



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**  
**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**

**DISEÑO RACIONAL DE UNA ESTRATEGIA PARA LA INMOVILIZACIÓN DE LA  
CPO**

**TESIS**  
**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**  
**Maestra en Ciencias**

**PRESENTA:**  
**I.B.I. KARINA JASMIN SALCEDO VITE**

**TUTOR PRINCIPAL**  
**DRA. MARCELA AYALA ACEVES, IBt UNAM**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR**  
**DR. EDMUNDO CASTILLO ROSALES, IBt UNAM**  
**Y DRA. CLAUDIA MARTÍNEZ ANAYA, IBt UNAM**

**CUERNAVACA, MORELOS ABRIL, 2013**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



CON MUCHO CARIÑO PARA MI MAMA Y MI HERMANO



## AGRADECIMIENTOS

Al apoyo financiero de CONACYT y PAPIIT IN201612

A los integrantes del comité tutorial por dar seguimiento al desarrollo de este trabajo y sus valiosas observaciones y sugerencias: Dra. Marcela Ayala Aceves, Dra. Claudia Martínez Anaya y Dr. Edmundo Castillo Rosales.

A los integrantes del comité académico por su buena disposición y las sugerencias que enriquecieron el contenido de esta tesis: Presidente, Dr. Gerardo Corzo Burguete; Secretaria, Dra. Claudia Rodríguez Almazán; y vocales, Dr. Jorge Luis Folch Mallol, Dra. Clarita Olvera Carranza y Dr. Eduardo Torres Ramírez.

A todos los recalitrantes por integrarme a su grupo de trabajo y brindarme su amistad y cariño. Específicamente, al Dr. Rafael Vázquez por abrirme las puertas de su laboratorio; a la Dra. Marcela Ayala Aceves por su gran labor como tutora; al Dr. Sergio Águila por el apoyo técnico y académico; a la Biol. Rosa Román Miranda y la Dra. Lucía Perezgasga Ciscomani por el apoyo técnico; a mis compañeros y amigos Abraham Vidal, Lorena Hernández, Lorena Sánchez, Andrés Arrocha, Martín Barragán, Cristina Torres, Maira Avelar, Estefanía Sierra y Noemi Bentacourt; y finalmente a mi novio Guillermo Huerta por su compañía.

A mis amigos de generación y ALM: Arlen Peña, Nadia Maturano, Paulina Torres y Jorge Hernández.

A mis amigas: Juanita Hernández, Karla Cervantes y Cindy Sotelo.

A mi familia: mi mamá, mi hermano y mis hermosos sobrinos Fernando y Jade.

Por último quiero agradecer infinitamente a las personas e instituciones que me apoyaron desinteresadamente durante la preparatoria y universidad: A las madres del Instituto del Pilar, especialmente a madre Covandonga por abrirme las puertas de la casa y el colegio y brindarme su apoyo y cariño; y a Fundación Casa de Santa Hipólita A.C. por el apoyo financiero otorgado durante la licenciatura, con especial agradecimiento a mi bienhechor.



## RESUMEN

La cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago* es una enzima de interés ambiental e industrial debido a su capacidad de catalizar varios tipos de reacciones (catalasa, halogenasa, peroxigenasa y peroxidasa). La utilización de esta enzima a gran escala ha sido frenada entre otras cosas por la carencia de un biocatalizador reciclable basado en esta enzima, el cual puede ser obtenido a través de su inmovilización. El principal impedimento para la inmovilización covalente de la cloroperoxidasa es su inestabilidad a valores de pH por arriba de 7, ya que la inmovilización de proteínas se realiza principalmente a través reacciones de nucleófilo, las cuales son favorecidas a pHs alcalinos.

En este trabajo fueron diseñadas cuatro estrategias para la inmovilización covalente de la cloroperoxidasa basadas en mantener libre el acceso al sitio activo y realizar la inmovilización por medio de una reacción química cuyas condiciones óptimas sean compatibles con las condiciones de estabilidad de la cloroperoxidasa. Durante el desarrollo de las estrategias de inmovilización fueron generados soportes activados con alta densidad de grupos funcionales así como métodos simples para su caracterización, que podrían ser útiles en la inmovilización de otras enzimas.

Mediante las estrategias de inmovilización planteadas en este trabajo fue posible obtener 3 biocatalizadores a base de cloroperoxidasa. Dos de ellos debidos a una interacción no covalente y con una alta actividad específica: CPO inmovilizada en Eupergit activado con iones diazonio y CPO inmovilizada en Eupergit activado con glutaraldehído, con una actividad específica de  $18,205 \pm 5,480$  U/g y  $6,874 \pm 1,469$  U/g respectivamente. El tercero de ellos es la CPO modificada con grupos tiol unida covalentemente a Eupergit activado con maleimida, el cual presenta una actividad específica de  $201 \pm 48$  U/g.

El número de estrategias de inmovilización probadas en este trabajo nos permite concluir que la principal limitante para el tratamiento químico de dicha enzima incluyendo la inmovilización, es la carencia de residuos de aminoácidos reactivos bajo condiciones de estabilidad de la cloroperoxidasa y con una ubicación adecuada.



## ABSTRACT

Due to its ability to catalyze various types of reactions (catalase, halogenase, peroxigenase and peroxidase) the chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago* is an enzyme of environmental and industrial interest. The use of this enzyme on a large scale has been slowed inter alia by lack of a recyclable CPO-based biocatalyst which can be obtained through immobilization. The main impediment to the covalent immobilization of chloroperoxidase is its instability at pH values above 7, proteins immobilization is mostly done through nucleophilic reactions which are favored at alkaline pH.

In this work, four strategies were designed for the covalent immobilization of chloroperoxidase based on maintaining free the access to the active site and perform immobilization via a chemical reaction whose optimal conditions are compatible to chloroperoxidase stability conditions.

Activated carriers were generated with high density of functional groups and simple methods for their characterization, which may be useful in the immobilization of other enzymes.

With the immobilization strategies outlined in this paper, it was possible to obtain 3 chloroperoxidase-based biocatalysts. Two of them due to a non-covalent interaction with a high specific activity: immobilized CPO on diazonium ions-activated Eupergit and immobilized CPO on glutaraldehyde-activated Eupergit, with a specific activity of  $18,205 \pm 5,480$  U/g and  $6,874$  U/g respectively. The third of them is modified CPO with thiol groups covalently linked to maleimide-activated Eupergit which has a specific activity of  $201 \pm 48$  U/g.

The number of immobilization strategies tested in this work allows us to conclude that the main constraint for the chemical treatment of the enzyme including its immobilization, is the lack of amino acid residues reactive under conditions of stability of chloroperoxidase and with a suitable location.



# ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN .....	1
2.	ANTECEDENTES .....	3
2.1.	LA CLOROPEROXIDASA .....	3
2.1.1.	Estructura.....	3
2.1.2.	Clasificación enzimática.....	4
2.1.3.	Actividad catalítica en <i>Caldariomyces fumago</i> .....	6
2.1.4.	Actividad catalítica <i>in vitro</i> .....	7
2.1.5.	Estabilidad.....	11
2.2.	INMOVILIZACIÓN.....	14
2.2.1.	Aspectos generales.....	14
2.2.2.	Inmovilización de la CPO.....	16
2.2.3.	El Eupergit® C como soporte.....	19
3.	HIPÓTESIS.....	20
4.	OBJETIVOS.....	20
4.1.	OBJETIVO GENERAL .....	20
4.2.	OBJETIVOS PARTICULARES.....	20
5.	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL .....	21
6.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
6.1.	MATERIALES.....	23
6.2.	CARACTERIZACIÓN DE LA CLOROPEROXIDASA .....	23
6.2.1.	Concentración.....	23
6.2.2.	Pureza.....	24
6.2.3.	Actividad.....	24
6.3.	MODIFICACIÓN DE LA CLOROPEROXIDASA.....	24
6.3.1.	Modificación de tirosinas con tetranitrometano.....	24
6.3.2.	Modificación de lisinas con ácido ditiopropanoico	
	25	
6.4.	ACTIVACIÓN DE EUPERGIT® C CON DIFERENTES GRUPOS FUNCIONALES.....	26
6.4.1.	Activación de Eupergit® C con grupos amino.....	26
6.4.2.	Activación de E-amino con grupos maleimida.....	28
6.4.3.	Activación de E-amino con grupos aldehído.....	29
6.4.4.	Activación de E-arilamino con iones diazonio.....	30
6.5.	INMOVILIZACIÓN DE LA CPO.....	32
6.6.	CARACTERIZACIÓN DE LOS INMOVILIZADOS.....	34
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36
7.1.	SELECCIÓN DE LOS AMINOÁCIDOS BLANCO .....	36
7.2.	MODIFICACIÓN QUÍMICA DE LA CLOROPEROXIDASA .....	39

7.2.1.	Modificación de tirosinas con tetranitrometano.....	39
7.2.2.	Modificación de lisinas con ácido ditiopropanoico .....	41
7.3.	ACTIVACIÓN DE EUPERGIT® C CON DIFERENTES GRUPOS FUNCIONALES.....	44
7.4.	INMOVILIZACIÓN DE LA CPO EN LOS DIFERENTES SOPORTES.....	48
7.4.1.	Inmovilización de CPO-nitro en Eupergit® C.....	48
7.4.2.	Inmovilización de la CPO-tiol en E-maleimida.....	48
7.4.3.	Inmovilización de CPO nativa en E-aldehído.....	50
7.4.4.	Inmovilización en E-diazonio.....	54
7.5.	RESUMEN DE RESULTADOS.....	59
8.	CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	64
9.	REFERENCIAS .....	66
10.	ANEXO.....	71
10.1.	NOMENCLATURA ATÓMICA DE LOS AMINOÁCIDOS.....	71
10.2.	AMINOÁCIDOS IONIZABLES EN LA CPO.....	73

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

4-DDP: 4,4'-ditiopiridina  
4-TP: 4-tiopiridona  
*A. rusticana*: *Armoracia rusticana*  
*C. fumago*: *Caldariomyces fumago*  
*C. histolyticum*: *Clostridium histolyticum*  
CPO: Cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago*  
CPO-nitro: CPO activada con grupos nitro  
CPO-tiol: CPO activada con grupos tiol  
DGF: Densidad de grupos funcionales  
DTT: ditioneitol  
e.m.: equivalentes molares  
E-amino: Eupergit C activado con grupos amino alifáticos  
E-arilamino: Eupergit C activado con grupos aminoaril  
E-diazonio: Eupergit C activado con iones diazonio  
E-glutaraldehído: Eupergit C activado con glutaraldehído  
E-maleimida: Eupergit C activado con grupos maleimida  
MCD: Monoclorodimedona  
MES: ácido 2- (*N*-morfolino) etanosulfónico  
N.D.: No determinado  
Rz: Relación de Reinzhalt  
*S. cerevisiae*: *Saccharomyces cerevisiae*





## 1. INTRODUCCIÓN

La actividad humana ha provocado el deterioro progresivo del medio ambiente. Su recuperación bien podría lograrse con el empleo de herramientas fabricadas por la misma naturaleza, principalmente enzimas, catalizadores biológicos que permiten realizar todo tipo de reacciones químicas bajo condiciones suaves. Cabe mencionar que la utilización de las enzimas en procesos cotidianos requiere de trabajo arduo de investigación a varios niveles: elucidación de los rasgos estructurales que capacitan a las enzimas para catalizar determinado tipo de reacción; diseño del medio de reacción apropiado para obtener altos valores de recambio y rendimiento; generación de biocatalizadores estables y activos bajo las condiciones de operación; diseño de biocatalizadores reciclables; entre otros. La cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago* (CPO) es una enzima con aplicaciones potenciales en áreas como la síntesis química y la biorremediación, que debido a las limitaciones encontradas en su expresión heteróloga (Conesa *et al.*, 2001) se produce cultivando el organismo silvestre en un medio con fructosa como fuente de carbono (Pickard *et al.*, 1991). Las condiciones de producción hacen de la cloroperoxidasa una enzima costosa, por lo que su reutilización es deseable, por ejemplo, uniéndola a un soporte insoluble que permita su fácil recuperación. Hoy en día existen 21 reportes de inmovilización de la CPO, los cuales en general utilizan materiales mesoporosos de sílice como soporte y resultan en bajas cargas y/o alta inactivación de la enzima. Si bien se cuenta con algunas metodologías que permiten obtener inmovilizados de CPO con alta actividad específica consideramos necesario el diseño racional de una estrategia para la inmovilización de la cloroperoxidasa, basada en el conocimiento empírico de su inmovilización y su estructura tridimensional, en un soporte adecuado para la inmovilización covalente. En este proyecto proponemos la inmovilización de la CPO a través de residuos de aminoácidos alejados del acceso al sitio activo y que sean reactivos bajo condiciones de estabilidad de la enzima, utilizando como soporte Eupergit® C. Este último es un soporte acrílico muy estable química y mecánicamente que posee características idóneas para la inmovilización covalente de una enzima.



## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. La cloroperoxidasa

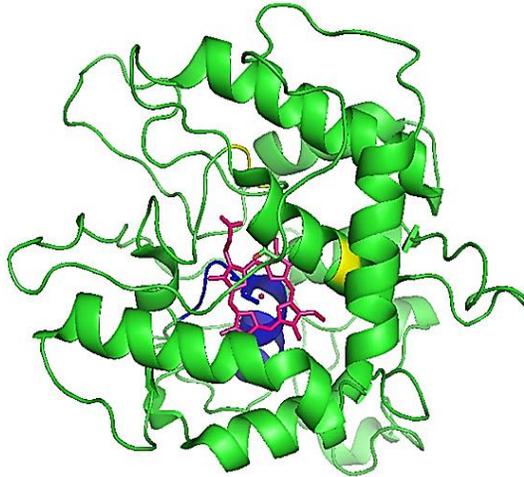
La cloroperoxidasa es una haloperoxidasa hemo-tiolada producida extracelularmente por *C. fumago*.

A la fecha es la enzima de su tipo mejor caracterizada, se conoce su punto isoeléctrico (4.0), masa molecular (42 kDa), ciclo catalítico y estructura cristalográfica. Cabe mencionar que esta es una enzima glicosilada, cuya variación en el grado de glicosilación (20-30%) da lugar a distintas isoenzimas (Hofrichter *et al.*, 2006).

#### 2.1.1. Estructura

El gen de la CPO codifica para una proteína de 373 residuos de aminoácidos (Nuell *et al.*, 1987), que es sometida a diversas modificaciones postraduccionales (remoción de aminoácidos en los extremos N (péptido señal) y C-terminal, glicosilación y ciclación del ácido glutámico N-terminal) resultando en una enzima catalíticamente activa de 299 residuos de aminoácidos (Kenigsberg *et al.*, 1987).

