

**PREPARACIÓN DE AGREGADOS ENTRECruzADOS DE PEROXIDASA DE
PALMA REAL (*Roystonea regia*) USANDO ALBÚMINA DE SUERO BOVINO
COMO FUENTE PROTEICA**

NAZZOLY RUEDA ARANGO

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUIMICA
BUCARAMANGA
2007**

**PREPARACIÓN DE AGREGADOS ENTRECruzADOS DE PEROXIDASA DE
PALMA REAL (*Roystonea regia*) USANDO ALBÚMINA DE SUERO BOVINO
COMO FUENTE PROTEICA**

NAZZOLY RUEDA ARANGO

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de químico

DIRECTOR DEL PROYECTO DE GRADO

RODRIGO TORRES SAEZ

Profesor Asistente

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUIMICA

BUCARAMANGA

2007

A DIOS POR SU INFINITO AMOR Y MISERICORDIA PARA CONMIGO

A MIS PADRES POR SU AMOR Y SER MIS GUÍAS

A MIS HERMANOS POR NO DEJARME DESFALLECER

A MI FAMILIA POR SU APOYO

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por brindarme la oportunidad de formarme como persona, creer en mí y por su apoyo incondicional durante el transcurso de mi vida.

A Rodrigo Torres Sáez por su orientación, paciencia y grandes aportes para la realización de este proyecto.

A Jeniffer y Caro, amigas y hermanas que siempre me han brindado su compañía y amistad.

A quien me brindo su amor, paciencia, compañía y que luchó, inclusive más que yo, para que este sueño se realizara, Oveimar. Gracias por siempre.

A mis amigos cercanos: Oscar, Tavo, Alde, Fabian y Alex que a pesar de las circunstancias siempre estuvieron a mi lado, no dudaron en brindarme su ayuda y creyeron en mí.

A Maribel y Gloria que me brindaron su más sincera amistad.

TABLA DE CONTENIDO

		Pág.
	INTRODUCCIÓN	1
1	MARCO DE REFERENCIA	4
1.1	MARCO DE ANTECEDENTES	4
1.2	MARCO TEÓRICO	8
1.2.1	OXIDORREDUCTASAS	8
1.2.2	PEROXIDASAS	8
1.2.3	FUENTES DE LA PEROXIDASA	9
1.2.3.1	La Palma Real	9
1.2.3.2	Peroxidasas de Palma Real	10
1.2.4	PROPIEDADES CATALÍTICAS	11
1.2.5	PROPIEDADES MOLECULARES	13
1.2.6	EFFECTO DEL PH Y LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD Y ESTABILIDAD DE LA PEROXIDASA	14
1.3	ALBÚMINA SÉRICA (BSA)	15
1.4	INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS	17
1.4.1	ASPECTOS GENERALES	17
1.4.2	MÉTODOS DE INMOVILIZACIÓN	17
1.5	ENTRECRUZAMIENTO DE AGREGADOS ENZIMÁTICOS (CLEA)	19
1.5.1	AISLAMIENTO DE LOS CLEA	21
1.6	EL GLUTARALDEHÍDO	21
1.6.1	ASPECTOS GENERALES	21
1.6.2	COMPORTAMIENTO QUÍMICO EN SOLUCIONES ACUOSAS	22
1.6.3	REACCIÓN CON PROTEÍNAS	23
1.6.4	APLICACIÓN PARA ENTRECRUZAR ENZIMAS	25
1.7	CATÁLISIS ENZIMÁTICA EN FASE ORGÁNICA	25

1.7.1	ELECCIÓN DEL SOLVENTE	27
1.7.2	EFECTO DEL SOLVENTE	29
1.7.2.1	Efecto del solvente sobre el agua adherida a la enzima	29
1.7.2.2	Efecto del solvente sobre la enzima	29
1.7.2.3	Efecto del solvente sobre los productos y los sustratos	30
1.7.3	EFECTO DEL AGUA	30
1.7.3.1	Efecto del agua sobre la actividad de la enzima	31
1.7.3.2	Efecto del agua sobre la movilidad de la proteína	32
2	METODOLOGÍA	33
2.1	REACTIVOS	33
2.2	DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS	33
2.3	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CATALÍTICA	34
2.4	ELABORACIÓN DE LOS AGREGADOS ENTRECruzADOS (CLEAS)	34
2.5	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	38
2.6	OPTIMIZACIÓN DE LOS AGREGADOS ENTRECruzADOS DE PEROXIDASA	39
2.7	ESTABILIDAD TÉRMICA DE LOS AGREGADOS ENTRECruzADOS	39
2.8	ESTABILIDAD DE LOS AGREGADOS ENTRECruzADOS EN PRESENCIA DE SOLVENTES ORGÁNICOS	39
3	ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	41
3.1	ACTIVIDAD CATALÍTICA DE LA PEROXIDASA SOLUBLE	41
3.2	ELABORACIÓN DE LOS AGREGADOS ENTRECruzADOS (CLEAs)	42
3.3	OPTIMIZACIÓN DE LOS AGREGADOS ENTRECruzADOS DE PEROXIDASA	48

3.4	ESTABILIDAD TÉRMICA DE LOS AGREGADOS ENTRECRUZADOS ELABORADOS BAJO CONDICIONES ÓPTIMAS	48
3.5	ESTABILIDAD DE LOS AGREGADOS ENTRECRUZADOS EN PRESENCIA DE SOLVENTES ORGÁNICOS	53
4	CONCLUSIONES	58
5	RECOMENDACIONES	60
	BIBLIOGRAFÍA	61
	ANEXOS	65

LISTA DE TABLAS

		Pág.
Tabla 1	Peso molecular y punto isoeléctrico de peroxidasas vegetales	11
Tabla 2	Composición de aminoácidos en BSA	16
Tabla 3	Valores de Log P de solventes orgánicos comunes	28
Tabla 4	Condiciones experimentales en la selección de variables significativas de la inmovilización.	35
Tabla 5	Matriz del diseño experimental	36
Tabla 6	Actividad catalítica de la peroxidasa soluble de la palma real	41
Tabla 7	Matriz de resultados de la elaboración de los agregados entrecruzados	42
Tabla 8	Tabla de ANOVA	45
Tabla 9	Constantes de inactivación de la peroxidasa soluble a diferentes temperaturas	49
Tabla10	Constantes de inactivación de la enzima soluble, la solución enzimática conteniendo BSA y los agregados entrecruzados elaborados (CLEAs) a diferentes temperaturas	52

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1	Mecanismo general de catálisis de las peroxidasas	12
Figura 2	Estructura molecular HRP	14
Figura 3	Elaboración de agregados entrecruzados	19
Figura 4	Posibles formas del glutaraldehído en solución acuosa	23
Figura 5	Elaboración de los CLEAs	37
Figura 6	Diagrama de Pareto para las variables del proceso de elaboración de los agregados entrecruzados	44
Figura 7	Gráfico de superficie de respuesta para la elaboración de los CLEAs	46
Figura 8	Gráfico del contorno de superficie de respuesta para la elaboración de los CLEAs	46
Figura 9	Estabilidad térmica de la peroxidasa de palma real (RPP) a diferentes temperaturas	49
Figura 10	Estabilidad térmica de la solución enzimática conteniendo BSA a diferentes temperaturas	50

Figura 11	Estabilidad térmica de los agregados entrecruzados de peroxidasa (CLEAs) de la palma real a diferentes temperaturas	51
Figura 12	Efecto de los solventes orgánicos sobre la peroxidasa de palma real, después de un tiempo de incubación de 60 minutos	53
Figura 13	Efecto de los solventes orgánicos sobre la enzima soluble con BSA, después de un tiempo de incubación de 60 minutos.	54
Figura 14	Efecto de los solventes orgánicos sobre los agregados entrecruzados de peroxidasa de palma (CLEAs), después de 60 minutos de incubación	55
Figura 15	Comparación del efecto de los solventes orgánicos sobre la enzima soluble, la solución enzimática de peroxidasa con BSA y los agregados entrecruzados elaborados en: A) acetonitrilo (ACN) y B) tetrahidrofurano (THF). Después de un tiempo de incubación de 60 minutos	56

ANEXOS

	Pág.
Anexo A Curva de calibración para la determinación de la concentración de proteína por el método de Bradford	65
Anexo B Cálculo de la actividad específica de la peroxidasa soluble de la palma real (<i>Roystonea regia</i>)	66
Anexo C Cálculo de la actividad específica de los agregados entrecruzados de la peroxidasa de la palma real (<i>Roystonea regia</i>)	67
Anexo D Cálculo de las constantes de inactivación	68

RESUMEN

TITULO*

PREPARACIÓN DE AGREGADOS ENTRECruzADOS DE PEROXIDASA DE PALMA REAL (*Roystonea regia*) USANDO ALBÚMINA DE SUERO BOVINO COMO FUENTE PROTEICA

Rueda Arango Nazzoly, Torres Sáez Rodrigo**.

Palabras claves: enzimas, peroxidases, albúmina de suero bovino (BSA), agregados entrecruzados (CLEAs), glutaraldehído, diseño experimental.

Las enzimas pueden catalizar diferentes procesos de biotransformación. Un grupo de ellas, pertenecientes al grupo de las oxido-reductasas, entre las cuales se encuentra la peroxidasa de palma real (*Roystonea regia*), presentan un gran potencial en el tratamiento de efluentes y suelos contaminados. La adición de albúmina de suero bovino (BSA) como fuente de proteína, facilita la obtención de agregados entrecruzados enzimáticos (CLEAs) en casos donde la concentración de proteína en la solución enzimática es baja para obtener agregados.

En este proyecto se efectuó un estudio de la inmovilización de proteínas de la peroxidasa de palma real (RPP), usando como fuente de proteína albúmina de suero bovino (BSA), a través del entrecruzamiento proteico llevado a cabo con glutaraldehído, para la formación de los CLEAs, evaluándose el efecto causado por el etanol como agente precipitante, la concentración de BSA y de glutaraldehído mediante un diseño experimental. Posteriormente se determinó su estabilidad térmica y su comportamiento en solventes orgánicos en comparación a la enzima soluble.

Los agregados entrecruzados de la RPP, mostraron un incremento significativo en su actividad específica, estabilidad térmica y estabilidad en solventes orgánicos en comparación con la enzima soluble. Se determinó que para una concentración de albúmina de 1 mg/mL, una concentración de etanol del 70% (v/v) y de glutaraldehído del 2% (p/v), los agregados entrecruzados elaborados usando como fuente de proteína BSA presentaron una actividad específica de 752,5 U/mg.

*Trabajo de Grado

** Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Director: Rodrigo Torres Sáez. Ph.D. en Química.

ABSTRACT

TITLE*

PREPARATION OF CROSSLINKED AGGREGATES PEROXIDASES OF ROYAL PALM (*Roystonea Regia*) BY USING BOVINE SERUM ALBUMIN AS A PROTEIC FEEDER^{*}.

Rueda Arango Nazzoly, Torres Sáez Rodrigo ^{**}.

Keywords: enzymes, peroxidases, bovine serum albumin (BSA), cross-linked aggregates (CLEAs), glutaraldehyde, experimental design.

Enzymes can catalyze different biotransformation processes. A group of them, belonging to the oxide-reductase group, within which there is the Royal Palm peroxydases (*Roystonea regia*), show a great potential in the treatment of effluents y polluted areas. Addition of bovine serum albumin (BSA) as a proteic feeder facilitates obtaining cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) in cases where the protein concentration in the enzyme solution es low of required to obtain aggregates.

A study of protein immobilization of the peroxydases of Royal Palm (RPP) was effected, by using bovine serum albumin (BSA), through proteic cross-linking with glutaraldehyde, to the formation of CLEAs, by evaluating the effect caused by ethanol as aggregation agent, the concentration of BSA and glutaraldehyde through an experimental design. Its thermal stability and behavior in organic media was determined in comparison to the soluble enzyme.

The cross-linked aggregates of RPP, showed a significant increase in its specific activity, thermal stability and stability in organic media in comparison to the soluble enzyme. It was determined that for a 1 mg/mL albumin, 70%(v/v) ethanol and a 2% (p/v) glutharaldehyde concentration, the cross-linked aggregates by using BSA as proteic feeder showed an specific activity of 752,5 U/.

* Degree of Project.

** Faculty of Science, School of Chemistry, Director: Rodrigo Torres Sáez. Ph.D. on Chemistry.

INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años, el empleo de biocatalizadores en síntesis orgánica se ha convertido en una alternativa muy atractiva respecto a los métodos químicos convencionales. En efecto, las enzimas presentan a menudo una alta quimio-, regio-, y enantioselectividad que las convierte en valiosos catalizadores en el campo de la química fina. Además, las reacciones catalizadas por enzimas normalmente se llevan a cabo en condiciones suaves, tales como temperatura ambiente y pH neutro. Inclusive, los procesos biocatalíticos son menos peligrosos, poco contaminantes y consumen menos energía que las metodologías químicas convencionales.

A pesar del gran campo de aplicación de las enzimas, su implantación como catalizadores en procesos químicos a gran escala se ha visto condicionada por el difícil control de los procesos de catálisis homogénea, el alto costo del extracto enzimático, la pérdida de actividad durante las reacciones, la contaminación del producto final por la presencia del catalizador en solución, la dificultad de su eliminación de la mezcla de reacción y la imposibilidad de su reutilización. Todos estos inconvenientes son debidos a que se trabaja con catalizadores lábiles y solubles en el medio de reacción.

Como respuesta a estos problemas, en los años 60 comienzan a desarrollarse las técnicas de inmovilización de enzimas. El confinamiento o localización de las moléculas de enzima en un cierto espacio definido y limitado de forma que retengan su actividad catalítica y que permitan su uso repetido, se recoge bajo el nombre de técnicas de inmovilización; entre las cuales se encuentran el atrapamiento, adsorción, encapsulación y entrecruzamiento, que aportan una

solución para la recuperación de las enzimas y su posterior reutilización pero no al problema de la estabilización.

Por tanto, el tremendo potencial de las enzimas como catalizadores está ampliamente reconocido. Sin embargo, cuando su empleo se restringe a su medio natural acuoso, su utilidad y alcance está limitado por una serie de consideraciones. La mayoría de los compuestos orgánicos son insolubles en agua, y en ella pueden tener lugar reacciones colaterales no deseadas (hidrólisis, racemizaciones, etc.). Además, el equilibrio termodinámico de muchos procesos es desfavorable en agua, y la recuperación de los productos no es trivial.

En principio, muchos de estos problemas se resuelven usando solventes orgánicos en lugar de agua como medio de reacción. A primera vista tal sustitución parecería imposible debido a la idea convencional de que las enzimas se desnaturalizan en solventes orgánicos. Sin embargo, esta noción viene de examinar a las enzimas en mezclas de agua con solventes orgánicos y no en solventes orgánicos puros. En realidad, en ausencia de agua, que actúa como lubricante molecular, las enzimas son muy rígidas. Por tanto, aunque en mezclas de agua con disolventes orgánicos las proteínas tienen tendencia a desnaturalizarse y poseen suficiente flexibilidad conformacional para hacerlo, en disolventes orgánicos “secos” su tendencia a desnaturalizar debiera ser mayor, pero la flexibilidad necesaria para hacerlo está ausente. Como consecuencia, la conformación nativa de las enzimas se retiene en gran medida en solventes orgánicos puros y muchas enzimas son capaces de catalizar reacciones en medios no acuosos.

Esto pone de manifiesto la dificultad de encontrar condiciones óptimas para la biocatálisis en solventes orgánicos miscibles y la necesidad de una mejor comprensión de los mecanismos de expresión de actividad y estabilidad del catalizador enzimático en estos sistemas. Por estas razones, entre otras, este

trabajo presenta una serie de resultados de un estudio realizado sobre la peroxidasa de palma real (*Roystonea regia*), que incluye: su inmovilización usando como fuente de proteína la albúmina de suero bovino (BSA) a través del entrecruzamiento proteico, para la obtención de agregados entrecruzados de enzima; la evaluación de la estabilidad térmica de dichos agregados, y finalmente la determinación de la actividad enzimática en solventes orgánicos, siendo estas dos últimas, comparadas con los resultados obtenidos sobre la enzima soluble en cada uno de los procesos.

