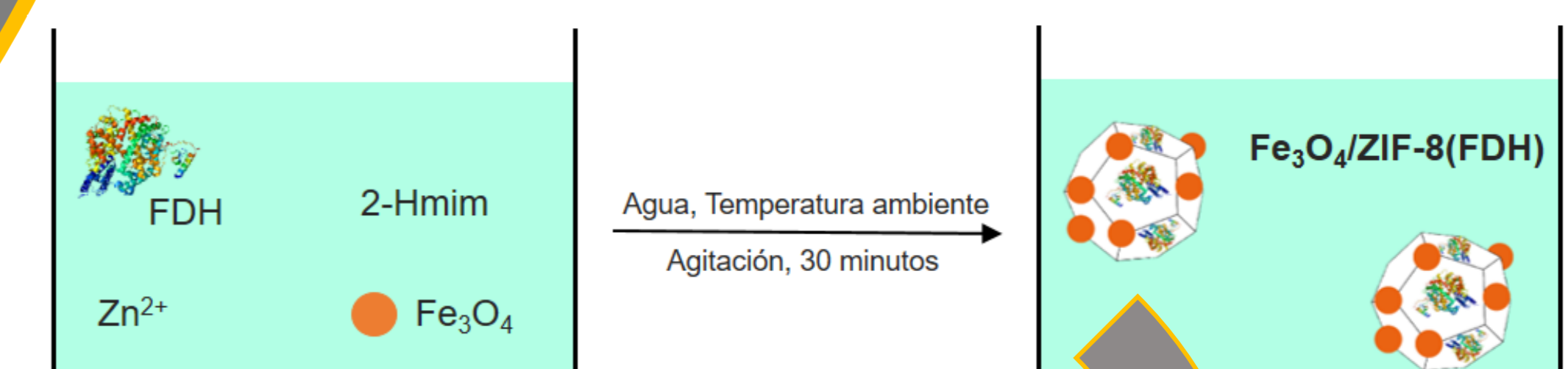


Reacción con FDH inmovilizada



3. Inmovilización de la FDH

Se logró sintetizando el Fe₃O₄/ZIF-8 en presencia de 4 mg de polvo liofilizado de FDH proveniente de *E. coli* recombinante (*Creative Enzymes*).

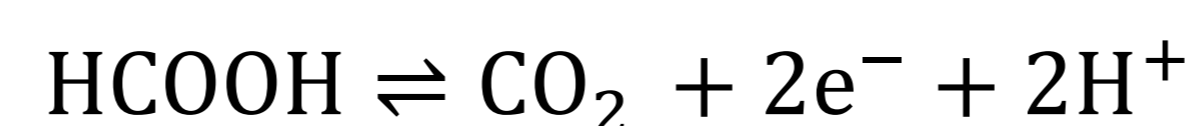


El análisis por Bradford del sobrenadante indica que toda la proteína ha sido inmovilizada en la matriz.