De acuerdo con la estructura cristalográfica reportada (Sundaramoorthy *et al.*, 1995) el plegamiento de la CPO comprende ocho  $\alpha$ -hélices, tres hélices cortas y un par  $\beta$ . Dicha estructura conforma dos dominios, N-terminal y C-terminal, con el grupo hemo intercalado entre ellos (Figura 1).



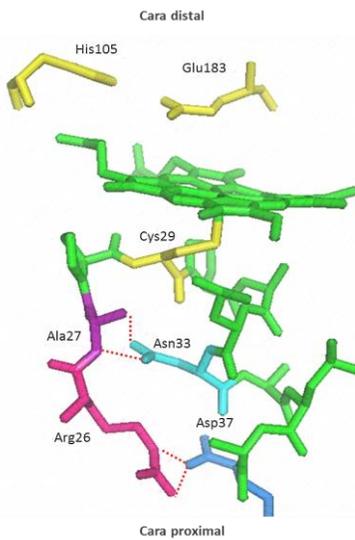
**Figura 1. Estructura cristalográfica de la CPO.** Ocho  $\alpha$ -hélices, tres hélices cortas y un par  $\beta$ , formando dos dominios N- y C-terminal con el grupo hemo intercalado entre ambos. (Imagen adaptada de Sundaramoorthy *et al.*, 1995).

El posicionamiento del grupo hemo es mantenido debido a dos tipos de interacciones: hidrofóbicas y puentes de hidrógeno. En la cara proximal del hemo, la formación de cuatro puentes de hidrógeno en el polipéptido de los residuos 26-37 provee un andamio rígido para la interacción del hierro presente en el grupo hemo con el átomo de azufre de la cisteína 29 (Figura 2). Mientras que los propionatos interactúan con los átomos de la cadena principal, primordialmente con el asa entre el Glu104 y la Ser110. El Glu183 es el aminoácido involucrado íntimamente con el ciclo catalítico, posicionado en la cara distal del hemo, directamente adyacente al sitio de unión del peróxido. La orientación correcta de dicho aminoácido se debe a puentes de hidrógeno con la His105, que a su vez es orientada por el Asp106 (Sundaramoorthy *et al.*, 1995).

### 2.1.2. Clasificación enzimática

Debido al desarrollo de tecnología de alto rendimiento, a la fecha se cuenta con una gran cantidad de información acerca de la estructura, función y evolución de las enzimas, por lo que se han propuesto varios esquemas de clasificación para dichas macromoléculas. Estos esquemas siguen principalmente dos criterios de clasificación, su estructura o su función, y el proceso de clasificación es realizado por un algoritmo que genera medidas de similitud o diferencia entre las enzimas, ya sea automáticamente o bien auxiliado por un experto. La clasificación estructural clasifica a las proteínas de acuerdo a su similitud en su estructura primaria o terciaria. Entre las bases de datos que utilizan este criterio se encuentran la Protein Families database (Pfam), la Structural Classification of Proteins (SCOP), la Class/Architecture/Topology/Homology (CATH) y la Fold Classification based on Structure-Structure Alignment of Proteins (FSSP).

Por otro lado las clasificaciones funcionales agrupan a las enzimas de acuerdo a su mecanismo de reacción, su participación en rutas metabólicas, función y localización celular. Una representante de los esquemas de clasificación es la Enzyme Commission (EC), que agrupa a las enzimas de acuerdo a la reacción que catalizan en seis categorías principales: oxidoreductasas (EC 1), transferasas (EC 2),



**Figura 2. Ambiente del sitio activo de la CPO.** El grupo hemo se encuentra posicionado debido su coordinación con la Cys29 (aminoácido a su vez sostenido por un andamio rígido proporcionado por la formación de puentes de hidrógeno en el polipéptido 26-37) y por interacciones hidrofóbicas de los propionatos con la cadena principal del polipéptido 104-110 (no mostrado). El ciclo catalítico requiere de la interacción Glu183-Hemo-peróxido. El Glu183 es orientado correctamente por su interacción con la His105 que a su vez es orientada por el Asp106, este último no se muestra en la figura (Imagen adaptada de Sundaramoorthy *et al.*, 1995).

hidrolasas (EC 3), liasas (EC 4), isomerasas (EC 5) y ligasas (EC 6). Realiza una posterior subclasificación de acuerdo a mecanismos de reacción, reactivos y productos y especificidades, finalmente asigna un número EC a cada enzima (Ouzounis *et al.*, 2003).

La organización interna de las peroxidases basada en las reglas de la EC es complicada, ya que las peroxidases utilizan distintos donadores de electrones y distintos modos catalíticos. Además, las enzimas de este grupo poseen arquitecturas moleculares muy distintas entre sí. Por lo que se agrupan de acuerdo a su rasgo estructural más significativo, el contenido de grupo hemo, en hemoperoxidasas y peroxidases sin grupo hemo. Filogenéticamente todas las hemoperoxidasas pueden ser divididas en dos superfamilias y tres familias (Zámoký and Obinger, 2010). La superfamilia de las Peroxidasa-ciclooxigenasas, la superfamilia de las Peroxidasa-catalasas y las familias de las Di-hemoperoxidasas, las hemoperoxidasas tipo Dyp y las hemo haloperoxidasas. Por su parte la familia de las Peroxidasa-catalasas se encuentra dividida en tres clases: Clase I, peroxidases intracelulares; Clase II, peroxidases secretadas por hongos y Clase III, peroxidases secretadas por plantas (Welinder, 1992).

La cloroperoxidasa de *C. fumago* se clasifica dentro de la familia de las hemo haloperoxidasas. Si bien estas enzimas son generalmente secretadas por hongos, debido a sus diferencias estructurales y las reacciones que catalizan no pueden incorporarse a la Clase II. Además estas enzimas poseen una cisteína proximal como ligando al grupo hemo, y un ácido glutámico distal que participa de forma importante en el ciclo catalítico, en lugar de la histidina proximal y la arginina e histidina distales altamente conservadas en las peroxidases de las clases I, II y III.

De acuerdo a la EC, la CPO se encuentra en la categoría de oxidoreductasas, específicamente es una peroxidasa (EC 1.11), lo que significa que es una oxidoreductasa que utiliza peróxido de hidrógeno o hidroperóxidos orgánicos como aceptores finales de electrones mientras oxida diversos sustratos, su número es EC 1.11.1.10.

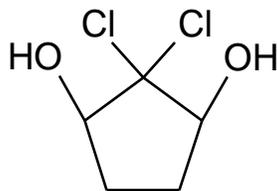
Hasta el año 2003 la cloroperoxidasa era la única peroxidasa hemotiolada caracterizada a nivel proteico, hoy en día pueden encontrarse alrededor de 100 secuencias relacionadas en bases de datos nucleotídicas (Hofrichter *et al.*, 2010).

### 2.1.3. Actividad catalítica en *Caldariomyces fumago*

*C. fumago* (*Leptoxyphium*) es un hongo ascomiceto que coloniza la superficie de las plantas y posee una pigmentación oscura en su pared celular, por lo que forma parte de los denominados hongos tiznados. La cloroperoxidasa fue la primera enzima halogenante dada a conocer, por Hager en 1966, quien reportó su participación en la biosíntesis de la caldariomicina (Figura 3) en *C. fumago*. La función anterior fue asumida al observar su capacidad de clorar a los intermediarios de la caldariomicina, sin embargo esto no ha sido probado, encontrándose como principal contradicción el hecho de que la caldariomicina sea un producto intracelular y la cloroperoxidasa extracelular (van Pée, 2001).