1. MARCO DE REFERENCIA

1.1 MARCO DE ANTECEDENTES

Durante el último tiempo, se ha investigado con gran intensidad el potencial del entrecruzamiento de agregados enzimáticos para la inmovilización de enzimas.

La técnica de entrecruzamiento de proteínas vía la reacción de bis-aldehídos (por ej. Glutaraldehído) con residuos amino reactivos sobre la superficie de la proteína fue desarrollada inicialmente en 1960 por Dossier y Richards. Sin embargo, este método de entrecruzamiento, presentó severos inconvenientes, tales como una baja retención de la actividad catalítica, pobre reproducibilidad, baja estabilidad y dificultad en el manejo [1].

En el año 2000, Linjiu Cao y colaboradores [2] desarrollaron una técnica efectiva de insolubilización, que permitió incrementar la estabilidad operacional de las enzimas facilitando su recuperación y re-uso. Cao y col. inmovilizaron la enzima penicilina acilasa a través del entrecruzamiento con glutaraldehído de agregados físicos de la enzima formados por la adición de un agente precipitante, generando una forma insoluble de agregados entrecruzados de la enzima (CLEA). Estos agregados entrecruzados de la penicilina acilasa, catalizaron la síntesis de ampicilina en un amplio rango de solventes orgánicos, manteniendo su actividad catalítica intacta.

Posteriormente, en el año 2001, Cao y col. [3], reportaron la inmovilización de la penicilina G Acilasa a través del entrecruzamiento de agregados físicos de la enzima con glutaraldehído. Ellos mostraron que la adición de agentes precipitantes, tales como $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, polietilenglicol o butanol, ocasionaba la agregación de la proteína. El efecto del agente precipitante fue evaluado

determinándose que los agregados elaborados con butanol presentaban mejores actividades en comparación con los agregados elaborados con polietilenglicol y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Los agregados entrecruzados de la penicilina-G-acilasa elaborados con butanol fueron utilizados como catalizadores en la síntesis de antibióticos β -lactámicos mostrando actividades catalíticas superiores tanto en medio acuoso como en fase orgánica, en comparación con la penicilina-G-acilasa inmovilizada y disponible comercialmente.

En el 2002, López-Serrano, Cao y Van Rantwijk [4], precipitaron las lipasas de *Thermomyces lanuginosus* y *Rhizomucor miehei* con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en presencia de triton X-100 como surfactante, con un posterior entrecruzamiento con glutaraldehído. La actividad catalítica de los CLEA elaborados fue evaluada en la hidrólisis del sustrato p-nitrofenil propionato. Los agregados entrecruzados de las lipasas mostraron actividades similares a la enzima soluble, e incluso en algunos casos actividades superiores.

Moira y Van Rantwijk [5], en el 2003, elaboraron agregados entrecruzados de aminoacilasa de *Aspergillus melleus*, para la determinación de la actividad de aminólisis y alcoholólisis de sustratos quirales. Los agregados entrecruzados de aminoacilasa fueron elaborados utilizando como agente precipitante dimetil éter y glutaraldehído como agente entrecruzante. Los CLEAs elaborados mostraron actividades superiores en comparación con la enzima soluble en las reacciones de aminólisis y alcoholólisis en las que fueron utilizados como biocatalizadores.

En el 2004, Schoevaart, Sheldon y col. [1], demostraron la gran aplicabilidad del entrecruzamiento de agregados enzimáticos para la efectiva inmovilización de enzimas. Elaboraron agregados entrecruzados de 12 enzimas diferentes entre las que se encuentran la galactosa oxidasa, glucosa oxidasa, lacasa, lipasa entre otras. Estimaron el efecto de 14 agentes precipitantes (metanol, etanol, acetona, PEG, entre otros) y el de la concentración del glutaraldehído como agente

entrecruzante en la formación de los agregados físicos entrecruzados de estas enzimas. Determinaron las estructuras físicas de los CLEA a través de un microscopio de barrido electrónico, estableciendo que la forma de agregación de las enzimas depende del grado de glicosilación de estas. Los resultados obtenidos demostraron que todos estos parámetros evaluados inciden de manera directa sobre las propiedades de los agregados obtenidos.

En el 2004, Wilson, Betancor y otros [6], publicaron los resultados obtenidos en la elaboración de agregados entrecruzados de enzimas multiméricas como las catalasas de hígado de bovino (BLC) y *Micrococcus lysodikticus* (MLE). Los agregados entrecruzados fueron elaborados adicionando dietilenglicol dimetil eter como agente precipitante y glutaraldehído al 5% (v/v). Determinaron que los CLEAs elaborados presentaban una alta estabilidad bajo condiciones de dilución e interesantemente estabilizaban la estructura multimérica de estas enzimas tetraméricas.

En el 2005, Gaur y col. [7], inmovilizaron la β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* por tres técnicas diferentes, adsorción sobre celita, acoplamiento covalente con quitosano y agregación por entrecruzamiento. Estas técnicas fueron comparadas en términos de rendimiento de inmovilización, características enzimáticas, estabilidad y eficiencia en la síntesis de oligosacáridos. Los CLEAs formados mostraron ser más efectivos en la hidrólisis de lactosa con un rendimiento hasta de un 78% en comparación con las otras técnicas.

Barbosa y Torres [8], en el 2006 estudiaron la inmovilización de proteínas de la peroxidasa de palma real (*Roystonea regia*), a través del entrecruzamiento proteico llevado a cabo con glutaraldehído, para la formación de agregados entrecruzados de enzimas (CLEA), evaluando el efecto causado por el etanol, acetona y polietilenglicol como agentes precipitantes. Los agregados entrecruzados de la peroxidasa de la palma real, mostraron un incremento

significativo en su actividad específica y estabilidad térmica en comparación con la enzima soluble. Determinaron que para una concentración de etanol del 78% (v/v) y de glutaraldehído del 1% (p/v), los agregados entrecruzados presentaban una actividad específica de 2011 U/mg y una estabilidad térmica 40 veces mayor que la enzima soluble. No obstante, los buenos resultados obtenidos mostraron que la baja concentración de proteína en la peroxidasa extraída de la palma real, dificultó el proceso de entrecruzamiento debido al bajo número de grupos lisínicos presentes en esta enzima, los cuales son los que intervienen directamente en la reacción de entrecruzamiento con el glutaraldehído.

En el 2006, Shah, Aparna y col. [9], determinaron que la adición de albúmina de suero bovino (BSA) como fuente proteica, puede facilitar la obtención de agregados entrecruzados en casos en donde la concentración de proteína en la enzima es baja y la actividad de la enzima es vulnerable ante concentraciones altas de glutaraldehído requeridas para obtener agregados. Ellos inmovilizaron a través de esta técnica la lipasa de *Pseudomonas cepacia*, y la penicilina acilasa. Los CLEAs obtenidos en presencia de BSA retuvieron en un 100% la actividad en el proceso de elaboración, en contraste con el 0,4 % de la actividad retenida por los agregados entrecruzados elaborados en ausencia de BSA. En ambos casos los agregados entrecruzados mostraron una actividad que excedía la del preparado enzimático soluble, destacándose el mayor incremento en la actividad de los CLEAs elaborados en presencia de BSA.

Por otra parte, es interesante resaltar la habilidad de enzimas tales como las peroxidasas y las lacasas en el tratamiento de contaminantes orgánicos. En el 2003, Torres, Bustos y Le Borge [10], realizaron un estudio del uso potencial de estas enzimas en el tratamiento de compuestos orgánicos altamente contaminantes. Señalaron que la oxidación enzimática puede disminuir la toxicidad de muchos hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs) además de fenoles y de algunos pesticidas organofosforados. Sin embargo, estas reacciones son

usualmente realizadas en presencia de solventes orgánicos lo que puede provocar la desnaturalización de la enzima, la partición desfavorable del sustrato o la inhibición por estabilización del complejo enzima-sustrato.

En el 2005, Baborová y Baldrian [11] degradaron eficientemente hidrocarburos policíclicos aromáticos, bifenilos policlorados y penta clorofenoles empleando la manganeso peroxidasa extraída de *Irpex lacteus*. Determinaron que la oxidación enzimática realizada por la peroxidasa no se lleva a cabo en ausencia de peróxido de hidrógeno o Mn^{2+} . La manganeso peroxidasa fue activa en un rango entre 5 y 70°C con una actividad óptima entre 50 y 60°C. La degradación de cuatro PAHs representativos (fenantreno, antraceno, fluoranteno y pireno) mostró la gran habilidad de la peroxidasa para la degradación *in Vitro* de estos compuestos.

1.2 MARCO TEÓRICO

1.2.1 OXIDORREDUCTASAS

Las oxidorreductasas, como lo indica su nombre, son enzimas que catalizan reacciones de óxido-reducción; transfiriendo electrones para oxidar o reducir grupos tales como: alcoholes (R-OH), alquenos (C=C), aminas primarias (R-NH₂) y cofactores (NADH, NADPH)

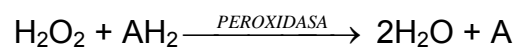
A su vez las oxidasas se clasifican en tres grupos diferentes: deshidrogenasas, oxidasas y peroxidasas.

1.2.2 PEROXIDASAS

Las peroxidasas son glicoproteínas globulares con un peso molecular aproximado de 42000 Da, en las cuales la porción proteica corresponde aproximadamente a 34000 Da, el resto del peso molecular del grupo esta constituido por el grupo

prostético (grupo hemo), dos iones calcio y algunos glicanos superficiales enlazados. Por lo general son moléculas más pequeñas que las oxidasas.

En la reacción catalizada por la peroxidasa, el peróxido de Hidrógeno es reducido a expensas de varias sustancias que actúan como donadores de electrones, tales como el ascorbato, las quinonas y el citocromo c. La reacción catalizada por la peroxidasa es compleja, con el siguiente balance global:



1.2.3 FUENTES DE LA PEROXIDASA

Las peroxidasas se encuentran en los reinos animal y vegetal. Debido a la presencia del grupo Hemo las peroxidasas se pueden clasificar en dos grupos: las peroxidasas presentes en tejidos animales, y las que están presentes en bacterias, hongos y plantas.

Las peroxidasas se pueden encontrar en las plantas de diferentes clases de frutas. Por ejemplo, a partir de la naranja (*Citrus sinensis*) fueron extraídas dos tipos de peroxidasa, una soluble y la otra enlazada iónicamente [12].

Las peroxidasas han sido identificadas sobre la superficie de muchas especies de plantas. Por ejemplo, a partir de las hojas de la palma de aceite (*Elaeis guineensis*) fue aislada y purificada una peroxidasa aniónica con una alta termoestabilidad [13].

1.2.3.1 La palma real

Es un árbol de tronco cilíndrico que alcanza alturas de 10 a 24 m, sus hojas son plumosas, entre 2.40 y 3 m de longitud, conformada por segmentos de 75 cm de

largo. Crece relativamente rápido alcanzando su máximo desarrollo en unos 10 años. Se cultiva sobre altitudes de 900 m – 1000 m sobre el nivel del mar, propagándose por semillas. Pertenece a la familia de las palmáceas, (*Palmae*).

Su nombre científico es *Roystonea regia*, en honor al científico norteamericano Roy Stone.

Las hojas de *Roystonea regia* presentan altos contenidos de enzimas, peroxidasas, 700U por gramo de hoja, las cuales se mantienen constantes durante todo el año y en varias etapas del desarrollo. La actividad de las peroxidasas ha sido medida en diferentes épocas del año, encontrándose que la concentración de las enzimas es independiente de factores como la edad de la planta, condiciones climatológicas y altura de la palma, entre otras.

1.2.3.2 Peroxidasas de palma real (RPP)

Es una glicoproteína de peso molecular 51KDa, que se encuentra en mayor concentración en las hojas verdes de dicha planta. Su peso es relativamente alto en comparación con las otras peroxidasas lo que sugiere un alto grado de glicosilación, como se observa en la **tabla 1**. Su espectro de absorción tiene un máximo en 403 nm, conocido con el nombre de banda Soret, la cual es característica de las peroxidasas vegetales.

Tabla 1. Peso molecular y punto isoeléctrico de peroxidasas vegetales.

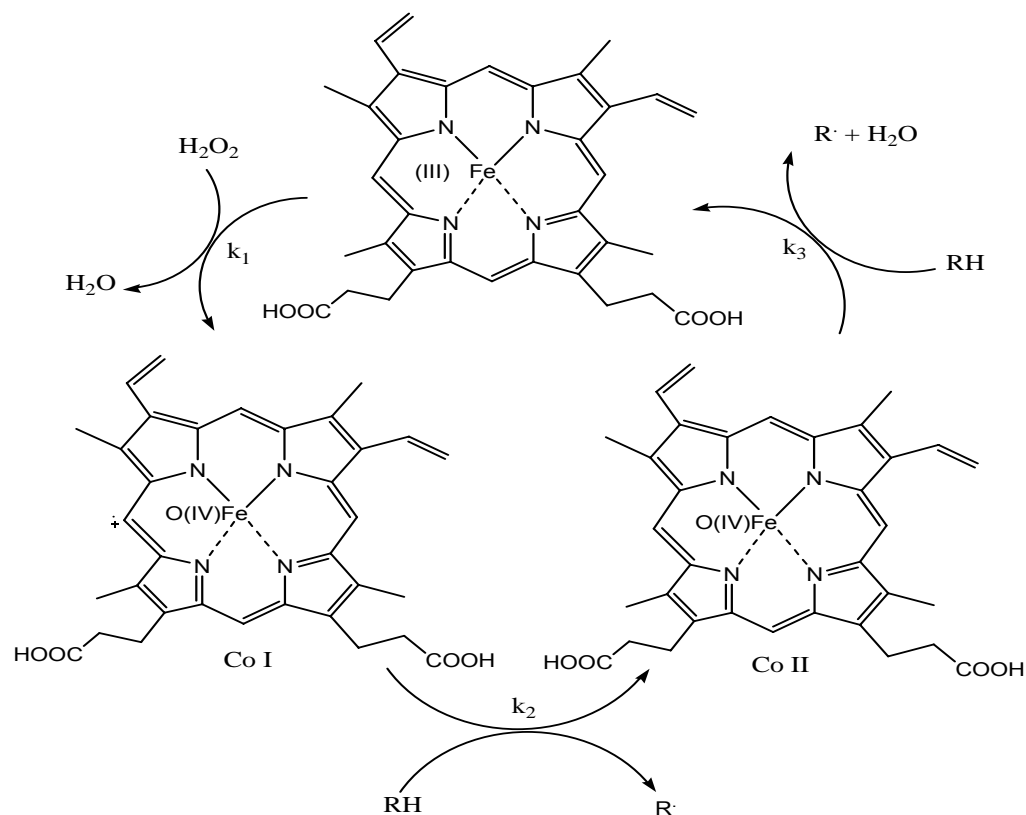
Fuente de enzima	Peso molecular	Punto isoeléctrico
Palma africana	57	3.8
Palma real	51	3.5
Alfalfa	48	9.2
Maíz	48	3.5
Rábano coreano	44	9.0
Rábano picante	44	8.9
Maní	40	8.9
Batata	40	4.5
Soya	37	4.1
Tabaco	36	3.5

1.2.4 PROPIEDADES CATALÍTICAS

En general, el ciclo catalítico de las peroxidasas se asemeja al descrito para la peroxidasa de rábano picante (HRP).

La gran mayoría de las peroxidasas catalizan la reducción del peróxido de hidrógeno a agua y la oxidación de un amplio rango de sustratos. La **figura 1** muestra el mecanismo general de catálisis de este tipo de enzimas.

Figura 1. Mecanismo general de catálisis de las peroxidasas.



