

Índice

ÍNDICE DE FIGURAS	3
ÍNDICE DE TABLAS	4
AGRADECIMIENTOS	5
RESUMEN	7
INTRODUCCIÓN	8
ANTECEDENTES	9
<i>Quiralidad</i>	9
<i>Síntesis de compuestos quirales mediante biocatálisis</i>	9
Enzimas aisladas como biocatalizadores	10
Oxidoreductasas: ventajas de las células enteras como biocatalizadores	11
Desarrollo futuro de la biocatálisis	12
α -alquil- β -hidroxiésteres	13
Aplicaciones sintéticas de α -alquil- β -hidroxiésteres quirales	13
Síntesis de α -alquil- β -hidroxiésteres	15
Búsqueda de nuevas β -CER	22
PROPUESTA DE TRABAJO	23
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
IDENTIFICACIÓN DE GENES CODIFICANTES PARA POSIBLES REDUCTASAS Y CONSTRUCCIÓN DE CEPAS RECOMBINANTES QUE SOBREEXPRESAN ESTAS ENZIMAS	25
<i>Identificación del gen que codifica para la βCER presente en <i>Paucimonas lemoignei</i></i>	25
Análisis de las secuencias de pPP1 y pPP2	28
Análisis de las secuencias de pPP5, pPP6 y pPP7	31
<i>Construcción de cepas de <i>E. coli</i> recombinantes que expresan la βCER de <i>P. lemoignei</i> para su uso en biocatálisis</i>	35
<i>Análisis del método de identificación de genes con actividad reductasa</i>	36
SÍNTESIS DE α -ALQUIL- β -CETOÉSTERES Y DE α -ALQUIL- β -HIDROXIÉSTERES RACÉMICOS	37
<i>Síntesis de α-alquil-β-cetoésteres</i>	37
<i>Síntesis de los α-alquil-β-hidroxiésteres racémicos y resolución por cromatografía gaseosa</i>	39
BIOTRANSFORMACIONES	40
<i>Biotransformación de α-etil acetoacetato de etilo</i>	40
Biotransformación de α -etil acetoacetato de etilo con <i>E. coli</i> JM105 (pPP3)	40
Biotransformación de α -etil acetoacetato de etilo con <i>E. coli</i> BL21 (DE3) (pPP4)	42
Biotransformación de α -etil acetoacetato de etilo con <i>E. coli</i> BL21 (DE3) Δ (yqhE) (pPP4)	45
<i>Biotransformación de α-metil acetoacetato de etilo</i>	47
<i>Biotransformación de sustratos con sustituyentes más voluminosos en posición α</i>	48
<i>Resumen de los resultados obtenidos</i>	49
ANÁLISIS DE LA PRESENCIA DE β CER EN CEPAS AUTÓCTONAS	51
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	52
IDENTIFICACIÓN Y CLONADO DE GENES CON ACTIVIDAD REDUCTASA	52
DESARROLLO Y ANÁLISIS DE LOS NUEVOS BIOCATALIZADORES	52
METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	56
MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS	56
<i>Reactivos</i>	56
<i>Cepas utilizadas</i>	56
<i>Mantenimiento de las cepas</i>	57
<i>Screening de genotecas</i>	58
MÉTODOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	58
<i>Extracción de ADN genómico de <i>P. lemoignei</i></i>	59
<i>Extracción de ADN genómico de <i>Pseudomonas putida</i> ML2</i>	60

<i>Transformación por electroporación</i>	60
Transformación.....	60
<i>Determinación de la expresión de proteínas</i>	61
MÉTODOS DE SÍNTESIS ORGÁNICA.....	61
<i>Síntesis de sustratos</i>	61
Síntesis de α -alil acetoacetato de etilo.....	61
Síntesis de α -propargil acetoacetato de etilo.....	62
Síntesis de α -bencil acetoacetato de etilo.....	62
Espectros NMR de los compuestos sintetizados.....	63
<i>Reducción química de los sustratos para la obtención de la mezcla racémica</i>	63
MÉTODOS BIOCATALÍTICOS.....	64
<i>Biotransformaciones con cepas de E. coli</i>	64
<i>Biotransformaciones con cepas de S. cerevisiae</i>	64
<i>Biotransformaciones con levadura comercial</i> ⁷²	65
<i>Análisis de las biotransformaciones por cromatografía gaseosa</i>	66
BIBLIOGRAFÍA	68