Por otro lado aunque la función de los procesos de cloración extracelular permanece sin ser clara, la literatura soporta la hipótesis de que la producción de especies reactivas de cloro fuera de la célula juega un papel importante en el antagonismo microbiano (Bengtson *et al.*, 2009). La mayoría de las haloperoxidasas identificadas *in silico* son generadas por organismos asociados a plantas vivas o materia de plantas en descomposición, ambientes que son caracterizados por la competencia de recursos mediante antibióticos. La CPO es una representante de estas enzimas, ya que es una enzima halogenante extracelular, además de ser producida por un ascomiceto parásito de plantas.

Evalutando la participación de la cloroperoxidasa en el antagonismo microbiano de *C. fumago* podemos decir que dicha enzima es secretada en cantidades considerables, generando HOCl, un oxidante altamente reactivo que puede atacar esencialmente cualquier grupo oxidable como tioles, centros hierro-azufre, grupos hemo y ácidos grasos insaturados, causando estrés oxidativo. La concentración de precursores de la actividad enzimática, cloro y peróxido, no ha sido evaluada en el ambiente natural, sin embargo mediante estudios de rayos X de hojas en descomposición se ha encontrado la presencia de puntos con altas concentraciones de organoclorados dispersos en áreas de baja concentración de los mismos compuestos, que pueden atribuirse a *C. fumago* (Bengtson *et al.*, 2009).



**Figura 3. Caldariomicina.** Antibiótico clorado en cuya síntesis pudiera participar la CPO.

### 2.1.4. Actividad catalítica *in vitro*

*In vitro*, la cloroperoxidasa es una enzima versátil, es decir, es capaz de catalizar varios tipos de reacciones utilizando una amplia gama de sustratos.

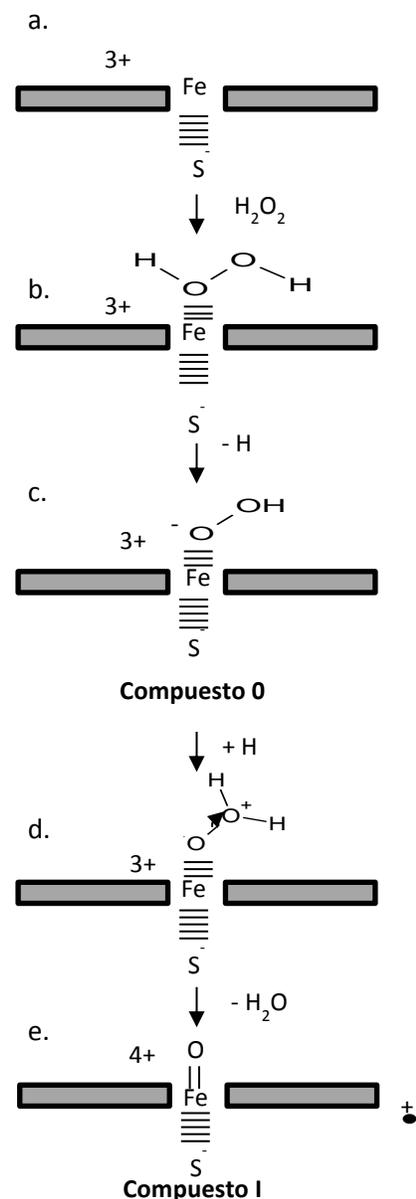
El ciclo catalítico propuesto para la cloroperoxidasa se basa en la identificación de algunos de sus intermediarios catalíticos, el Compuesto 0, el Compuesto I y el Compuesto II (Kühnel *et al.*, 2010; Stone *et al.*, 2005; Stone *et al.*, 2006), y en el ciclo catalítico de la bien estudiada peroxidasa de rábano blanco (HPR, por sus siglas en inglés) (Wagenknecht y Woggon, 1997).

El Compuesto I es la primera especie enzimática altamente oxidante formada en el ciclo catalítico de la cloroperoxidasa, su formación se debe a la reacción de la enzima en estado basal (reducida,  $\text{Fe}^{3+}$ , Figura 4a) con una molécula de peróxido.

Se sugiere la unión de una molécula de peróxido al  $\text{Fe}^{3+}$  (Figura 4b), la cual puede ser requerida para que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  sea lo suficientemente ácido para ser desprotonado por el Glu83, dando paso al Compuesto 0 (Figura 4c).

El protón tomado por el Glu83 es devuelto al Compuesto 0, pero en el oxígeno distal (Figura 4d), lo que conduce al rompimiento heterolítico del enlace O-O del peróxido y por tanto a la eliminación del oxígeno distal como una molécula de agua y generación del Compuesto I (Figura 4e). Dicha reacción requiere que el grupo hemo done dos electrones, provocando el paso del  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{4+}$  y la generación de un radical libre deslocalizado en la porfirina (Ortiz de Montellano, 2001).

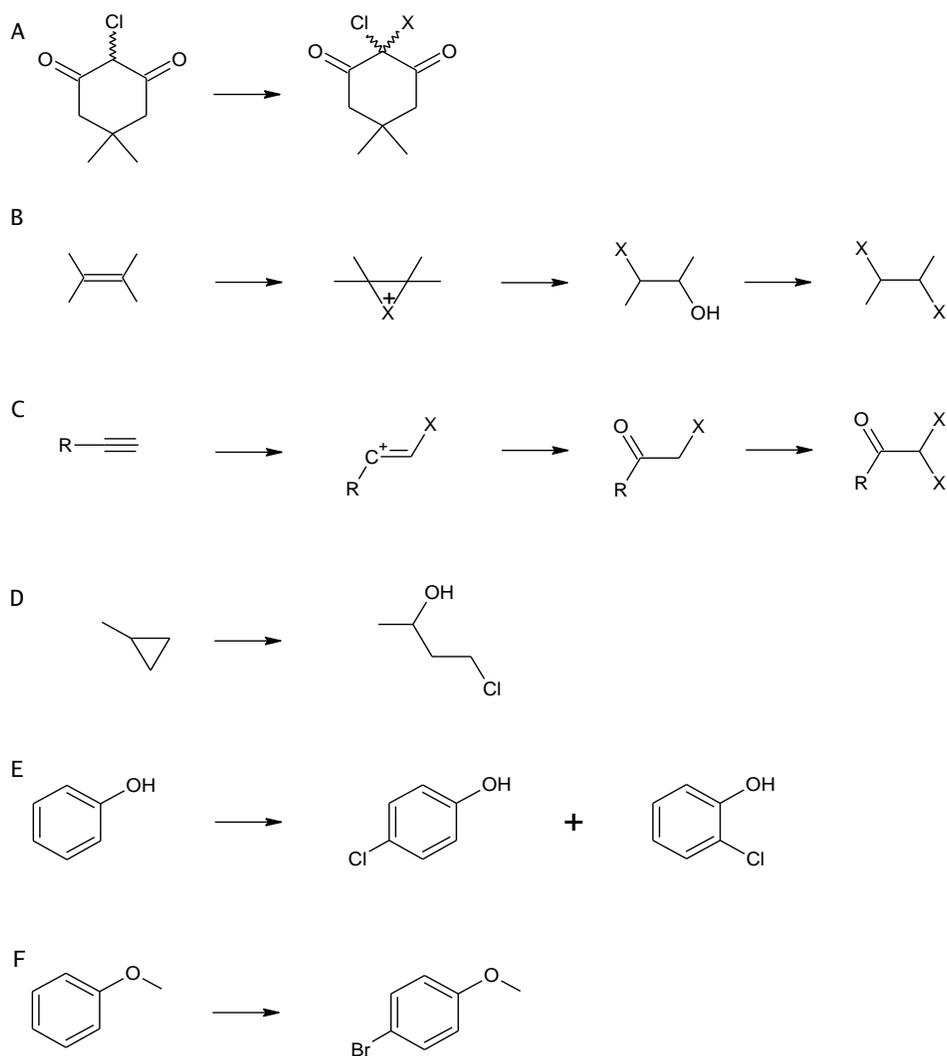
La reducción de dos electrones del Compuesto I puede seguir cuatro rutas, cada una de ellas da lugar a una actividad catalítica distinta: halogenasa, peroxigenasa, peroxidasa y catalasa. La composición y pH del medio son los factores que determinan la actividad catalizada por la enzima. Cada actividad es analizada a manera más profunda en los siguientes apartados.