El primer paso es el rompimiento catalizado por la peroxidasa del peróxido de hidrógeno. Uno de los oxígenos del peróxido sale como agua, mientras que el otro es retenido por el grupo ferrilo. El compuesto I es conocido como catión radical porfirínico π . El compuesto I acepta luego un electrón de la molécula del sustrato RH , produciendo el compuesto II, que contiene el grupo ferrilo, pero ya no como catión radical porfirínico. El compuesto II acepta un electrón de una segunda molécula de sustrato, regresando la enzima nuevamente a su estado nativo. La pérdida de un electrón del sustrato, acompañado de la pérdida de un protón, genera la formación de un radical. La alta reactividad y la baja selectividad asociada con los radicales orgánicos hacen que la química de los radicales sea realmente compleja [12].

Los sustratos que reducen los compuestos I y II reciben el nombre de “sustratos reductores”, y su interacción con el sitio activo de la peroxidasa tiene lugar en la posición delta al borde del grupo hemo.

1.2.5 PROPIEDADES MOLECULARES

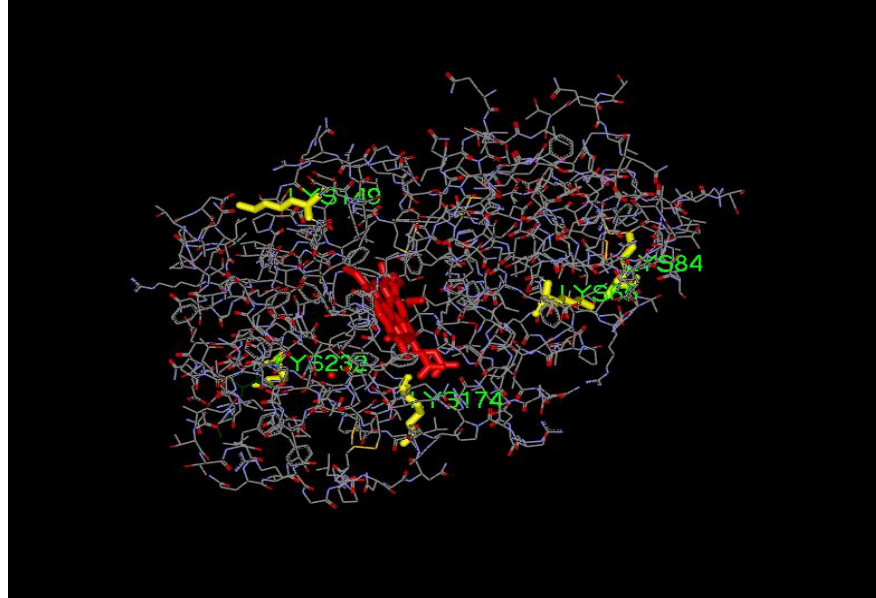
Se han recolectado abundantes datos sobre la estructura de las peroxidases gracias a la información estructural detallada de técnicas como la difracción de rayos X.

Se ha comprobado que todas las peroxidases, tales como la peroxidasa de rábano picante (HRP) contienen ocho cisteínas, las cuales están localizadas en posiciones muy similares en la estructura primaria. De igual forma, dos histidinas invariables (His42 e His170) han sido inferidas en la estructura del sitio activo, así His42 esta involucrada en la catálisis ácido/base e His170 esta unida al quinto ligando del grupo hemo [12].

Existen dos dominios bien definidos con la apoproteína o fracción proteica de la enzima. Cada dominio contiene un ion calcio, el cual suministra la estabilidad estructural y controla la actividad enzimática. Los dos dominios proporcionan una hendidura hidrofóbica, en la cual está situado el grupo hemo. La peroxidasa presenta un número reducido de lisinas, que en su mayoría son accesibles para reaccionar con un agente bifuncional como el glutaraldehído.

En la **figura 2**, se muestra la estructura de la peroxidasa de HRP, en la cual se aprecian las cinco lisinas (amarillo) presentes en la peroxidasa de rábano picante, siendo estas: Lys65, Lys84, Lys149, Lys174, Lys232. Así mismo, se observa el grupo Hemo (rojo) alejado de los residuos aminoacídicos de lisina, lo que permitiría en el momento del entrecruzamiento de estos, con un reactivo bifuncional, la no inactivación de la enzima.

Figura 2. Estructura molecular HRP. Tomado de Protein Data Bank, Código de acceso 1W4W.pdb. Software de visualización RASMOL.



1.2.6 EFECTO DEL PH Y LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD Y ESTABILIDAD DE LA PEROXIDASA

Debido a que las peroxididasas son proteínas, se ven afectadas por los cambios tanto en el pH como en la temperatura. Un cambio en el pH afecta la estabilidad, la conformación de la peroxidasa y la forma del sitio activo destruyendo las interacciones no covalentes (rompiendo los enlaces iónicos y los enlaces de hidrógeno). Un cambio en el pH produce una adición o una eliminación de H^+ de los aminoácidos de la peroxidasa. En el pH óptimo, la peroxidasa tiene una actividad catalítica máxima. El pH óptimo para cualquier peroxidasa depende del sustrato donador de hidrógeno y del buffer utilizado.

Las reacciones enzimáticas aumentan su velocidad con la temperatura, dentro de una gama limitada de valores. La temperatura a la cual las peroxididasas presentan

su máxima actividad depende de una serie de factores como lo son la pureza de la enzima y del sustrato.

La forma como el pH y la temperatura afectan la estabilidad de las peroxidasas, específicamente a sus estructuras secundaria y terciaria, está determinada por tres factores como: iones de calcio (Ca^{2+}), puentes disulfuro y red de enlaces de hidrógeno.

Por medio de diferentes estudios a través de técnicas espectroscópicas se ha evaluado el efecto de la variación del pH en la estabilidad de la peroxidasa de rábano picante (HRP), encontrando que a $\text{pH} < 4.5$, la estabilidad de la estructura secundaria disminuye notablemente [14]. Esto debido probablemente a que la disminución en el pH ocasiona la pérdida del grupo hemo, lo cual conlleva a una desnaturalización de la enzima.

1.3 ALBÚMINA SÉRICA

La albúmina sérica es la proteína más abundante en el plasma sanguíneo y es la encargada de transportar los ácidos grasos en la sangre.

Puesto que la albúmina sérica es tan abundante en la sangre y es muy fácil de purificar, fue una de las primeras proteínas en ser estudiadas. Hoy, la proteína similar proveniente de las vacas (albúmina de suero bovino –BSA-) es ampliamente usada en investigaciones cuando una proteína genérica es necesaria. Muchas enzimas son inestables cuando se colocan en una solución diluida, así que es difícil estudiarlas en el laboratorio. Una solución es agregar un poco de BSA. Esto estabiliza la enzima durante el experimento y no afecta las características de la enzima debido a su relativa neutralidad.

Las albúminas se caracterizan por un bajo contenido de triptófano y metionina y un alto contenido de cistina y de aminoácidos cargados, ácido aspártico y glutámico, lisina, y arginina. La **Tabla 2** muestra la composición de aminoácidos en la albúmina de suero bovino (BSA).

Tabla 2. Composición de aminoácidos en BSA.

Aminoácidos	Cantidad
Ala	48
Phe	30
Lys	60
Pro	28
Thr	34
Cys	35
Gly	17
Leu	65
Gln	21
Val	38
Asp	41
His	16
Met	5
Arg	26
Trp	3
Glu	58
Ile	15
Asn	14
Ser	32
Tyr	21

1.4 INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS

1.4.1 ASPECTOS GENERALES

La inmovilización de enzimas es un proceso en el que se confina o localiza a la enzima en una región definida del espacio, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica y que pueden ser reutilizadas repetidamente. Posteriormente esta definición se ha ampliado a aquel proceso por el cual se restringen, completa o parcialmente, los grados de libertad de movimiento de enzimas, orgánulos, células, etc., por su unión a un soporte [15].

Como ventajas del empleo de enzimas inmovilizadas podemos destacar:

- El aumento de la estabilidad de la enzima.
- La posible reutilización del derivado, por lo que disminuyen los costos del proceso.
- La posibilidad de diseñar un reactor enzimático de fácil manejo y control, adaptado a la aplicación de la enzima inmovilizada. Estos reactores con enzimas inmovilizadas permiten el empleo de cargas elevadas de enzima, la cual mantendrá su actividad durante más tiempo. Estos sistemas pueden incluir el reciclado, lo que permite la obtención de productos con mayor pureza.

1.4.2 MÉTODOS DE INMOVILIZACIÓN

En general los métodos de inmovilización de enzimas se clasifican en dos grandes categorías como lo son la inmovilización por enlace químico y la inmovilización por confinamiento.

Los métodos de inmovilización por enlace químico pueden ser divididos a su vez en dos tipos:

- 1) Enlazado o unión a un soporte
- 2) Entrecruzamiento de proteína pura.

El primer método, también denominado unión covalente, se basa en la activación de grupos químicos del soporte para que reaccionen con nucleófilos de las proteínas. De entre los 20 aminoácidos diferentes que se encuentran en la estructura de las enzimas, los más empleados para la formación de enlaces con el soporte son principalmente la lisina, la cisteína, la tirosina y la histidina, y en menor medida, la metionina, el triptófano, arginina y el ácido aspártico. El resto de aminoácidos, debido a su carácter hidrófobo, no se encuentran expuestos hacia el exterior de la superficie proteica y no pueden intervenir en la unión covalente. La principal desventaja de este método es la dilución de la actividad catalítica resultado de la introducción de una gran proporción de masa no catalítica, lo que ocasiona bajos rendimientos volumétricos y de espacio-tiempo [15].

El segundo método es una técnica de uso frecuente en la inmovilización de enzimas en el cual, mediante reactivos bifuncionales que originan uniones intermoleculares entre las moléculas, se lleva a cabo el entrecruzamiento molecular. Como reactivos bifuncionales se pueden emplear dialdehídos, diiminoésteres, diisocianatos, sales de bisdiazonio e incluso, diaminas si están activadas con carbodimidina.

El resultado del entrecruzamiento son enzimas con enlaces intermoleculares irreversibles capaces de resistir condiciones extremas de pH y temperatura.

La técnica de entrecruzamiento de proteínas vía la reacción de glutaraldehído con residuos amino reactivos sobre la superficie de la proteína fue inicialmente

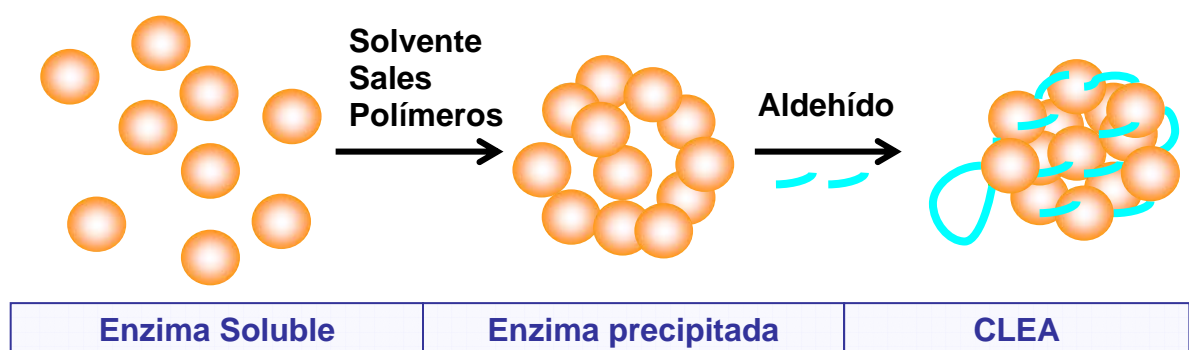
desarrollada en 1960 por Dossier y Richards. Sin embargo este método de entrecruzamiento, en el cual se adicionaba directamente el glutaraldehído a la enzima presento severos inconvenientes, tales como una baja retención de la actividad catalítica, pobre reproducibilidad, baja estabilidad y dificultad en el manejo [1].

Posteriormente surgió el entrecruzamiento de enzimas cristalinas (CLEC), el cual fue aplicado para estabilizar cristales de enzima para estudios de difracción de rayos-x, presentando una desventaja inherente como lo es la necesidad de cristalizar la enzima, lo que es a menudo un procedimiento difícil.

1.5 ENTRECruzAMIENTO DE AGREGADOS ENZIMATICOS (CLEA)

Recientemente, se desarrolló una nueva forma de inmovilización de enzimas, llamada entrecruzamiento de agregados enzimáticos (CLEA). En la **figura 3** se aprecia de una forma general el proceso de elaboración de los CLEAs.

Figura 3. Elaboración de agregados entrecruzados.



Esta técnica consta de una etapa de precipitación y agregación de la enzima, la cual es inducida por la adición de sales, solventes orgánicos, polímeros no iónicos

y ácidos. Esta etapa de precipitación es comúnmente utilizada como método de purificación de proteínas [1].

Estos agregados físicos son estructuras supramoleculares unidas por enlaces no covalentes rediseñados cuando son dispersados en agua. La formación de estos agregados físicos es posible debido a un cambio en el estado de hidratación de las moléculas de la enzima o por la alteración de la constante electrostática de la solución por la adición de un agente de agregación o precipitación apropiado [16].

Durante la etapa de agregación la solubilidad de la enzima en el medio circundante decrece. Cuando este proceso es bajo la enzima puede desnaturalizarse por causa de una gran fuerza ejercida sobre su estructura; lo cual sugiere, que la formación del agregado insoluble de la enzima constituye una etapa esencial para la retención de la actividad enzimática durante el entrecruzamiento, por lo que se hace necesaria la selección adecuada del agente precipitante.

La siguiente etapa es la de entrecruzamiento del agregado físico, esto consiste básicamente en la formación de enlaces covalentes entre los grupos reactivos del agente bifuncional y los residuos aminoacídicos de la enzima, principalmente lisina. En esta etapa la estructura del agregado y la actividad catalítica de la proteína individual se mantienen.

De forma interesante, el rendimiento de la actividad del agregado enzimático entrecruzado excede al de la enzima nativa, esto fue observado con lipasas y posteriormente observados con otras enzimas. Esta hiperactivación puede ser originada por un cambio conformacional de la proteína inducido por el estado de agregación [1].

Se conocen varios agentes entrecruzantes, siendo el glutaraldehído el más usado por su precio económico y alta versatilidad química.

Por otro lado se hace necesario optimizar la etapa de entrecruzamiento minimizando la cantidad de agente entrecruzante, debido a que algunas enzimas son inactivadas por el glutaraldehído.

1.5.1 AISLAMIENTO DE LOS CLEAs

Una de las mayores ventajas de los agregados entrecruzados es su fácil separación de soluciones acuosas. En contraste con la enzima libre, los CLEA pueden ser fácilmente separados del medio de reacción a través de una breve centrifugación recuperando completamente su actividad catalítica.

1.6 EL GLUTARALDEHÍDO

1.6.1 ASPECTOS GENERALES

Es un dialdehído lineal de cinco carbonos. Líquido aceitoso, claro e incoloro, el cual es altamente soluble en agua, alcohol y solventes orgánicos.

Se encuentra principalmente disponible como una solución acuosa ácida (pH 3.0-4.0), variando en concentración desde el 2% hasta el 70% (w/v).

Es ampliamente utilizado debido a su gran aplicabilidad y bajo costo en campos como la histoquímica, la microscopía, la esterilización química y biomédica.

En la tecnología de enzimas tiene como uso general la inmovilización de enzimas debido a su alta reactividad con los grupos amino bajo un pH neutro, generando entrecruzamientos térmica y químicamente más estables que otros aldehídos.

Se ha demostrado que en las reacciones de entrecruzamiento con monoaldehídos (formaldehído) y dialdehídos que tienen una cadena larga de 2 a 6 átomos de carbono (glioxal, malonaldehído, succinaldehído, glutaraldehído y adipaldehído), son más reactivos los aldehídos de cinco carbonos, sobresaliendo entre ellos el glutaraldehído.