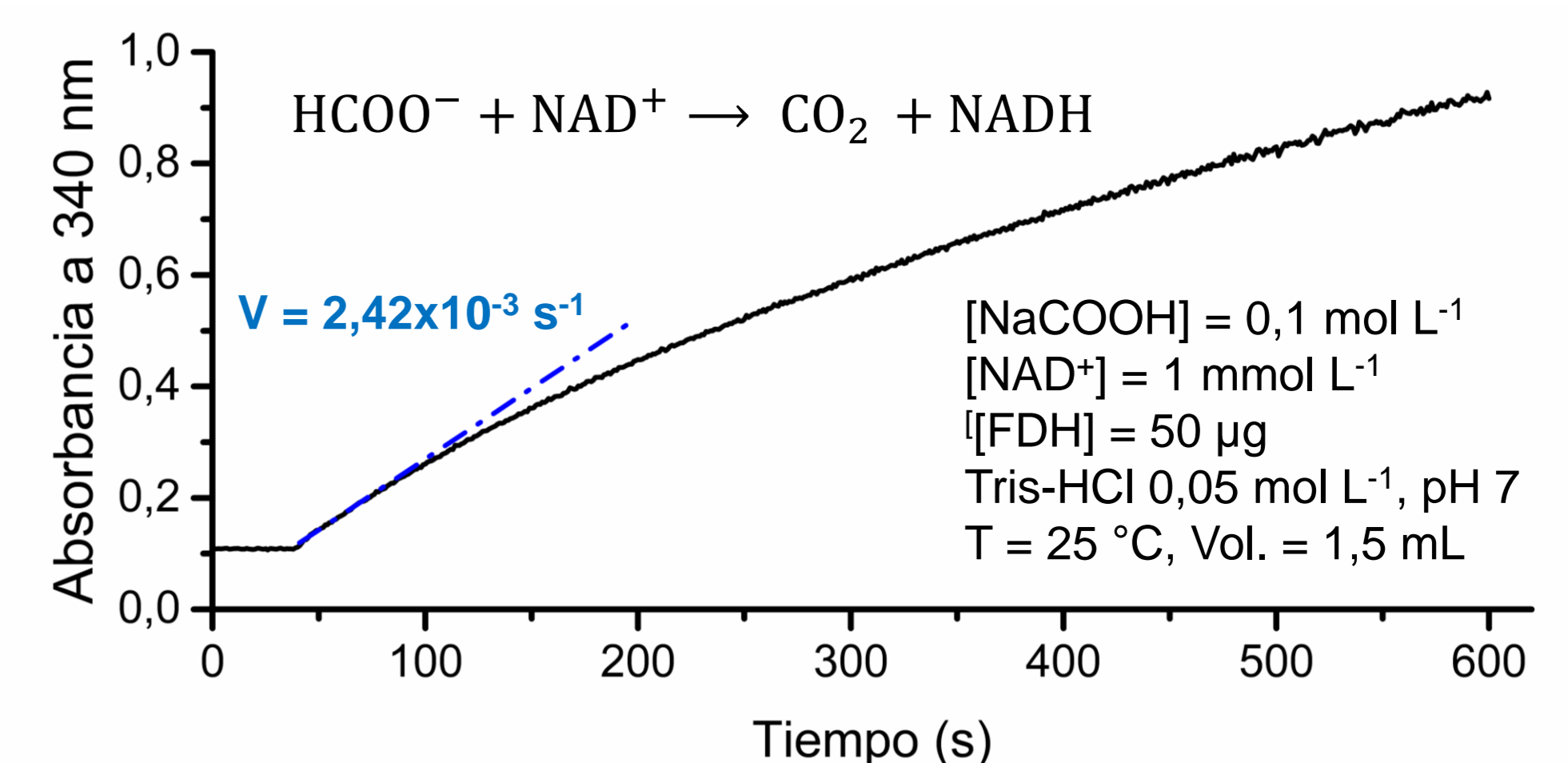
Encapsulación: 0,5 µg de FDH activa/ mg de Fe₃O₄/ZIF-8

Determinación de enzima activa

La enzima FDH presenta reversibilidad para la interconversión:



donde la reacción en el sentido de la oxidación (directa), es la más favorable [3]. La proporción de proteína activa en el polvo liofilizado se determinó a partir de la oxidación de formiato, monitoreando la absorbancia del NADH generado a 340 nm.



8,75 µg FDH activa/ mg de polvo liofilizado
Actividad específica: 0,68 U/mg de polvo liofilizado

7. Proyección a futuro

- # Continuar la caracterización del sistema Fe₃O₄/ZIF-8(FDH) para determinar el lugar de residencia y la forma de anclaje de la enzima de manera de diferenciar los mecanismos de inmovilización y racionalizar el proceso de catálisis.
- # Estudiar los procesos utilizando variantes de FDHs provenientes de *Thiobacillus* sp. y *Cupriavidus necator* que resultan más activas en la reducción de CO₂ [3], para reducir los tiempos y costos de implementación.
- # Llevar a cabo ciclos de reciclaje/reutilización y estudios de estabilidad de largo tiempo frente al almacenamiento.

Bibliografía

- [1] Wang, X., Lan, P. C., Ma, S. *ACS Cent. Sci.* **2020**, 6, 1497–1506.
- [2] Kida, K., Okita, M., Fujita, K., Tanaka S., Miyake, Y. *CrystEngComm* **2013**, 15, 1794–1801.
- [3] a) Choe, H., Joo, J. C., Cho, D. H., Kim, M. H., Lee, S. H., Jung, K. D., Kim, Y. H. *PLoS ONE* 9(7): e103111. b) Yu, X., Niks, D., Mulchandani, A., Hille, R. *J. Biol. Chem.* **2017**, 292, 16872–16879.