**Figura 4. Activación de la CPO con  $\text{H}_2\text{O}_2$ .** La actividad catalítica de la cloroperoxidasa requiere la formación del Compuesto I por oxidación de la cloroperoxidasa nativa con una molécula de peróxido. a) grupo hemo en la CPO nativa, b) interacción hemo-peróxido de hidrógeno, c) Compuesto 0, d) rompimiento heterolítico del enlace O-O y e) Compuesto I (Imagen adaptada de Wagenknecht y Woggon, 1997).

### Actividad halogenasa

La cloroperoxidasa cataliza la síntesis peroxidativa del enlace halógeno-carbono en un aceptor adecuado, utilizando como agentes halogenantes a los iones  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$  o  $\text{I}^-$ . El ion  $\text{F}^-$  no es activado por la CPO, de manera contraria, dicho ion es un inhibidor de la cloroperoxidasa (Hager *et al.*, 1966). Se ha propuesto que el Compuesto I reacciona con el ion haluro ( $\text{X}^-$ ) formando un intermediario hipotético, el Compuesto X, ( $\text{Fe}^{3+}\text{-O-X}$ ).



**Figura 5. Sustratos halogenados por la cloroperoxidasa.** X: ion haluro. A, bromación y cloración de diacetonas como la monoclorodimedona; B, halogenación de alquenos; C, halogenación de alquinos; D, bromación y cloración de cicloalcanos; E, cloración de fenol y F, bromación de anisol (Imagen adaptada de Hofrichter *et al.*, 2006).

Incluso se ha identificado una ruta de posible acceso formada por cuatro sitios de unión de iones haluro que va de la superficie al hemo a través de un canal angosto distinto al canal de acceso principal al grupo hemo (Hofrichter *et al.*, 2010).

Existe un debate entre si el Compuesto X es lo suficientemente estable para catalizar halogenaciones específicas o bien se descompone rindiendo cloroperoxidasa en estado basal y ácido hipohaloso (HOX) como agente halogenante (Hofrichter *et al.*, 2006).

La hipótesis de que la enzima produce ácido hipohaloso como agente halogenante explicaría la carencia de especificidad y estereoselectividad de sustrato en las reacciones de halogenación y la rápida inactivación de CPO, debido a la reacción enzima-ácido hipohaloso (van Pée, 2001). Aunque no deben ignorarse reportes de halogenaciones selectivas en sustratos como glicanos y esteroides (Hofrichter *et al.*, 2010).

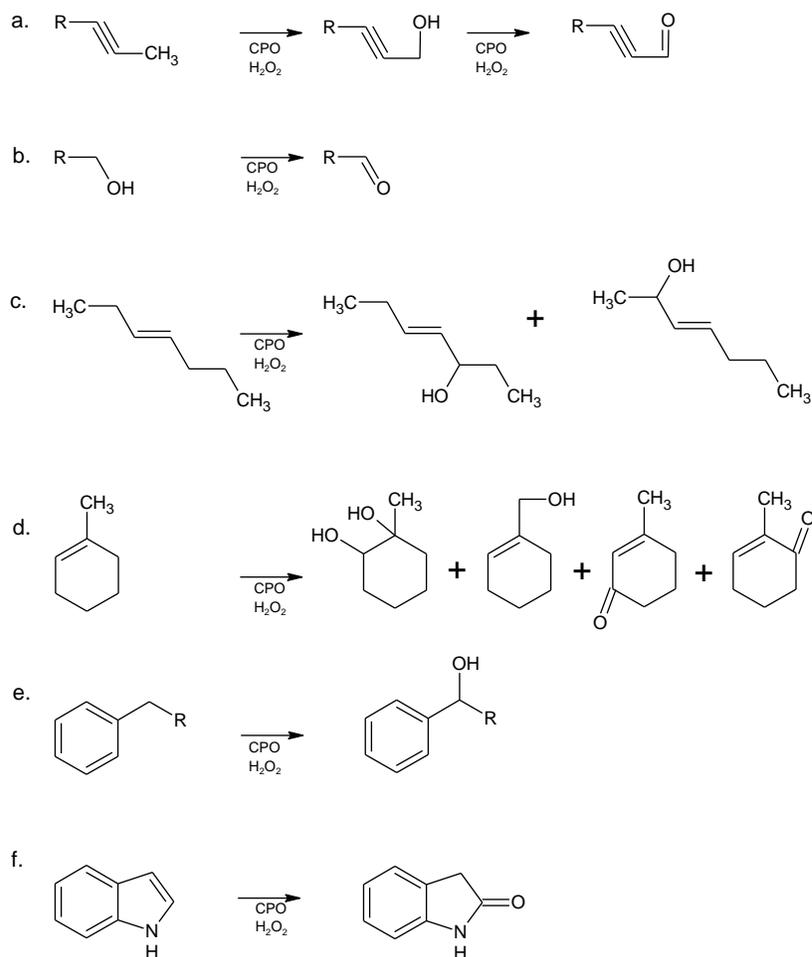
El pH óptimo de la reacción de halogenación se encuentra alrededor de 2.5 y el pH máximo al que puede ocurrir es de 4. Una gran variedad de compuestos orgánicos son susceptibles a halogenación catalizada por CPO, por ejemplo: acetonas alicíclicas, fenoles, flavonoides, ácidos aromáticos, PAH's, bifenoles, ácidos carboxílicos de cadena corta, alquenos, alquinos, entre otros (Figura 5) (Hofrichter and Ullrich, 2006).

### *Actividad Peroxigenasa*

La reducción de dos electrones del Compuesto I derivada de la transferencia del oxígeno del oxo-ferril a una molécula de sustrato por contacto directo, se conoce como actividad peroxigenasa o tipo citocromo P450.

La inserción de oxígeno regio- y estereoselectiva a una gran variedad de sustratos hacen de la cloroperoxidasa una enzima con gran potencial en la síntesis orgánica.

La cloroperoxidasa cataliza la oxidación de carbonos activados en sustratos como: 2-alquinos, que son oxidados a aldehídos pasando por un intermediario alcohol; alcoholes primarios, oxidados a sus correspondientes aldehídos; alquenos alifáticos y cíclicos, oxidados de forma altamente estereoselectiva siendo mejores sustratos moléculas pequeñas donde el doble enlace se encuentra a no más de dos átomos del carbono terminal; compuestos aromáticos con sustitución alifática, como el tolueno, donde la cloroperoxidasa oxida al carbono de la cadena alifática más cercano al anillo aromático; indol oxidado a oxoindol; etc. (Figura 6).



**Figura 6. Sustratos peroxigenados por la cloroperoxidasa.** a) 2-alcinos, b) alcoholes primarios, c) alquenos alifáticos, d) alquenos cíclicos, e) aromáticos sustituidos con cadenas alifáticas y f) indol (Imagen adaptada de Dembitsky, 2003).