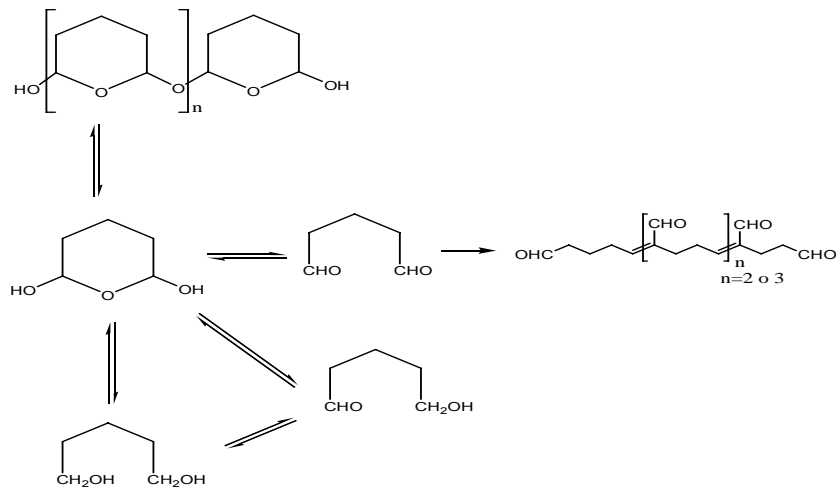
1.6.2 COMPORTAMIENTO QUÍMICO EN SOLUCIONES ACUOSAS

Reconocer la estructura y mecanismo del reactivo entrecruzante es importante para su uso. Sin embargo, la estructura del glutaraldehído en soluciones acuosas es sujeto de controversias. La estructura del glutaraldehído no sólo está limitada a su forma monomérica, sino a distintas formas moleculares.

Varios estudios han demostrado que el glutaraldehído disponible comercialmente, presenta una mezcla de multicomponentes, pero saber a ciencia cierta cual de estos componentes es el más eficiente para las reacciones con las proteínas aún está en discusión.

En soluciones acuosas el glutaraldehído puede existir en su forma más simple como un dialdehído monomérico, pero también como un dímero, trímero y polímero como se puede observar en la **figura 4** [17].

Figura 4. Posibles formas del glutaraldehído en solución acuosa



Por lo tanto la eficacia del glutaraldehído en la inmovilización y las controversias sobre su comportamiento químico pueden ser causa de sus múltiples estructuras, las cuales dependen de las condiciones de la solución.

1.6.3 REACCIÓN CON PROTEÍNAS

El glutaraldehído es el agente entrecruzante más efectivo de proteínas, debido en gran medida a las variadas estructuras que puede tomar en solución acuosa, lo que le permite bajo determinadas condiciones de pH, temperatura y concentración reaccionar con ciertos grupos funcionales de residuos aminoácidos de las proteínas tales como amino, tiol, fenol e imidazol porque el lado de la cadena más reactiva de los aminoácidos son nucleófilos.

La reactividad mostrada de los aminoácidos en orden decreciente frente a los aldehídos es: ϵ -amino, α -amino, guanidilo, amina secundaria y grupos hidroxilos.

Reacciona reversiblemente con grupos amino en un rango de pH entre 7 – 9, donde la reversibilidad observada es pequeña.

El entrecruzamiento de proteínas con soporte (soporte sólido) o entre moléculas de proteínas (libre de soporte), generalmente implica los grupos ϵ -amino de residuos de lisina.

Los grupos amino desprotonados son muy reactivos como agentes nucleofílicos, esto se debe a que los grupos ϵ -amino de lisina tienen $pK_a > 9.5$, lo que supone que el pequeño porcentaje de amina presente en su forma desprotonada con un pH bajo, es suficiente para conducir al equilibrio ácido-base para la desprotonación de estos grupos promoviendo de esta manera la reacción.

Los residuos de lisina generalmente no comprometen el sitio activo catalítico, el cual permite el entrecruzamiento moderado para preservar la conformación de la proteína y su actividad biológica.

El grupo ϵ -amino de los residuos de lisina de las proteínas reaccionan con los aldehídos formando bases de Schiff a través de un ataque nucleofílico del grupo amino al carbono carbonilo del aldehído. Sin embargo, las bases de Schiff no son estables bajo condiciones ácidas y tienden a regenerar el aldehído y la amina. En contraste, el enlace formado por la reacción del glutaraldehído, con un grupo amino mostró estabilidad excepcional para pH y temperatura extremas [17].

Estas bases de Schiff simples con ambos extremos de glutaraldehído monomérico pueden ser utilizadas como un mecanismo para el entrecruzamiento de proteínas.

Bajo condiciones de pH ácidas o neutras el glutaraldehído se presenta como una mezcla de monómeros y como un polímero.

Cada una de estas estructuras puede formar bases de Schiff a través de un ataque nucleofílico por los residuos de lisina en la proteína.

Como se ha mencionado anteriormente, las bases de Schiff bajo condiciones ácidas son inestables por lo que la formación de estas bases entre el grupo amino de la lisina y el aldehído libre (estructural) no es favorecida. Esta es más favorable para la estructura del hemiacetal cíclico monomérica y para las formas multiméricas.

1.6.4 APLICACIÓN PARA ENTRECruZAR ENZIMAS

El glutaraldehído es usado como un poderoso agente entrecruzante para la inmovilización de enzimas debido a que la reacción procede o se efectúa en soluciones acuosas buffer bajo condiciones estrictas de pH, fuerza iónica y temperatura. Esencialmente pueden ser usados dos metodologías: i) la formación de una red tridimensional como resultado de un entrecruzamiento intermolecular y ii) el enlace con un soporte insoluble (nylon, sílica fundida).

La inmovilización puede ser alcanzada para muchas enzimas en un rango de condiciones, las cuales deben ser elegidas según los resultados específicos que se requieran. Estas condiciones se determinan a menudo por ensayo y error, porque la insolubilización es críticamente dependiente sobre un delicado balance de factores tales como la naturaleza de la enzima, la concentración tanto de enzima como de agente entrecruzante, el tiempo de reacción, el pH y la fuerza iónica de la solución [17].

1.7 CATÁLISIS ENZIMÁTICA EN FASE ORGÁNICA

La catálisis enzimática ha sido tradicionalmente concebida como un proceso viable sólo en fase acuosa. Sin embargo, recientes investigaciones han descartado esta idea, demostrándose concluyentemente que las enzimas pueden ser activas en solventes orgánicos [18].

La razón más común para usar medios orgánicos en reacciones enzimáticas se debe a que el sustrato es poco soluble en agua. La adición de una pequeña cantidad de solvente orgánico es una buena alternativa para aumentar la solubilidad de sustratos hidrofóbicos y por tanto hacer posible la reacción. Las enzimas son usualmente insolubles en solventes orgánicos, y ellas se recuperan generalmente a partir de la solución de productos por filtración simple. Además las enzimas suspendidas en solventes anhidros exhiben extrema termoestabilidad, permitiendo usarlas a temperaturas tan altas como 100°C [19].

Pueden usarse solventes miscibles e inmiscibles en agua. En sistemas de dos fases, es decir, con solventes inmiscibles en agua; la enzima y otras sustancias hidrofílicas se encuentran generalmente presentes en la fase acuosa mientras que los sustratos hidrofóbicos y los productos se distribuyen en la fase orgánica. De acuerdo a la bioconversión ocurrida, los sustratos deben reaccionar con la enzima en la fase acuosa, después de la reacción los productos hidrofóbicos son transferidos hacia la fase orgánica; por otra parte, también se pueden presentar sistemas de reacción monofásicos en el que el solvente orgánico y las moléculas de agua se distribuyen en el sitio catalítico de la enzima.

La distribución de los reactivos en el sistema de dos fases, acuoso – orgánico puede ser controlado eligiendo el solvente y en algún grado manipulando la fase acuosa, por ejemplo, cambiando el pH que debe ser el adecuado para la enzima [20].

La enzimología en medios orgánicos ha adquirido un rápido desarrollo en el área investigativa, tanto que es de gran interés para químicos, bioquímicos e ingenieros químicos. Las enzimas en medios orgánicos exhiben cambios en sus propiedades tales como aumento de la termoestabilidad, especificidad modificada, y la capacidad de catalizar reacciones que son cinéticamente imposibles en soluciones acuosas [21]. Además, la utilidad industrial de los biocatalizadores en este tipo de

medios ha crecido, debido al número elevado de sustratos hidrofóbicos que no podían catalizarse en medios acuosos [20].

1.7.1 ELECCIÓN DEL SOLVENTE

En la biocatálisis en medios orgánicos, el solvente orgánico influye en la actividad y estabilidad de la enzima, la polaridad de los solventes juega un papel importante, esto es, un descenso en la constante dieléctrica del medio permitirá un aumento de las interacciones electroestáticas entre residuos cargados en la enzima, y esto conducirá a una disminución de la flexibilidad interna de la enzima. Esta flexibilidad es necesaria para los procesos catalíticos, ya que una flexibilidad reducida es acompañada normalmente por una disminución en la actividad catalítica de la enzima [22].

La hipótesis actual es que cuando la enzima es colocada en un solvente anhidro, ésta es cinéticamente atrapada en su estado nativo, en parte debido a su baja constante dieléctrica con grandes fuerzas electroestáticas. Esta rigidez enzimática es usada para explicar la termoestabilidad extrema de enzimas en medios orgánicos [22].

La presencia de un solvente orgánico siempre constituye un riesgo de inactivación de la enzima. Cuando se utilizan solventes miscibles en agua, concentraciones moderadas de estos solventes pueden ser agregadas sin provocar algún efecto negativo sobre la actividad de la enzima. Sin embargo, la adición de grandes cantidades, las cuales son algunas veces necesarias para disolver los sustratos, puede provocar la inactivación de la enzima [22].

La actividad enzimática es mayor en solventes orgánicos hidrofóbicos que en hidrofílicos; de hecho se puede establecer una correlación directa entre la actividad y la hidrofobicidad del solvente, expresada como Log P (donde P es el

coeficiente de reparto de un solvente dado entre n-octanol y agua, como puede ser apreciado en la **tabla 3**. Las razones de estas diferencias de actividad hay que buscarlas en la distinta capacidad de los solventes orgánicos para distorsionar la capa de agua esencial que rodea al biocatalizador, capacidad que obviamente es mayor en los solventes hidrofílicos [23].

Los solventes orgánicos pueden ser clasificados en tres grupos: i) los hidrofílicos ($\text{Log P} < 0$) en los cuales las enzimas son menos estables; ii) los levemente polares ($1 > \text{Log P} > 0$) en los que son relativamente estables y los hidrofóbicos ($\text{Log P} > 1$) donde son muy estables [3].

Tabla 3. Valores de Log P de solventes orgánicos comunes [23].

SOLVENTE	Log P	SOLVENTE	Log P
Dimetilsulfóxido	-1.3	Acetato de propilo	1.2
Dioxano	-1.1	Dipropiléter	1.9
Dimetilformamida	-1.0	Cloroformo	2.0
Metanol	-0.76	Acetato de pentilo	2.2
Acetonitrilo	-0.33	Tolueno	2.5
Etanol	-0.24	Octanol	2.9
Acetona	-0.23	Pentano	3.0
Tetrahidrofurano	0.29	Ciclohexano	3.2
Acetato de etilo	0.68	Hexano	3.5
Piridina	0.71	Octano	4.5
Butanol	0.80	Decano	5.6

La tendencia de los solventes a inactivar las enzimas no sólo depende de su hidrofobicidad, hay otras características fisicoquímicas de los solventes, tales como la capacidad de solvatar y la geometría molecular, que también son importantes [22].

Sin embargo, la correlación de parámetros simples tales como Log P o aún más complicados como la capacidad de desnaturalización, nunca han podido predecir de manera precisa los efectos de los solventes sobre las enzimas en general,

como claramente mostró un estudio, en el que una lipasa fue más estable en solventes hidrofóbicos mientras que la quimotripsina fue más estable en solventes menos hidrofóbicos [22].

1.7.2 EFECTO DEL SOLVENTE

1.7.2.1 Efecto del solvente sobre el agua adherida a la enzima

Algunos solventes parecen tener poco efecto sobre las moléculas de agua que se encuentran unidas a la enzima, sin embargo algunos solventes relativamente hidrofílicos son capaces de separar aún el agua unida a la superficie de la enzima, conduciendo esto a una enzima insuficientemente hidratada provocando una disminución en la actividad enzimática. El efecto de separar las moléculas de agua de la superficie de la enzima por la acción de un solvente ha sido correlacionado con la polaridad del solvente y en un menor grado por la hidrofobicidad del mismo (Log P). Por ejemplo, el metanol desorbe alrededor del 60% el agua enlazada a las enzimas (quimotripsina y peroxidasa), mientras que el hexano sólo desorbe el 0,5%. Los solventes polares (solventes con alta constante dieléctrica), usualmente requieren mayor cantidad de agua que los solventes apolares para obtener la misma eficiencia catalítica sobre algún sustrato; esto es debido a que los solventes apolares son incapaces de retirar las moléculas de agua adherida a la superficie catalítica de la enzima [22].

1.7.2.2 Efecto del solvente sobre la enzima

El solvente puede afectar la actividad de la enzima provocando cambios en la conformación dinámica de la proteína. Estudios de espectroscopia EPR y simulaciones de dinámica molecular de α -quimotripsina en una variedad de solventes orgánicos han mostrado que la conformación flexible en el sitio activo

disminuye con el descenso de la constante dieléctrica. Esto hace suponer cambios de las fuerzas electrostáticas entre los residuos cargados de la proteína [22].

El solvente puede también desestabilizar los sitios activos de la enzima. Las interrupciones de los centros activos, inducidos por el solvente puede ser el resultado de la combinación de la deshidratación y/o desdoblamiento de la enzima. Otro motivo es la competencia entre el solvente y el sustrato por unirse al sitio activo de la enzima. Esto es más significativo cuando se utilizan solventes más polares [22].

Adicionalmente, las moléculas de solvente pueden penetrar en el sitio activo de la enzima provocando una disminución de la polaridad local del sitio activo, y por tanto aumentar las repulsiones electrostáticas entre enzima y sustrato, con ello haciendo menos probable que se unan [22].

1.7.2.3 Efecto del solvente sobre los productos y los sustratos

Los solventes orgánicos pueden interactuar directa o indirectamente con los sustratos y productos, afectando la actividad de la enzima. Estos solventes producen variaciones en las concentraciones de los sustratos y los productos en la capa acuosa alrededor de la enzima, interfiriendo de esta manera en la reacción [22].

1.7.3 EFECTO DEL AGUA

Cuando las reacciones enzimáticas son llevadas a cabo en medios orgánicos, el agua es distribuida entre las diferentes fases presentes. Parte del agua se encuentra unida a la enzima y por tanto tiene gran influencia sobre la actividad catalítica. El resto se distribuye en el solvente y en las otras sustancias que se

encuentren. Frecuentemente hay una cantidad óptima de agua en la enzima y la adición de más agua, disminuye la actividad de la enzima.

El agua unida a la superficie de la molécula proteínica activa la enzima, aumentando la flexibilidad interna de la misma. Sin embargo, algunas veces el agua también puede actuar como un sustrato en la reacción enzimática provocando una menor posibilidad de contacto entre el sustrato en estudio y la enzima. Por ejemplo, la actividad catalítica del α -quimotripsina en acetato de etilo en la reacción de esterificación de N-acetil-L-fenilalanina con etanol, presenta una máxima actividad al 5% v/v de agua para después decaer su actividad [22].

1.7.3.1 Efecto del agua sobre la actividad de la enzima

La cantidad de agua asociada con la enzima es determinante en las propiedades que exhibe la enzima, es decir, actividad, estabilidad y especificidad. Aunque el contenido de agua en un sistema enzimático no acuoso típico es usualmente tan bajo como 0,01%, pequeñas variaciones en el contenido de ésta provoca grandes cambios en la actividad catalítica. Se ha reconocido que sólo una capa delgada de agua alrededor del biocatalizador es esencial para preservar la estructura tridimensional de la proteína en una forma activa catalíticamente. La cantidad puede ser de alrededor de 1000 moléculas de agua por molécula de enzima. Mientras una enzima es esencialmente inactiva en sistemas completamente “secos”, su actividad crece enormemente con la hidratación de la enzima [23].