Índice de figuras

FIGURA 1. 1: α -ALQUIL- β -HIDROXIÉSTERES QUIRALES.....	8
FIGURA 1. 2: REDUCCIÓN ESTERESELECTIVA DE α -ALQUIL- β -CETOÉSTERES.....	8
FIGURA 1. 3: α -ALQUIL- β -HIDROXIÉSTERES QUIRALES.....	13
FIGURA 1. 4: ALGUNAS APLICACIONES SINTÉTICAS DE α -ALQUIL- β -HIDROXIÉSTERES QUIRALES.....	14
FIGURA 1. 5: ALGUNOS α -ALQUIL- β -HIDROXIÉSTERES UTILIZADOS COMO BLOQUES QUIRALES.....	15
FIGURA 1. 6: REDUCCIÓN DE α -ALQUIL β -CETOÉSTERES EN PRESENCIA DE $TiCl_4$ O $CeCl_3$	15
FIGURA 1. 7: HIDROGENACIÓN DIASTEROSELECTIVA DE OLEFINAS.....	16
FIGURA 1. 8: COMPLEJOS QUIRALES DE RU UTILIZADOS COMO CATALIZADORES.....	16
FIGURA 1. 9: α -ALQUIL- β -CETOÉSTERES ÓPTICAMENTE PUROS CON CENTROS QUIRALES EN POSICIÓN γ	17
FIGURA 1. 10: ALQUILACIÓN DE FRATER.....	17
FIGURA 1. 11: CONDENSACIÓN ALDÓLICA DE ABIKO.....	18
FIGURA 1. 12: REGLA DE PRELOG PARA LA REDUCCIÓN DE CARBONILOS PROQUIRALES.....	19
FIGURA 2. 1: ESTRATEGIAS SEGUIDAS PARA LA CONSTRUCCIÓN DE GENOTECAS.....	25
FIGURA 2. 2: CLONADO DE LOS FRAGMENTOS DE ADN TOTAL DE <i>P. LEMOIGNEI</i> Y SELECCIÓN DE LOS CLONES POSITIVOS.....	27
FIGURA 2. 3: ZONAS DE SIMILITUD ENTRE LOS INSERTOS DE PPP1 Y PPP2.....	28
FIGURA 2. 4: SECUENCIA CONSENSO PARA EL ORF ENCONTRADO EN PPP1 Y PPP2.....	30
FIGURA 2. 5: PRIMERS DISEÑADOS PARA AMPLIFICAR EL ORF ENCONTRADO EN PPP1 Y PPP2.....	30
FIGURA 2. 6: SECUENCIA DE LOS PRIMERS DISEÑADOS PARA AMPLIFICAR EL ORF ENCONTRADO EN PPP5.....	31
FIGURA 2. 7: SECUENCIA NUCLEOTÍDICA DEL ORF ENCONTRADO EN PPP5 Y TRADUCCIÓN TEÓRICA A PROTEÍNA DEL MISMO, INDICANDO EN COLOR VERDE EL MOTIVO DE UNIÓN A NADH.....	32
FIGURA 2. 8: SECUENCIA DE LOS PRIMERS DISEÑADOS PARA AMPLIFICAR EL ORF ENCONTRADO EN PPP7.....	33
FIGURA 2. 9: SECUENCIA NUCLEOTÍDICA DEL ORF ENCONTRADO EN PPP7.....	34
FIGURA 2. 10: CLONADO DEL GEN DE LA β CER DE <i>P. LEMOIGNEI</i> EN LOS VECTORES PKK 223-3 Y PET 22B (+).....	35
FIGURA 2. 11: SUSTRATOS UTILIZADOS PARA LOS ENSAYOS DE ACTIVIDAD DE LOS NUEVOS BIOCATALIZADORES.....	37
FIGURA 2. 12: SÍNTESIS DE α -ALQUIL ACETOACETATO DE ETILO.....	38
FIGURA 2. 13: OBTENCIÓN DE LAS MEZCLAS RACÉMICAS DE LOS α -ALQUIL- β -HIDROXIÉSTERES.....	39
FIGURA 2. 14: SUSTRATOS UTILIZADOS PARA LOS ENSAYOS DE ACTIVIDAD DE LOS NUEVOS BIOCATALIZADORES.....	40
FIGURA 2. 15: REDUCCIÓN DE α -ALQUIL- β -CETOÉSTERES POR LA CEPA <i>E. COLI</i> JM 105 (PKTS3).....	40
FIGURA 2. 16: RESULTADO DE SDS-PAGE DE LAS FRACCIONES SOLUBLES EN BUFFER FOSFATO (PH=7).....	41
FIGURA 2. 17: RESULTADO DE SDS-PAGE DE LAS FRACCIONES SOLUBLES EN EL MEDIO DE CULTIVO.....	43