En la cloroperoxidasa también ha sido observada la capacidad de catalizar epoxidación enantioselectiva en *cis*-alquenos. Además de la sulfoxidación enantioselectiva en sustratos como el tioanisol y los  $\beta$ -carbonil sulfuros, observándose mayor afinidad por moléculas con sustituyentes de tamaño pequeño (Figura 6).

Todas estas reacciones tienen un pH óptimo de 5-5.5 a temperatura ambiente.

### *Actividad peroxidasa*

Se conoce como actividad peroxidasa a la reducción del Compuesto I por dos reacciones de un electrón. En la primera de ellas la oxidación de una molécula de sustrato permite el paso del Compuesto I al Compuesto II, en

este último el hierro continúa en estado 4+ y la porfirina ha pasado a estado reducido. La reacción del Compuesto II con una segunda molécula de sustrato reduce el hierro 4+ a 3+, regenerándose así la CPO. El sustrato típico de esta reacción es el fenol, además de compuestos fenólicos y aminas aromáticas, generando sus radicales correspondientes que tienden a polimerizar y precipitar (a un pH óptimo de 5). Esta reacción es de gran interés en el área de la biorremediación, para la remoción de compuestos fenólicos y aminas aromáticas.

### *Actividad catalasa*

La actividad catalasa es una actividad lateral que compite por el peróxido con el resto de las reacciones características de la cloroperoxidasa. Dicha reacción requiere de dos moléculas de peróxido, la primera genera el Compuesto I y libera una molécula de agua o el alcohol correspondiente, posteriormente una segunda molécula de peróxido reacciona con el Compuesto I liberando oxígeno molecular y agua o el alcohol respectivo.

El peróxido de hidrógeno, etil hidroperóxido y metil hidroperóxido presentan constantes de Michaelis ( $k_M$ ) de 20, 213 y 145 mM y eficiencias catalíticas ( $k_{cat}/k_M$ ) de  $1.7 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^4$  y  $1.5 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Por su parte, el tert-butil hidroperóxido y cumil hidroperóxido a pesar de formar el Compuesto I han demostrado no ser sustratos de la actividad catalasa (Murali y Hager, 2001).

### **2.1.5. Estabilidad**

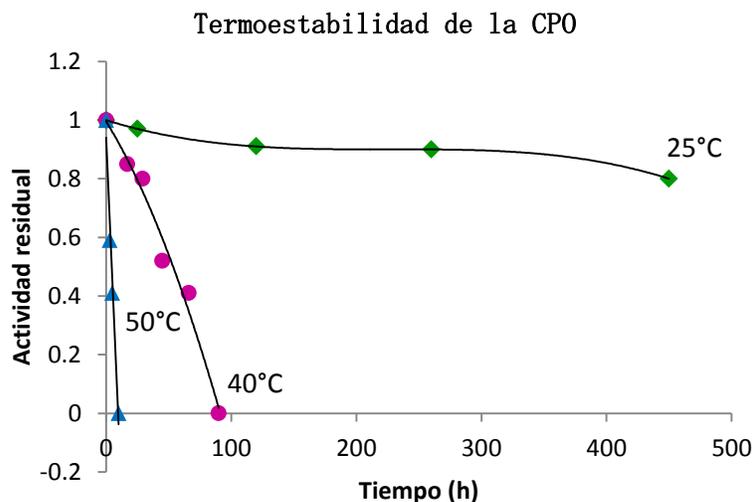
La cloroperoxidasa ha sido estudiada para un amplio rango de aplicaciones, desde la síntesis de químicos finos hasta detoxificación de contaminantes ambientales. Sin embargo, su uso a nivel industrial es obstaculizado por su alto costo y su inestabilidad operacional. La cloroperoxidasa es inestable a temperaturas por arriba de los 40°C, a temperatura ambiente es inestable a pH superior a 6.5 y se autooxida durante el ciclo catalítico.

La estabilidad operacional de una enzima es evaluada en términos de su TTN (Total Turnover Number, número de recambio total), que son los moles de producto generados por mol de biocatalizador durante su vida útil. Por ejemplo, se ha observado que la cloroperoxidasa tiene un TTN de 860,000

en la oxidación de indol a oxoindol y de 250,000 para la oxidación de tioanisol, valores que son destacables respecto a otras peroxidases. Como referencia 10,000 es el valor mínimo para justificar el uso del biocatalizador en un proceso de síntesis y  $1 \times 10^6$  para un proceso a gran escala. Estos valores están sujetos a modificación, de acuerdo al proceso a evaluar (Longoria *et al.*, 2010).

### *Estabilidad a temperatura*

La cloroperoxidasa tiende a perder su actividad catalítica de forma acelerada, aún a temperaturas moderadas (mayores a 40°C). De acuerdo a lo reportado por Lifei Zhi y colaboradores en el 2007, cuando la CPO es incubada en una solución amortiguadora a 25°C la actividad enzimática perdida es de sólo el 14% después de 432 h. Sin embargo al aumentar la temperatura a 40, 50 y 60°C la enzima pierde casi por completo su actividad después de 90 h, 10 h y 50 min respectivamente. Un ejemplo de dicho comportamiento puede observarse en las curvas de termoestabilidad mostradas en la Figura 7.



**Figura 7. Termoestabilidad de la cloroperoxidasa.** El aumento de temperatura por arriba de 40°C provoca la aceleración en la pérdida de actividad enzimática de la CPO (Lifei *et al.*, 2007).

Los mismos autores analizan el aumento de estabilidad de la estructura terciaria de la CPO, conferida por algunos aditivos surfactantes y polihidroxilados adecuados a cierta temperatura. Por ejemplo, AOT (dioctil sulfosuccinato de sodio), PEG200 y glicerina son buenos estabilizadores de la CPO a 25°C; PEG200, trealosa y gumsugar a 40°C, PEG200 y glicerina a 50°C y PEG200 y trealosa a 60°C.

La sensibilidad térmica de la CPO es un gran inconveniente para su uso a gran escala, ya que se requiere de temperaturas mayores con la

finalidad de aumentar la velocidad de reacción y la solubilidad de los reactivos y evitar la contaminación microbiológica.

### *Estabilidad ante peróxido de hidrógeno*

La desactivación de las peroxidasas por  $H_2O_2$  es un hecho bien conocido. En la CPO, como en otras peroxidasas, la transferencia de un electrón por parte de un sustrato reductor al Compuesto I da lugar al Compuesto II. El  $H_2O_2$  y el sustrato reductor compiten por el Compuesto II, cuando este último reacciona con el peróxido de hidrógeno se forma un compuesto altamente reactivo, el Compuesto III (Valderrama *et al.*, 2002).

Las posibles formas de descomposición del Compuesto III son reacciones que podrían explicar la inactivación de la cloroperoxidasa: reducción por ataque a aminoácidos circundantes y oxidación de la porfirina. Esta última forma conduciría a la degradación del grupo hemo por la apertura del anillo tetrapirrólico y la liberación del hierro. El hierro en solución genera radicales hidroxilo por medio de reacciones de Fenton, que son especies altamente oxidantes e inactivan rápidamente a la enzima (Elovson *et al.*, 2007).