Cuando el agua se agrega a un sistema enzima-solvente, ella se reparte entre el solvente y la enzima. La cantidad de agua adherida a la superficie de la enzima controla significativamente la actividad de la enzima, y en un menor grado el contenido de agua en el sistema total [22].

1.7.3.2 Efecto del agua sobre la movilidad de la proteína

Un estudio de la estructura y movimientos dinámicos del citocromo C en tetrahidrofurano utilizando espectroscopia RMN bidimensional del enlace N-H, reveló que la adición de agua al sistema enzima-solvente orgánico mejora la flexibilidad de la estructura proteínica. La explicación más acertada del aumento de la movilidad en la enzima, es que el agua provoca un aumento de polaridad del sitio activo y por tanto polariza la estructura de la enzima [22].

Es posible que en el estado “seco”, los grupos polares y cargados de la enzima interactúen unos con otros y produzcan la conformación inactiva. El papel del agua puede ser formar enlaces hidrógeno con estos grupos funcionales anulando dieléctricamente las interacciones electroestáticas entre grupos ionizados y neutralizando las interacciones dipolo-dipolo entre unidades peptídicas y grupos polarizados en las cadenas polipeptídicas dobladas. De esta manera las interacciones electroestáticas pueden ser dominantes en el control del comportamiento catalítico de la enzima en un medio orgánico [22].

2 METODOLOGÍA

2.1 REACTIVOS

Peróxido de hidrógeno (30% w/v), etanol (50%, 70%, 90% v/v), acetonitrilo (ACN) y tetrahidrofurano (THF) fueron obtenidos de Merck. Guayacol (J. T Baker), glutaraldehído (Sigma-Aldich). Los reactivos utilizados para buffers y otras soluciones fueron todos de grado analítico y proporcionado por JT Baker.

La peroxidasa de palma real (RPP) fue extraída y parcialmente purificada con anterioridad en el laboratorio de bioquímica e ingeniería de proteínas de la Universidad Industrial de Santander [8], empleando el método desarrollado por Sakharov y col. [24].

2.2 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS

La determinación de la concentración de proteínas en la solución enzimática de peroxidasa de palma real y en los agregados entrecruzados elaborados, utilizando albúmina de suero bovino (BSA) como fuente proteica, se realizó mediante el método colorimétrico de Bradford [25], usando BSA como patrón estándar. Este método fue empleado por ser rápido, reproducible y sensible para cuantificar proteínas, sin interferencias por la presencia de aminoácidos y carbohidratos.

La concentración de proteínas se obtuvo por interpolación con una curva de calibrado (Anexo A) que correlacionó la concentración de proteína o albúmina con la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro de haz simple Spectroquant® Nova 400. La concentración de proteínas es expresada en mg de proteína por mL de solución.

2.3 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CATALÍTICA

La actividad catalítica de la peroxidasa (RPP) se cuantificó de forma continua a través de la determinación de las velocidades iniciales de reacción, en un espectrofotómetro UV-VIS Spectroquant® NOVA 400; utilizando como sustrato guayacol y determinando la reacción de aparición del producto, el tetraguayacol [24]. La reacción se realizó de la siguiente forma: 100 μL de solución de enzima fue adicionada a 3 mL de buffer fosfato de potasio 10mM (pH 6) que contenía 18,2 mM de guayacol y 4,4 mM de H_2O_2 como sustrato, y posteriormente se cuantificó la variación de absorbancia a 470 nm y 25°C, utilizando el coeficiente de extinción molar del producto igual a $5200 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

Una unidad de actividad peroxidasa (U) se definió como la cantidad de enzima necesaria para oxidar $1\mu\text{mol}$ de sustrato por minuto bajo condiciones estándar de pH (6.0) y temperatura (25°C). La actividad específica es expresada como unidades de actividad por miligramo de proteína.

2.4 ELABORACIÓN DE LOS AGREGADOS ENTRECruzADOS (CLEAS)

Como agente precipitante se seleccionó etanol y como agente entrecruzante glutaraldehído. Se realizó una selección de las variables que tenían una mayor incidencia sobre la actividad catalítica del agregado entrecruzado. Para la optimización cuantitativa de estas variables se llevó a cabo un diseño experimental factorial multinivel, el cual consistió de 27 ejecuciones para cada agente precipitante. El orden de los experimentos fue aleatorio, lo cual permitió despreciar el efecto de variables ocultas. Las variables estudiadas y la matriz del diseño se presentan en las **tablas 4 y 5** respectivamente. Estas variables fueron elegidas conforme a lo planteado y obtenido por Barbosa [8] en su trabajo sobre la elaboración de agregados entrecruzados de peroxidasa de palma real (*Roystonea regia*)

Tabla 4. Condiciones experimentales en la selección de variables significativas de la inmovilización.

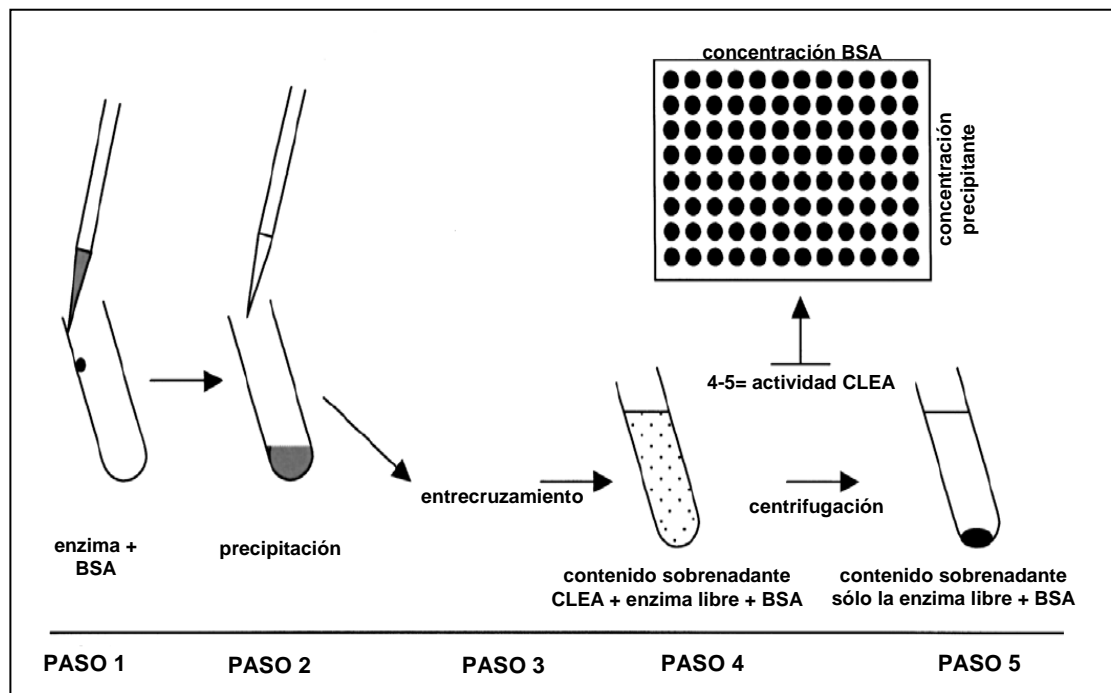
Factor	Nivel bajo (-1)	Nivel medio (0)	Nivel alto (1)
Concentración de etanol (%v/v)	50	70	90
Concentración de glutaraldehído (%p/v)	0,5	1	2
Concentración de BSA (mg/mL)	1	2	5

Tabla 5. Matriz del diseño experimental

Experiencia Nº	Concentración de BSA	Concentración de etanol	Concentración de glutaraldehído
1	-1	1	-1
2	1	1	0
3	1	0	-1
4	1	-1	-1
5	-1	0	1
6	0	1	0
7	-1	-1	-1
8	-1	-1	1
9	-1	1	0
10	0	-1	-1
11	1	1	-1
12	0	0	-1
13	1	0	0
14	0	0	0
15	-1	0	-1
16	-1	1	1
17	-1	0	0
18	1	-1	0
19	1	1	1
20	0	1	1
21	0	-1	1
22	0	1	-1
23	1	-1	1
24	0	-1	0
25	0	0	1
26	-1	-1	0
27	1	0	1

El proceso de elaboración de los agregados entrecruzados de peroxidasa de palma real (RPP) se llevó a cabo como se describe en la **figura 5**. Además, se mantuvo constante el pH (6.0), la temperatura de reacción (4°C) y la agitación.

Figura 5. Elaboración de los CLEAs [1].



Paso 1: Se tomó un volumen de 0.3 mL de la solución de enzima con BSA y se transfirió a un tubo de ensayo.

Paso 2. Etapa de precipitación

Al tubo de ensayo con RPP y BSA, se le adicionó 3.0 mL de etanol como agente precipitante, siguiendo las especificaciones de los ensayos de la matriz del diseño experimental para la concentración requerida (50, 70, 90 %v/v).

Paso 3. Entrecruzamiento del agregado formado

Al agregado de peroxidasa formado se le adicionó glutaraldehído como agente entrecruzante (0.5, 1 y 2 %p/v), el cual reaccionó con los grupos amino de la lisina

presentes en la superficie de la enzima permitiendo de esta manera su insolubilización.

Paso 4. Medición de la actividad catalítica del agregado entrecruzado conteniendo enzima libre

De la solución acuosa, la cual posee agregados entrecruzados y enzima libre que no reaccionó con el glutaraldehído, se extrajo un volumen de 10 μL y se diluyó en una relación de 1:20 con buffer fosfato 10 mM de pH 6, para determinar su actividad catalítica.

Paso 5. Determinación de proteínas y medición de la actividad catalítica del sobrenadante

La solución acuosa que contiene los agregados entrecruzados insolubles y la enzima libre se centrifugó. Se determinó la concentración de proteína presente en el sobrenadante obtenido, mediante el método colorimétrico de Bradford [25], para evaluar el nivel de entrecruzamiento. Así mismo, la actividad catalítica fue determinada.

La actividad catalítica de los CLEAs de la peroxidasa de la palma real se determinó como la diferencia entre la actividad catalítica del paso 4 y la actividad del paso 5.

2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico de los datos, se empleó un análisis estadístico de varianza (ANOVA), que es una técnica estadística de contraste de hipótesis donde se comparan medias, para evaluar la influencia de cada una de las variables,

utilizando el programa computacional de análisis estadístico STATGRAPHICS plus 5.1.

2.6 OPTIMIZACIÓN DE LOS AGREGADOS ENTRECruzADOS DE PEROXIDASA

A partir de los datos estadísticos obtenidos y de los gráficos de superficie de respuesta de actividad específica, se seleccionó la concentración de albúmina que presentó los mejores rendimientos para la elaboración de los agregados entrecruzados, al igual que las mejores condiciones para su optimización.

2.7 ESTABILIDAD TÉRMICA DE LOS AGREGADOS ENTRECruzADOS

Los agregados entrecruzados de la peroxidasa elaborados bajo las condiciones óptimas, fueron incubados a diferentes temperaturas (rango 70-96 °C) en 3 mL de solución buffer de fosfato 10 mM de pH 6 con agitación constante. Periódicamente fueron retiradas muestras del medio de incubación para determinar su actividad catalítica.

Para la determinación de la estabilidad térmica de la solución enzimática de RPP en presencia de BSA, se incubaron 3 mL de la solución en un intervalo de temperatura entre 70 y 96°C a diferentes tiempos de reacción y posteriormente se determinó su actividad catalítica.

2.8 ESTABILIDAD DE LOS AGREGADOS ENTRECruzADOS EN PRESENCIA DE SOLVENTES ORGÁNICOS.

La enzima inmovilizada fue incubada en acetonitrilo y tetrahidrofurano en diferentes concentraciones (rango 10-80 %v/v) con agitación constante y temperatura ambiente (25°C). Se tomaron alícuotas en diferentes tiempos de

incubación y se determinó su actividad catalítica, tal como se describe en la sección 2.3.

De igual forma se llevó a cabo el procedimiento anterior para la solución enzimática de RPP y la solución enzimática de RPP en presencia de BSA.

3 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1 ACTIVIDAD CATALÍTICA DE LA PEROXIDASA SOLUBLE

La actividad catalítica de la peroxidasa se determinó para diferentes diluciones de la enzima con el propósito de determinar el rango de linealidad y el efecto de dilución de la enzima sobre la actividad catalítica. La **tabla 6** muestra las actividades catalíticas obtenidas para las diferentes diluciones de la enzima soluble.

Tabla 6. Actividad catalítica de la peroxidasa soluble de la palma real

Dilución	Actividad volumétrica (U/ml)	Actividad específica (U/mg)
1/10	93	660
1/25	89	631
1/50	88	624
1/100	93	660
1/500	88	624
Promedio	90 ±2	639 ±8

La peroxidasa de palma real presenta en promedio una actividad específica de 639 ± 8 U/mg de proteína, por lo cual se considera la RPP una especie catalíticamente activa sobre el guayacol, de acuerdo con lo obtenido por Sakharov [24]

3.2 ELABORACIÓN DE LOS AGREGADOS ENTRECruzADOS (CLEAs)

La elaboración de los agregados entrecruzados de peroxidasa utilizando BSA como fuente proteica y etanol como agente precipitante, se llevó a cabo según el procedimiento descrito en la sección 2.4. Los resultados obtenidos se exponen en la **tabla 7**.

Tabla 7. Matriz de resultados de la elaboración de los agregados entrecruzados.

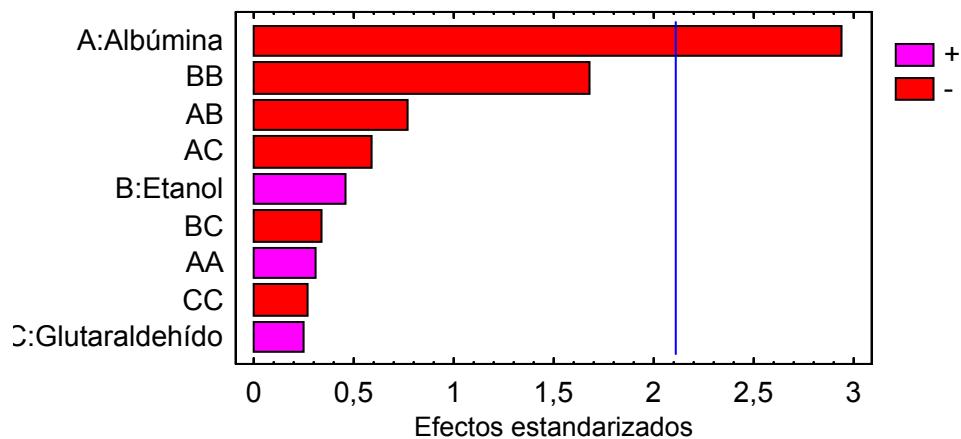
Experiencia Nº	Concentración BSA	Concentración etanol	Concentración glutaraldehído	Actividad específica (U/mg)
1	-1	1	-1	430
2	1	1	0	62
3	1	0	-1	60
4	1	-1	-1	86,3
5	-1	0	1	737
6	0	1	0	113
7	-1	-1	-1	100
8	-1	-1	1	166
9	-1	1	0	271
10	0	-1	-1	248
11	1	1	-1	71,4
12	0	0	-1	241
13	1	0	0	39,9
14	0	0	0	168
15	-1	0	-1	114
16	-1	1	1	77,7
17	-1	0	0	765
18	1	-1	0	89,3
19	1	1	1	78,7
20	0	1	1	201
21	0	-1	1	111
22	0	1	-1	134
23	1	-1	1	80,2
24	0	-1	0	126
25	0	0	1	160
26	-1	-1	0	103
27	1	0	1	49,3

En la **tabla 7** se observa que para determinadas condiciones de elaboración de los agregados entrecruzados de peroxidasa se obtuvieron valores de actividad catalítica mayores que el de la enzima soluble, la cual posee una actividad específica de 639 ± 8 U/mg de proteína.

Con los datos de la **tabla 7** se realizó una selección de las variables que tienen una mayor incidencia en la elaboración de los agregados entrecruzados de la enzima.

En el gráfico de Pareto se observa cada uno de los efectos estimados en orden decreciente de magnitud. La longitud de cada barra es proporcional al efecto estandarizado que es el efecto estimado dividido por su error estándar. Esto equivale a calcular un estadístico-t para cada efecto. La línea vertical puede usarse para juzgar qué efectos son estadísticamente significativos. Cualquier barra que se extienda más allá de la línea corresponde a efectos que son estadísticamente significativos en el 95% de nivel de confianza. En este caso, hay un efecto significativo, correspondiente a la concentración de albúmina en la elaboración de los CLEAs. El diagrama de Pareto se presenta en la **figura 6**.

Figura 6. Diagrama de Pareto para las variables del proceso de elaboración de los agregados entrecruzados.



A partir de la **figura 6** se estableció que la concentración de etanol y de glutaraldehído no influyen de forma significativa sobre la actividad específica de los agregados entrecruzados de peroxidasa, por tal razón no se tuvieron en cuenta para el análisis estadístico.

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA), para probar la importancia estadística de las variables, utilizando el programa STATGRAPHICS plus 5.1 en el cual se observó que la concentración de albúmina influye de manera significativa sobre la actividad específica de los agregados entrecruzados de la peroxidasa. Según el ANOVA el porcentaje de contribución de esta variable es del 95%. La **tabla 8** resume el análisis de ANOVA.

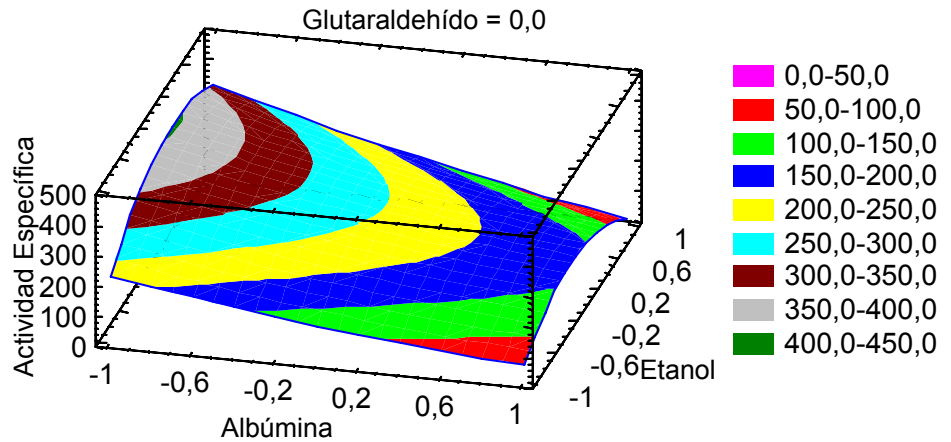
Tabla 8. Tabla de ANOVA.

Variable	Suma de Cuadrados	GL	P-Valor
A:Albúmina	256008	1	0,0093
B:Etanol	6014,12	1	0,6586
C:Glutaraldehído	1689,16	1	0,8145
AB	17118,9	1	0,4584
AC	9869,94	1	0,572
BB	83044,4	1	0,113
Error Total	505427	17	
Total (corr.)	887178	23	

La tabla de ANOVA mostrada, divide la variabilidad en actividad específica en distintos segmentos separados para cada uno de los efectos. Después prueba la significación estadística de cada efecto comparando la media al cuadrado contra una estimación del error experimental. En este caso, uno de los efectos tiene los p-valores inferiores a 0,05, indicando que son significativamente diferentes de cero al 95,0% de nivel de confianza. El valor estadístico P determina el grado de significancia de cada uno de los efectos de las variables sobre la actividad específica de los agregados entrecruzados de la peroxidasa, por lo cual hay evidencia que la concentración de albúmina tiene efecto sobre la actividad específica.

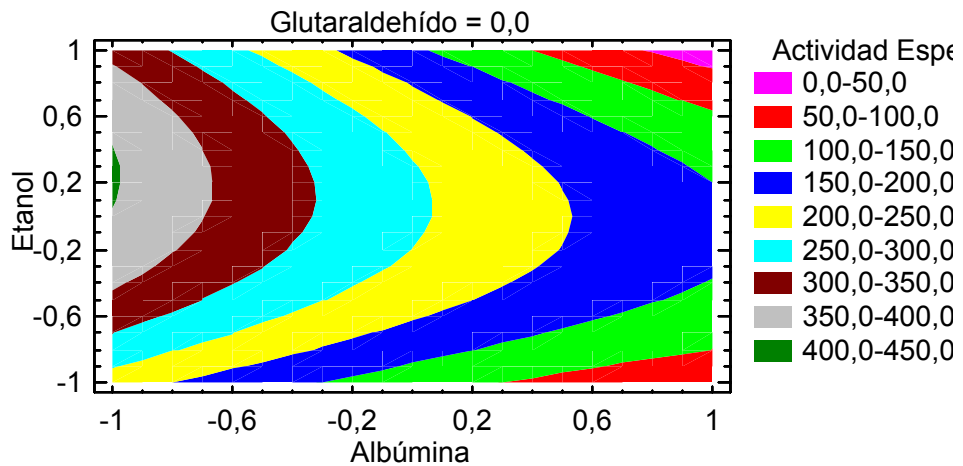
Posterior al análisis estadístico se elaboraron los gráficos de superficie de respuesta y de superficie de contorno con el propósito de hallar la combinación de niveles en los factores que permiten maximizar la actividad específica de los CLEAs. En las **figuras 7 y 8** se muestran los gráficos de superficie de respuesta y de superficie de contorno respectivamente, para los resultados obtenidos de la **tabla 8**.

Figura 7. Gráfico de superficie de respuesta para la elaboración de los CLEAs.



La **figura 7** muestra la actividad específica estimada como una función de la concentración de albúmina y de etanol. La altura de la superficie representa el valor de la actividad específica. Los otros factores se mantienen constantes.

Figura 8. Gráfico del contorno de superficie de respuesta para la elaboración de los CLEAs.



La **figura 8** muestra los contornos para la actividad específica de los agregados entrecruzados de la peroxidasa como una función de la concentración de albúmina y de etanol. Cada línea del contorno representa combinaciones de concentración de albúmina y concentración de etanol que dan un valor seleccionado de actividad específica. Los otros factores se mantienen constantes.

A partir de las **figuras 7 y 8** se realizó la estimación de las condiciones de operación óptimas, obteniendo un valor máximo de actividad específica para una concentración de albúmina de 1 mg/mL, una concentración de etanol del 70% (v/v) y una concentración de glutaraldehído del 2% (p/v).

Mediante el análisis estadístico previo se pudo determinar que la concentración de la albúmina es quien incide directamente sobre la actividad enzimática de los agregados entrecruzados de la peroxidasa.

La estrategia de usar una fuente de proteína durante la elaboración de agregados entrecruzados es benéfica cuando la concentración de proteína inicial es baja y cuando la enzima es inactivada por el glutaraldehído. En el caso de la peroxidasa de palma real, su baja concentración proteica, así como su limitado número de residuos de Lys impiden el entrecruzamiento efectivo con el agente bifuncional (glutaraldehído), por lo que el uso de una fuente proteica inerte como la albúmina permitió disponer de un mayor número de residuos de Lys que podrían reaccionar con el glutaraldehído, facilitando la formación de los agregados entrecruzados. Es importante señalar, que a medida que se aumentó la concentración de albúmina disminuyó la actividad enzimática, lo cual puede ser ocasionado por un impedimento estérico sobre el sitio activo de la enzima, provocado primordialmente por elevadas concentraciones de BSA (66,5 kDa), que es una proteína voluminosa que rodea la peroxidasa, provocando una resistencia al ataque del sustrato sobre la enzima para su posterior oxidación [9].

3.3 OPTIMIZACIÓN DE LOS AGREGADOS ENTRECruzADOS DE PEROXIDASA

La maximización de la actividad específica de los CLEAs se estimó mediante la combinación de niveles en los factores obtenidos en los gráficos de superficie de respuesta y de superficie de contorno mostrados en la sección 3.2. Se determinó que para una concentración de albúmina de 1 mg/mL, una concentración de etanol del 70% (v/v) y de glutaraldehído del 2% (p/v), se obtendría la máxima actividad específica de los agregados entrecruzados. En base a esta aproximación, se elaboraron los agregados entrecruzados de la peroxidasa bajo estas condiciones, obteniendo una actividad específica promedio de 752,5 U/mg.

Los CLEAs elaborados con BSA mostraron un incremento en un factor de 1,2 veces comparados con la actividad específica de la enzima soluble.

3.4 ESTABILIDAD TÉRMICA DE LOS AGREGADOS ENTRECruzADOS ELABORADOS BAJO LAS CONDICIONES ÓPTIMAS

Antes de dar inicio a esta etapa, es necesario tener en cuenta las constantes de inactivación de la enzima soluble como punto de partida para la evaluación de la estabilidad térmica de los agregados entrecruzados. En la **figura 9**, se observa la cinética de inactivación de la peroxidasa de palma real (RPP). La **tabla 9**, muestra los valores de la constante de inactivación para la peroxidasa soluble a diferentes temperaturas.

Figura 9. Estabilidad térmica de la peroxidasa de palma real (RPP) a diferentes temperaturas [8].

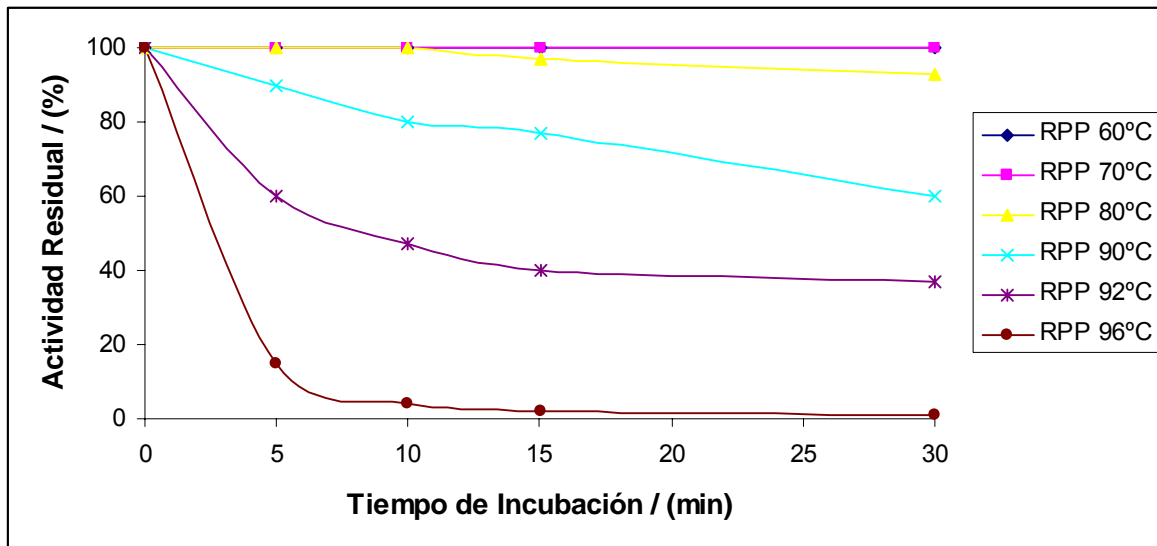


Tabla 9. Constantes de inactivación de la peroxidasa soluble a diferentes temperaturas [8].

Temperatura (°C)	$k_{inactiv}$ (seg ⁻¹)
80	$6,80 \times 10^{-3}$
90	$1,86 \times 10^{-2}$
91	$3,40 \times 10^{-2}$
92	$14,6 \times 10^{-2}$
96	$29,8 \times 10^{-2}$

En la **figura 9** se observa que la inactivación total de la peroxidasa soluble ocurre a una temperatura de 96°C, luego de un tiempo de incubación de 20 minutos. De la **tabla 9** se establece que la enzima soluble empieza a inactivarse a partir de los 80°C, por lo cual se tomó esta temperatura inicial y el tiempo máximo de

incubación (20 min) para la evaluación de la estabilidad térmica de la solución enzimática conteniendo BSA y de los agregados entrecruzados.

En las **figuras 10 y 11** se observa la cinética de inactivación de la solución enzimática conteniendo BSA y de los agregados entrecruzados de la peroxidasa de la palma real elaborados bajo las condiciones óptimas, respectivamente.

Figura 10. Estabilidad térmica de la solución enzimática conteniendo BSA a diferentes temperaturas.

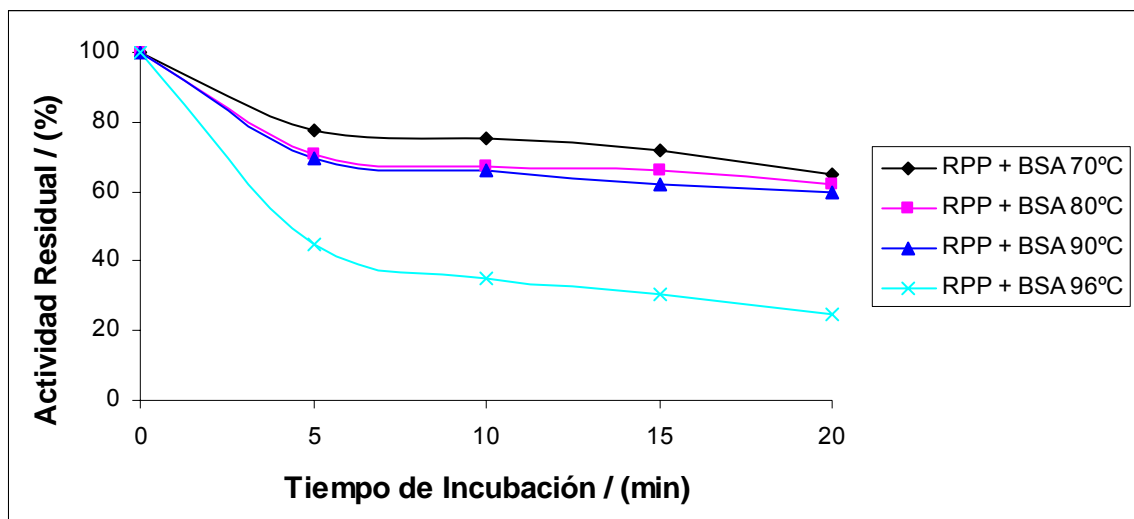
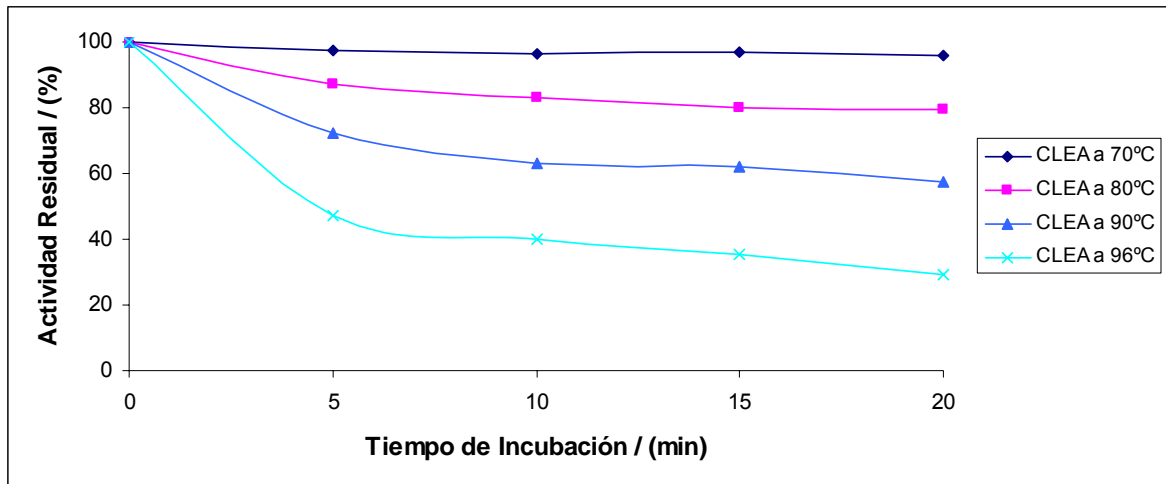


Figura 11. Estabilidad térmica de los agregados entrecruzados de peroxidasa (CLEAs) de la palma real a diferentes temperaturas.