De acuerdo a estudios de espectrometría de masas y dicroísmo circular se ha determinado que si bien existe oxidación de la estructura proteica (Met82, Met174, Trp246 y 14% de las Thr presentes) ésta no se encuentra relacionada con la pérdida de actividad de la cloroperoxidasa, más bien se observa una pérdida de actividad directamente proporcional a la destrucción del grupo hemo la cual está acompañada de la oxidación de la Cys29, ligando del grupo hemo a la estructura proteica (Elovson *et al.*, 2007 y Ayala *et al.*, 2011).

### *Estabilidad a pH*

La incubación de la cloroperoxidasa a pH por arriba de 7 provoca su inactivación de forma irreversible. De acuerdo con el estudio espectrométrico realizado por Lambier y Dunford en 1982, la cloroperoxidasa sufre dos transiciones independientes durante su incubación en una solución con pH creciente, dando lugar a la primera y segunda formas alcalinas.

La primera forma alcalina se forma a pH 7 y es estable hasta pH 10. La comparación del espectro óptico de la primera forma alcalina con el espectro del complejo CPO-imidazol sugiere que el grupo hemo permanece ligado al átomo de azufre de la Cys 29 y que el cambio observado se debe al cambio de estado de alto a bajo spin. Es decir, el grupo hemo

pentacoordinado en la CPO nativa pasa a hexacoordinado, siendo probablemente el sexto ligando un residuo de histidina. La cinética de formación de esta forma indica la ionización de  $4 \pm 1$  residuos de aminoácidos, esta es una transición irreversible.

La segunda forma alcalina se forma a pH por arriba de 10 y es desencadenada por la ionización de un residuo de aminoácido, esta transformación es reversible mientras más corto sea el tiempo de incubación, de hecho se considera el primer paso reversible en el proceso de disrupción del hemo. En esta forma se encuentra el grupo hemo parcialmente abierto en una mezcla de estados de bajo y alto spin.

## 2.2. Inmovilización

El uso de enzimas en procesos cotidianos requiere la generación de biocatalizadores con alta actividad específica y robustos a un costo bajo. Con la finalidad de cumplir con esta demanda se han desarrollado técnicas de ingeniería genética, modificación química e inmovilización que forman parte de lo que se conoce como tecnología enzimática.

### 2.2.1. Aspectos generales

La inmovilización es una técnica que permite integrar una enzima a un material no catalítico, facilitando su manejo y recuperación. El material no catalítico debe cumplir ciertas características, como ser insoluble, inerte y estable a altas temperaturas (Longoria *et al.*, 2010).

La inmovilización permite el uso de más de una enzima en un sistema, frecuentemente mejora la estabilidad operacional y de almacenamiento de la enzima, además de ciertas ventajas económicas, ecológicas y toxicológicas derivadas de evitar el uso de distintos solventes utilizados para separar la enzima de la mezcla de reacción (Sheldon, 2007).

Generalmente el proceso de inmovilización reduce la actividad catalítica, lo que puede ser debido a muchos factores como restricción de la flexibilidad, limitaciones de transferencia de masa, cambios en la afinidad de sustratos, bloqueo del sitio activo, formación de multicapas, entre otros. El éxito de la inmovilización es variable y depende entre otras cosas de las características del material y la enzima, y la interacción entre ellos y el sustrato (Longoria *et al.*, 2010).

Una de las clasificaciones de los métodos de inmovilización encontradas en la literatura los agrupa en tres categorías: 1) unión a un soporte previamente fabricado, categoría que algunos autores suelen diferenciar en dos sub-categorías a) adsorción o deposición no covalente y b) unión

covalente); 2) atrapamiento en una matriz polimérica, cápsula o membrana y 3) entrecruzamiento. Cabe mencionar que una estrategia de inmovilización puede combinar más de una categoría. Estos métodos tienen como objetivo obtener los beneficios de la inmovilización manteniendo la actividad catalítica. Sin embargo, a pesar de la amplia gama de métodos disponibles, hasta el momento no se cuenta con un método genérico (Cao, 2005). Actualmente dichos métodos siguen dos tendencias, la primera es el uso de nuevos reactivos y soportes, y la segunda, el uso del conocimiento acerca la secuencia de la proteína, estructura tridimensional y mecanismo de reacción (Bornscheuer, 2003).

### *Unión a un soporte*

La unión a un soporte prefabricado puede ser por interacción débil (como interacciones hidrofóbicas y de van der Waals), iónica o covalente, cuya fuerza de unión aumenta en ese orden. La unión física generalmente es muy débil para mantener la enzima fija bajo condiciones industriales, como altas concentraciones de reactivos y productos y alta fuerza iónica. De manera opuesta la unión covalente es más fuerte e impide el lixiviado de la enzima, lo que también tiene como desventaja que si la enzima es desactivada, tanto la enzima como el soporte (muchas veces costoso) se vuelven inutilizables.

### *Encapsulamiento*

Es la inclusión de una enzima en una matriz polimérica o un dispositivo membranoso que impida la fuga de enzima, la restricción física es débil, por lo que frecuentemente se requiere de unión covalente. A diferencia del método de unión a un material prefabricado, en el encapsulamiento el material es sintetizado en presencia de la enzima. En cualquiera de los métodos mencionados la enzima puede unirse a la superficie interna o externa del material.

### *Entrecruzamiento*

Agregados o cristales de enzimas son entrecruzados por medio de agentes bifuncionales, para rendir macropartículas libres de soporte, llamados por sus siglas en inglés CLEA's y CLEC's, Cross-Linked Enzyme Aggregates y Cross-Linked Enzyme Crystals respectivamente.

El entrecruzamiento es un método novedoso que permite tener mayor cantidad de enzima por unidad de volumen, a diferencia de los métodos de

inmovilización comunes donde el soporte ocupa en promedio del 90 al 99% del biocatalizador. Su costo de producción puede ser menor debido al ahorro del soporte, aunque también puede presentar serios problemas de difusión (Cao, 2005).

### 2.2.2. *Inmovilización de la CPO*

Como se mencionó en la introducción, a la fecha existen 21 reportes de inmovilización de la CPO, además de los trabajos no publicados realizados en este y otros laboratorios (Aburto *et al.*, 2005; Águila *et al.*, 2011; Aoun *et al.*, 1998; Bakker *et al.*, 2000; Bayramoglu *et al.*, 2008; Borole *et al.*, 2004; Bruns y Tiller, 2005; de Hoog *et al.*, 2009; Han *et al.*, 2002; Hartmann, 2005; Hartmann y Streb, 2006; Jung *et al.*, 2008; Jung *et al.*, 2009; Kadima y Pickard, 1990; Montiel *et al.*, 2007; Petri *et al.*, 2004; Terrés *et al.*, 2008; van de Velde *et al.*, 2000; van de Velde *et al.*, 2001; Veselova *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009).

En la Tabla 1 se enlistan aquellos reportes que proporcionan parámetros que permiten su comparación, en la mayoría de los casos se reporta la pérdida de actividad catalítica de hasta el 88% y/o una carga baja. Las técnicas de inmovilización reportadas van desde el uso de métodos típicos como la adsorción física en materiales mesoporosos, vidrio, talco, entre otros, hasta métodos más elegantes como el atrapamiento de CLEA's en materiales mesoporosos.

Dentro de los métodos más exitosos para la inmovilización de la cloroperoxidasa (resaltados en la Tabla 1) se encuentran aquellos que logran un biocatalizador con alta actividad específica, 3 de ellos obtenidos por adsorción y 4 por unión covalente, solamente Han y colaboradores en el 2002 reportan la desorción de la enzima después de 12 días de almacenamiento.