De la **figura 10**, se aprecia que la actividad de la solución enzimática conteniendo BSA disminuyó a partir de una temperatura de incubación de 70°C. Por el contrario, en la **figura 11**, los agregados incubados a esta temperatura conservaron totalmente su actividad original. Además, en comparación con la enzima soluble, los agregados enzimáticos a una temperatura de 96°C retuvieron el 30% de su actividad inicial.

En la **tabla 10** se comparan los valores de las constantes de inactivación de la enzima soluble, la solución enzimática conteniendo BSA y los agregados entrecruzados.

Tabla 10. Constantes de inactivación de la enzima soluble, la solución enzimática conteniendo BSA y los agregados entrecruzados elaborados (CLEAs) a diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	$k_{\text{inactiv}}^{\text{CLEAs}}$ (seg ⁻¹)	$k_{\text{inactiv}}^{\text{RPP}}$ (seg ⁻¹)	$k_{\text{inactiv}}^{\text{RPP+BSA}}$ (seg ⁻¹)
70	$1,20 \times 10^{-3}$		$7,9 \times 10^{-3}$
80	$6,10 \times 10^{-3}$	$6,80 \times 10^{-3}$	$10,3 \times 10^{-3}$
90	$14,1 \times 10^{-3}$	$1,86 \times 10^{-2}$	$11,3 \times 10^{-3}$
96	$31,3 \times 10^{-3}$	$29,8 \times 10^{-2}$	$38,5 \times 10^{-3}$

De la **tabla 10**, se puede observar que a una temperatura de incubación de 80°C y 96°C los CLEAs poseen mayor estabilidad que la peroxidasa soluble y que la solución enzimática que contiene BSA. Por otro lado, a una temperatura de incubación de 90°C, es la solución enzimática conteniendo BSA quien posee mayor estabilidad a altas temperaturas que los CLEAs y que la peroxidasa soluble.

Los agregados entrecruzados de la peroxidasa mostraron un incremento de 1,3 y 1,2 veces la estabilidad térmica en comparación con el de la peroxidasa soluble a una temperatura de 90°C y 96°C, respectivamente. Este aumento de la estabilidad puede ser ocasionado por el entrecruzamiento intermolecular e intramolecular del glutaraldehído con las moléculas de la enzima y de igual forma por el entrecruzamiento del glutaraldehído con los residuos lisínicos de la albúmina, lo que ocasiona una conformación estructural más rígida que hace más resistente a la enzima a cambios conformacionales producidos por la temperatura [8].

3.5 ESTABILIDAD DE LOS AGREGADOS ENTRECruzADOS EN PRESENCIA DE SOLVENTES ORGÁNICOS

La elección de los solventes se realizó teniendo en cuenta que los solventes orgánicos con un $\text{Log } P < 0$, como el acetonitrilo (-0,33), son hidrofílicos y las enzimas son menos estables en ellos; además los que poseen un $1 > \text{Log } P > 0$, como el tetrahidrofurano (0,44), son levemente polares siendo las enzimas relativamente estables en tales solventes [3].

En las **figuras 12 y 13**, se puede apreciar el efecto de los solventes orgánicos sobre la enzima soluble y la solución enzimática de peroxidasa con BSA, respectivamente, después de un tiempo de incubación de 60 minutos.

Figura 12. Efecto de los solventes orgánicos sobre la peroxidasa de palma real, después de un tiempo de incubación de 60 minutos.

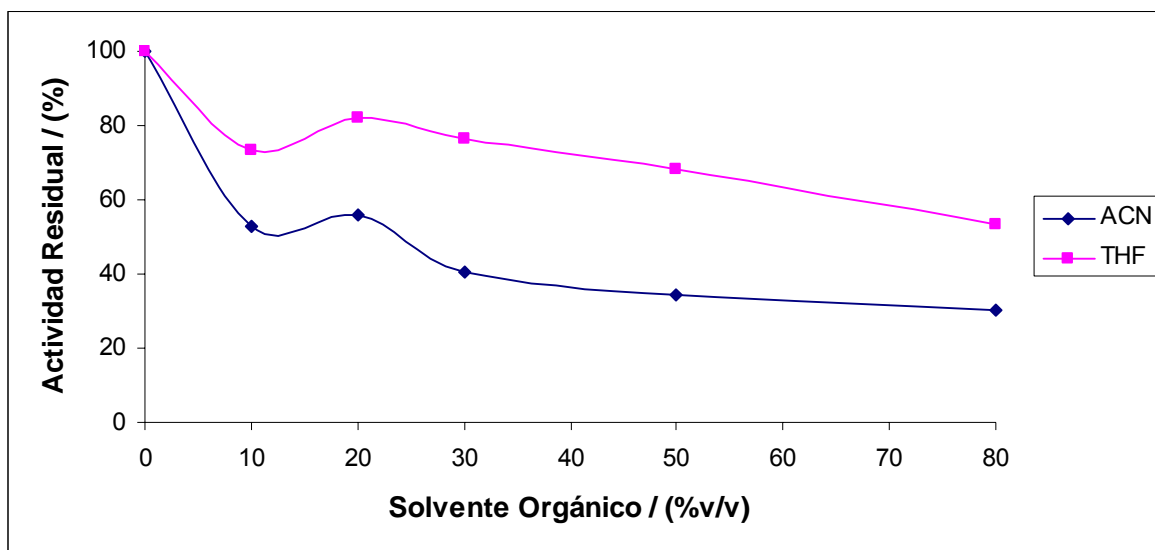
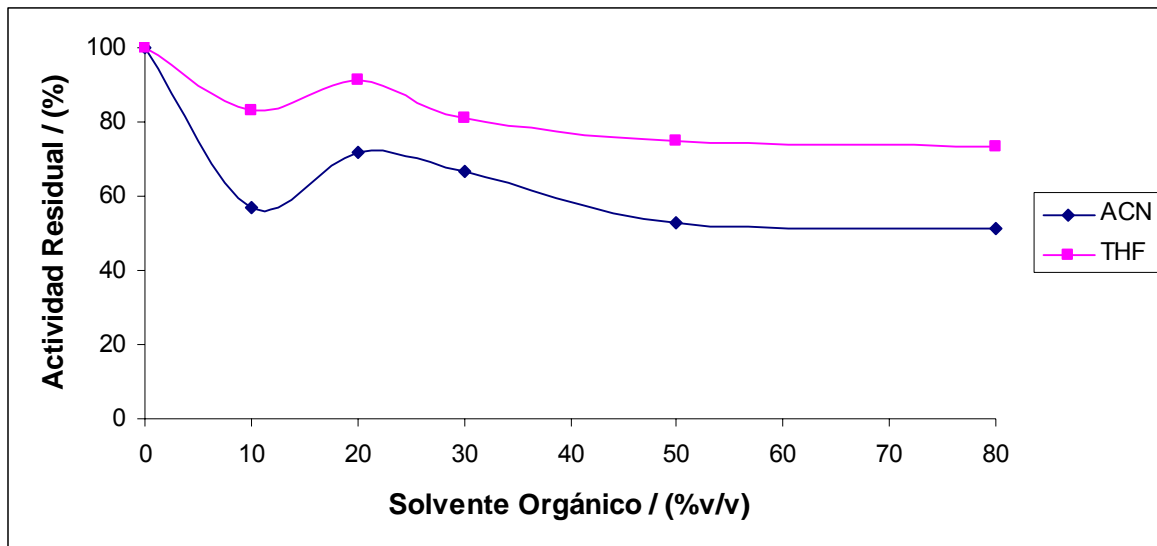


Figura 13. Efecto de los solventes orgánicos sobre la enzima soluble con BSA, después de un tiempo de incubación de 60 minutos.



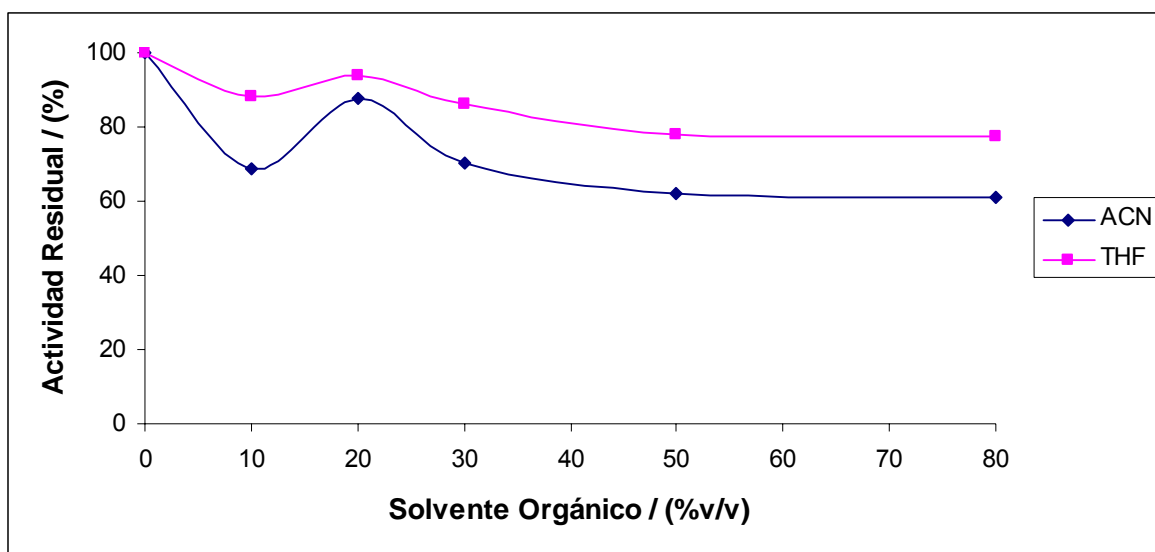
Los solventes miscibles con el agua, es decir, con alto grado de hidrofiliidad interactúan con la enzima y provocan una disminución de la actividad enzimática. Este efecto es más marcado a medida que la concentración del solvente orgánico aumenta, lo cual se evidencia al observar las **figuras 12 y 13**, donde la actividad específica de la enzima soluble disminuye al incrementar la concentración de ACN que actúa, en este caso, como el solvente orgánico más hidrofílico. Aparentemente, las causas que explican este fenómeno son la capacidad de los solventes hidrofílicos de solubilizar la capa de agua que rodea y mantiene catalíticamente activa la enzima y los cambios conformacionales en la molécula de enzima que ocurren en presencia de solventes orgánicos [18].

Normalmente solventes con altos valores de Log P (mayores que 4, solventes hidrofóbicos) causan menor inactivación de la enzima que los solventes más hidrofílicos [22].

Los solventes polares usualmente requieren mayor cantidad de agua, que los solventes apolares, para obtener la misma eficiencia catalítica sobre algún sustrato; esto es debido a que los solventes apolares son incapaces de retirar las moléculas de agua adherida a la superficie catalítica de la enzima [22].

La **figura 14** muestra el efecto de solventes orgánicos como el tetrahidrofurano y el acetonitrilo sobre la actividad catalítica de los agregados entrecruzados de peroxidasa de palma real (*Roystonea regia*), después de 60 minutos de incubación.

Figura 14. Efecto de los solventes orgánicos sobre los agregados entrecruzados de peroxidasa de palma (CLEAs), después de 60 minutos de incubación.

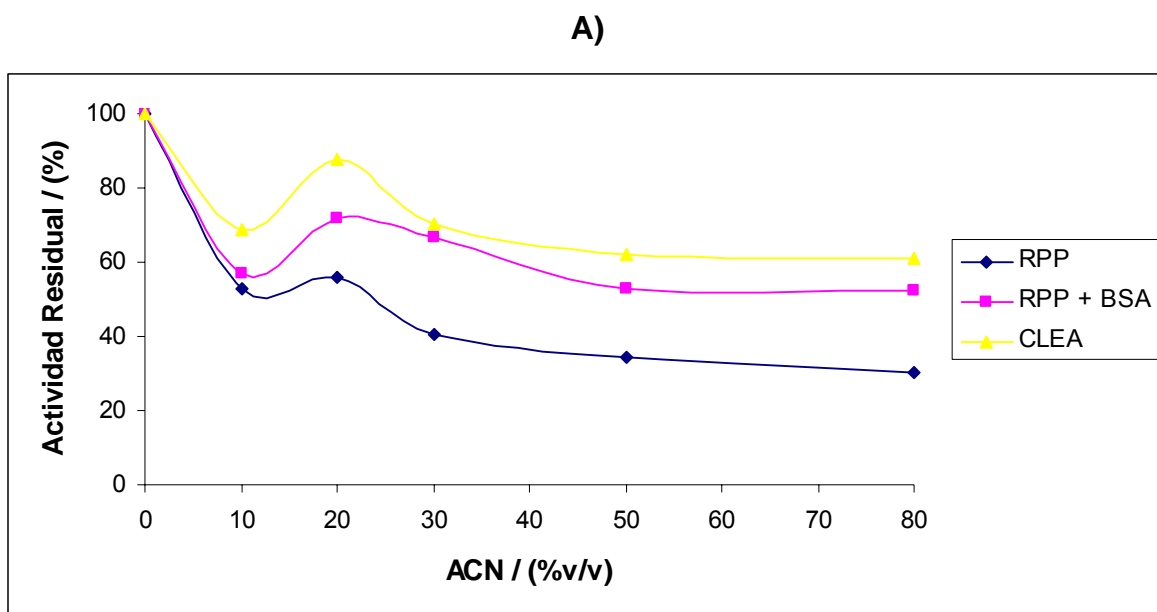


De la **figura 14** se estima que los agregados entrecruzados de la peroxidasa mantienen hasta un 80% y 70% de su actividad residual en una concentración del 80% (v/v) de tetrahidrofurano y de un 75% de acetonitrilo, respectivamente, luego de un tiempo de incubación de 60 minutos. Esto evidencia que los CLEAs de la peroxidasa son altamente estables al ser incubados en estos solventes.

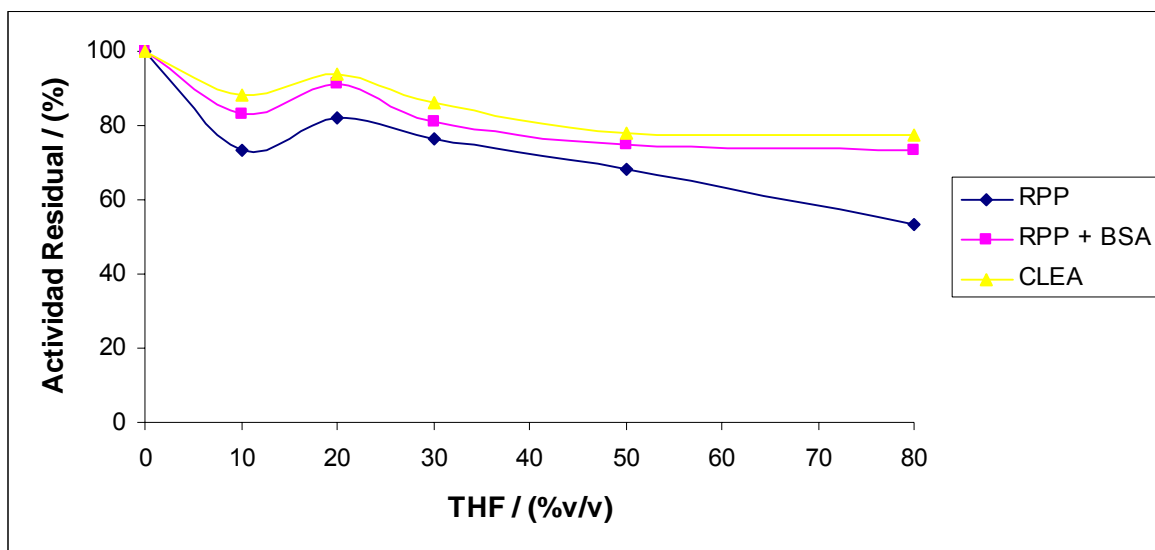
En las **figuras 12, 13 y 14** se observa un incremento de la actividad en las soluciones enzimáticas y en los agregados entrecruzados a concentraciones moderadas de solventes orgánicos (aproximadamente 10 – 30 %v/v). Debido, en el caso de enzimas hidrolíticas como lo es la peroxidasa, a que los solventes orgánicos están directamente involucrados en la reacción enzimática y actúan como nucleófilos adicionales [18].

En la **figura 15** se hace una comparación del efecto de los solventes orgánicos sobre la enzima soluble, la solución enzimática de peroxidasa con BSA y los agregados entrecruzados elaborados en los solventes empleados, después de un tiempo de incubación de 60 minutos.

Figura 15. Comparación del efecto de los solventes orgánicos sobre la enzima soluble, la solución enzimática de peroxidasa con BSA y los agregados entrecruzados elaborados en: A) acetonitrilo (ACN) y B) tetrahidrofurano (THF). Después de un tiempo de incubación de 60 minutos



B)



En la **figura 15** se aprecia que los agregados entrecruzados de la peroxidasa de la palma real mostraron un incremento en su estabilidad frente a solventes orgánicos como el THF y el ACN, en comparación con la solución enzimática de RPP conteniendo BSA. Este aumento de estabilidad en solventes orgánicos se debe posiblemente a que los agregados entrecruzados son más resistentes a cambios conformacionales ocasionados por la ruptura de enlaces entre las moléculas de la enzima y la capa hidratante que rodea a la misma, lo que ocasiona la disminución de la actividad catalítica, esto de acuerdo a lo propuesto por Secundo y Carrea [26] en su investigación sobre la actividad y conformación de lipasas y otras enzimas en solventes orgánicos.

4. CONCLUSIONES

- ✓ Los agregados entrecruzados de la peroxidasa de la palma real (*Roystonea regia*) elaborados con albúmina de suero bovino (BSA), mostraron un incremento en la actividad específica y estabilidad térmica en comparación con la enzima soluble.
- ✓ En el proceso de elaboración de los agregados entrecruzados de la peroxidasa se estableció que la concentración de albúmina de suero bovino (BSA) ejerció una influencia significativa (estadístico $P < 0.05$) sobre la actividad enzimática de los agregados entrecruzados formados.
- ✓ La máxima actividad enzimática de los agregados entrecruzados (CLEAs) se estimó mediante la combinación de niveles en los factores obtenidos en los gráficos de superficie de respuesta y de superficie de contorno. Determinándose, que para una concentración de albúmina de 1 mg/mL, una concentración de etanol del 70% (v/v) y de glutaraldehído del 2% (p/v) se obtendría la máxima actividad específica de los CLEAs.
- ✓ La optimización de los agregados entrecruzados de la peroxidasa llevó a la obtención de una actividad específica de 752,5 U/mg para el CLEA, con lo cual se corroboró el aumento de la actividad específica del agregado en comparación con la enzima soluble.
- ✓ Los agregados entrecruzados de la peroxidasa con BSA elaborados bajo las condiciones óptimas, presentaron una estabilidad térmica relativamente mayor, en un factor de 1,3 y 1,2 veces, al de la enzima soluble a una temperatura de 90°C y 96°C respectivamente.

- ✓ La adición de BSA como fuente proteica facilita la obtención de CLEAs en casos donde la concentración de proteína inicial de la enzima es baja y cuando la enzima es vulnerable a la alta concentración de agente entrecruzante (glutaraldehído).
- ✓ Los solventes orgánicos miscibles con el agua, interaccionan con la enzima y provocan una disminución de la actividad enzimática. Este efecto es más marcado a medida que la concentración del solvente orgánico aumenta, tal como se apreció al incubar a la RPP en acetonitrilo (ACN) que posee un alto grado de hidrofiliidad interaccionando con la enzima y provocando una disminución de la actividad enzimática.
- ✓ La actividad catalítica de la RPP fue mayor al ser incubada en un solvente orgánico levemente hidrofóbico, como lo es el tetrahidrofurano (THF), corroborando el funcionamiento de las enzimas en este tipo de solventes orgánicos.
- ✓ La manera de reducir las limitaciones que presentan las enzimas suspendidas en solventes orgánicos es mediante la inmovilización, donde el acceso a las moléculas individuales de proteína se mejora. La inmovilización realizada mediante el entrecruzamiento de agregados (CLEAs) de peroxidasa condujo a una mayor estabilidad tanto en solventes hidrofílicos (ACN), como en los relativamente hidrofóbicos (THF).
- ✓ Los CLEAs elaborados mantuvieron hasta un 80% de su actividad residual a elevadas concentraciones de solvente orgánico (ACN y THF).
- ✓ De forma concluyente, los CLEAs elaborados usando como fuente de proteína BSA, aumentaron la estabilidad térmica y la estabilidad en solventes orgánicos de la peroxidasa de palma real.

5. RECOMENDACIONES

Realizar un análisis de microscopio de barrido electrónico (SEM), para determinar el tipo de estructura (tipo clustering o tipo bolas) de los agregados entrecruzados formados usando BSA como fuente de proteína.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] SHELDON, R.; VAN RANTWIJK, F.; SCHOEVAART, R. Preparation, Optimization, and structures of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). *Biotechnology and Bioengineering*, (87:6), (2004).
- [2] CAO, L.; VAN RANTWIJK, F.; SHELDON, R. Cross-linked Enzyme Aggregates: A simple and effective method for the immobilization of penicillin acylase. *Organic letters*, (2:10) :(1361-1364), (2000).
- [3] CAO, L.; VAN RANTWIJK, F.; SHELDON, R.; y otros. Cross-linked Aggregates of penicillin acylase: robust catalysts for the synthesis of β -lactam antibiotics. *Journal of molecular catalysis B: Enzymatic*, (665-670), (2001).
- [4] CAO, L.; VAN RANTWIJK, F.; SHELDON, R.; y otros. Cross-linked Enzyme Aggregates with enhanced activity: application to lipases. *Biotechnology letters*, (24: 1379-1383), 2002.
- [5] MOIRA, L.; VAN RANTWIJK, F.; SHELDON, R. Crude aminoacylase from *Aspergillus sp.* Is a mixture of hydrolases. *Biotechnology and bioengineering*. (84:6), (2003).
- [6] WILSON, L.; BETANCOR, L.; FERNANDEZ-LORENTE, M. Cross-linked Aggregates of multimeric enzymes: A simple and efficient methodology to stabilize their quaternary structure. *Biomacromolecules*, (5:3), (2004).
- [7] GAUR, R.; PANT, H.; JAIN, R.; y otros. Galacto-oligosaccharide synthesis by immobilized *Aspergillus oryzae* β -galactosidase. *Food Chemistry*, (2005).

- [8] BARBOSA, L. Elaboración de agregados entrecruzados de peroxidasa de palma real (*Roystonea regia*). Tesis de grado. Universidad industrial de Santander, (2006).
- [9] SHAH, S.; SHARMA, A.; GUPTA, N. Preparation of cross-linked enzyme aggregates by using bovine serum albumin as a proteic feeder. *Analytical biochemistry*. (351: 207-213), (2006).
- [10] TORRES, E.; BUSTOS, I.; LE BORGE, S. Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants. *Applied catalysis B*, (46: 1-15), (2003).
- [11] BABOROVÁ, P.; BALDRIAN, P. Purification of a new manganese peroxidase of the white-rot fungus *Irpex lacteus*, and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the enzyme. *Research in microbiology*, (157: 248-253), (2006).
- [12] CASTILLO, J. Separación y caracterización de las isoenzimas de la peroxidasa de la palma real (*Roystonea regia*). Tesis de grado. Universidad Industrial de Santander, (2001).
- [13] CASTILLO, A.; ARIZA, J. Extracción y purificación de las peroxidases de las hojas de palma de aceite (*Elais guineensis*) y palma real (*Roystonea regia*). Tesis de grado. Universidad Industrial de Santander, (2000).
- [14] CHATTOPADHYAY, K.; MAZUNDAR, S. Structural and conformational stability of horseradish peroxidase: effect of temperature and pH. *Biochemistry*. (39:263-270), (2000).
- [15] ARROYO, M. Immobilized enzymes: Theory, methods of study and applications. *Ars Pharmaceutica*, (39:2: 23-39), (1999).

- [16] CAO, L.; VAN LANGEN, L.; SHELDON, R. Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier free?. *Curr opin Biotechnol*, (14:4) (387-394), (2004).
- [17] MIGNEAULT, I.; DARTIGUENAVE, C. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *Biotechniques*, (37:790-802), (2004).
- [18] ILLANES, A. Biotecnología de enzimas. Ediciones universitarias de Valparaíso de la Universidad Católica de Valparaíso. Chile, (1994).
- [19] VOLKIN, D. B.; STAUBLI, A.; LANGER, R.; y otros. *Biotechnology and Bioeng.* (37:843 – 843), (1991).
- [20] KOSKINEN, A. M.; KLIBANOV, A. Enzymatic Reactions in Organic Media. (1996).
- [21] KUHL, P.; HALLING, P. J. Chymotrypsin suspended en organic solvents with salt hydrates. *Tetrahedron Lett.* (31:5213 – 5216), (1990).
- [22] GUTIERREZ, E. Estudio del efecto de los solventes orgánicos sobre la actividad biocatalítica de la cloroperoxidasa. Tesis de Grado. Universidad Industrial de Santander, (2001).
- [23] PEREZ, I.; MORENO, V. Acilaciones regioselectivas de oligosacáridos catalizadas por enzimas: caracterización y propiedades de los productos. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. 2006.
- [24] SAKHROV, I.; VESGA, M.; GALAEV, I.; SAKHAROVA, y otros. "Peroxidases from royal palm tree *Roystonea regia*: Purification and properties". *Plant science.* (2001) (161), 853-860.

[25] BRADFORD, M. "A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding". *Anal. Biochem.* (1976) (72), 248-254.

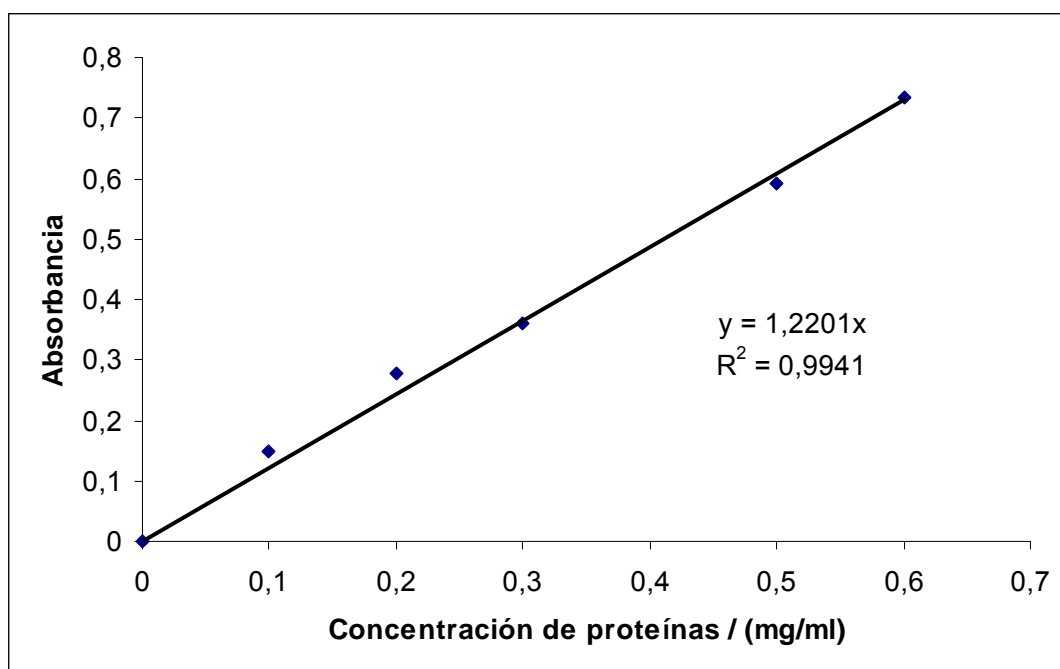
[26] SECUNDO, F.; CARREA, G. Lipase activity and conformation in neat organic solvents. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* (2002) (19–20), 93–102

[27] LIU, J.; WANG, M. Improvement of activity and stability of chloroperoxidase by chemical modification. *BMC Biotechnology* (2007), (7:23), 1 – 8.

[28] HINER, N.; HERNANDEZ, J.; ARNAO, B.; y otros. Comparative study of the purity, enzyme activity, and inactivation by hydrogen peroxide of commercially available Horseradish peroxidase isoenzymes A and C. *Biotech and Bioeng.* (50: 655-662) (1996).

ANEXO A

Curva de calibración para la determinación de la concentración de proteína por el método de Bradford.



$$\text{proteína(m g/ml)} = \frac{\text{absorbancia}}{1,2201}$$

ANEXO B

Cálculo de la actividad específica de la peroxidasa soluble de la palma real (*Roystonea regia*).

La actividad específica de la peroxidasa soluble se determino así:

$$\text{actividad específica (U/mg)} = m \frac{10^6}{\epsilon_{\text{producto}}} \frac{V_t}{V_m} \frac{d}{C_{\text{prot}}}$$

Donde:

- m : Pendiente (mol/L.min)
- ϵ : Coeficiente de extinción molar del guayacol, $5200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.
- V_t : volumen total de reacción (ml).
- V_m : Volumen de solución enzimática (ml).
- d : factor de dilución de la solución enzimática.
- C_{prot} : concentración de proteína en la solución enzimática.
- U : se definió como la cantidad de enzima necesaria para oxidar $1 \mu\text{mol}$ guayacol por minuto bajo condiciones de pH 6.0 y temperatura de 25°C .

La actividad específica de los agregados entrecruzados se determinó de igual forma que la enzima soluble

ANEXO C

Calculo de la actividad específica de los agregados entrecruzados de la peroxidasa de la palma real (*Roystonea regia*).

$$\text{Actividad del CLEA (U)} = A_{\text{etapa 4}} - A_{\text{etapa 5}}$$

Donde:

$A_{\text{etapa 4}}$: Actividad del agregado entrecruzado + enzima libre que no fue entrecruzada.

$A_{\text{etapa 5}}$: Actividad del sobrenadante conteniendo solo enzima libre.

La actividad en cada etapa se determinó de forma similar a la mostrada en el anexo B, teniendo en cuenta la concentración de proteína entrecruzada y la concentración de proteína en el sobrenadante.

ANEXO D

Las constantes de inactivación térmica, se determinaron siguiendo un modelo cinético de primer orden.

$$E = E_0 + e^{-k_i * t}$$

$$a = E / E_0$$

$$a = e^{-k_i * t}$$

Donde:

a : Es la actividad volumétrica medida en U/mL de extracto enzimático.

k : Constante de inactivación.

t : Tiempo de incubación para cada temperatura.

Para hacer posible el cálculo de la constante, se procedió a realizar la linealización de la curva.

$$\ln(a) = -k_i * t$$

Donde la pendiente de esta curva permite calcular las constantes de inactivación térmica, en unidades de t^{-1} .