Cabe mencionar que en nuestro grupo de investigación se ha intentado, sin éxito, reproducir el trabajo de Martin Bakker y colaboradores del año 2000, donde se reporta la copolimerización de la cloroperoxidasa con Hypol 3000 (prepolímero con grupos isocianato) a través de los residuos de azúcar. Nuestros resultados muestran que la enzima pierde cerca del 80% de actividad después de la inmovilización y no el 45% como es reportado. Además el Hypol 3000 es un prepolímero poco comercial y por tanto de difícil de adquisición.

Tabla 1. Reportes de inmovilización de la cloroperoxidasa hasta el 2012.

Método	Soporte	Condiciones de inmovilización	Resultados			Referencia
			Carga (mg/g)	Actividad retenida (%)	Actividad específica (U/g)	
Covalente	Perlas de vidrio con poros de 24 nm activadas con grupos amino.	Adsorción a 25°C y pH 6 por 1-2 h, seguido de entrecruzamiento con glutaraldehído a 25°C y pH 6 por 30 min.	57	13	-	Kadima T. y Pickard M., 1990
	<b>Espuma de poliuretano</b>	<b>Copolimerización a temperatura ambiente y agitación por 1-2 min.</b>	<b>16</b>	<b>55</b>	-	<b>Bakker et al., 2000</b>
	Sílica gel activado con grupos epóxido	Agitación, temperatura ambiente y pH 6.	3	20	-	Petri et al., 2004
	<b>Vidrio sol-gel activado con grupos aldehído con poros de 50, 150 y 250 Å</b>	<b>Reacción en agua por 48 h a 4°C</b>	<b>10 (50 Å) 24 (150 Å) 55 (250 Å)</b>	<b>80</b>	-	<b>Borole et al., 2004</b>
	Microesferas magnéticas de acrílico porosas con núcleos de óxido de hierro y activadas con glutaraldehído.	pH 6 a 15°C	2	58	-	Bayramoglu et al., 2008
	<b>Nanoesferas magnéticas acrílicas con un único núcleo de óxido de hierro activadas con grupos amino</b>	<b>pH 4.75 a temperatura ambiente en presencia de glutaraldehído</b>	<b>16</b>	<b>100</b>	-	<b>Wang et al., 2009</b>
	SBA-15 67 Å	Incubación de CPO silanizada a pH 5 y 4°C durante 4h.	69	66	-	Montiel et al., 2007
	SBA-15 143 Å		172	15	-	
	SG 48-64 Å		41.5	52	-	
	<b>MCF</b>	<b>Adsorción a pH 3.8 y temperatura ambiente durante 1h y posterior entrecruzamiento de la CPO adsorbida</b>	<b>55</b>	<b>84</b>	-	<b>Jung et al., 2009</b>

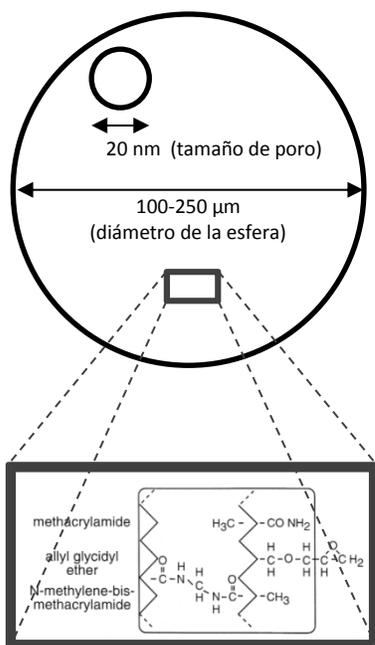
		con glutaraldehído a pH 5 por 24 h.				
Adsorción	Talco calcinado	Agitación a 15°C y pH 6	3	104	-	Aoun <i>et al.</i> , 1998
	Talco		8	61	-	
	MCF 150 Å	Temperatura ambiente y pH 3.4 durante 1 h.	-	-	2.8	Han <i>et al.</i> , 2002
	SBA-16 82 Å		-	-	0.4	
	SBA-15 70 Å		-	-	2.5	
	SBA-15 42 Å		-	-	0.4	
	MCM-48 32 Å		-	-	0.8	
	<b>SBA 15 67 Å</b>	<b>pH 3 y 4°C durante 4h.</b>	<b>151</b>	<b>14</b>	-	Montiel <i>et al.</i> , 2007
	<b>SBA 15 143 Å</b>		<b>158</b>	<b>15</b>	-	
	<b>SG 48-64 Å</b>		<b>84</b>	<b>12</b>	-	

El porcentaje de actividad retenida se define como la razón de la actividad específica de la CPO inmovilizada entre la actividad específica de la CPO soluble multiplicada por 100.

Debido a los antecedentes presentados consideramos necesario el diseño racional de nuevas estrategias para la inmovilización covalente de la cloroperoxidasa. Basadas en: el conocimiento empírico de su inmovilización, generado tanto en nuestro laboratorio como en otros grupos de trabajo; su estructura tridimensional; su estabilidad; y el aprovechamiento de materiales con características idóneas para la inmovilización covalente, como el Eupergit® C.

### 2.2.3. El Eupergit® C como soporte

El Eupergit® C es un soporte acrílico macroesférico de 100-250  $\mu\text{m}$  de diámetro, hecho por copolimerización de N,N-metilen-bis-metacrilamida, glicidil metacrilato, alil glicidil éter y metacrilamida (Figura 8). Presenta alta estabilidad tanto química y como mecánica, siendo estable en un intervalo de pH de 0 a 14 durante 650 ciclos en un tanque agitado.



Posee características idóneas para la inmovilización covalente de una enzima con potencial industrial: Alta densidad de grupos oxirano, 1,000  $\mu\text{mol}_{\text{oxirano}}/\text{g}_{\text{Eupergit C}}$ , lo que le permite una capacidad de carga de 100  $\text{mg}_{\text{proteína}}/\text{g}_{\text{soporte}}$ ; es un material poroso, 20 nm de diámetro, existiendo la posibilidad de incrementar la estabilidad de la enzima inmovilizada dentro de los poros; y se encuentra disponible en cantidades industriales (Boller *et al.*, 2002).

El Eupergit® C ha sido utilizado exitosamente para la inmovilización de muchas enzimas de uso industrial, como la aldolasa de una cepa recombinante de *Escherichia coli* utilizada por Glaxo Wellcome Research (Katchalski-Katzir y Kraemer, 2000).

**Figura 8. Estructura y dimensiones de las macroesferas de Eupergit® C.**

### 3. HIPÓTESIS

La inmovilización de la cloroperoxidasa a través de residuos de aminoácidos apartados del acceso al sitio activo, que sean reactivos bajo las condiciones de estabilidad de la enzima en un soporte con alta densidad de grupos funcionales, permitirá la obtención de un biocatalizador con alta actividad específica.

### 4. OBJETIVOS

#### 4.1. Objetivo general

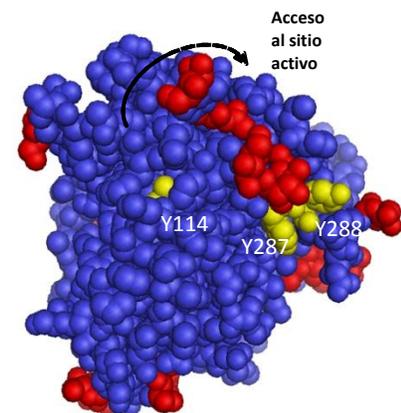
Diseñar una estrategia de inmovilización covalente que permita obtener un biocatalizador en base a cloroperoxidasa con una alta actividad específica.

#### 4.2. Objetivos particulares

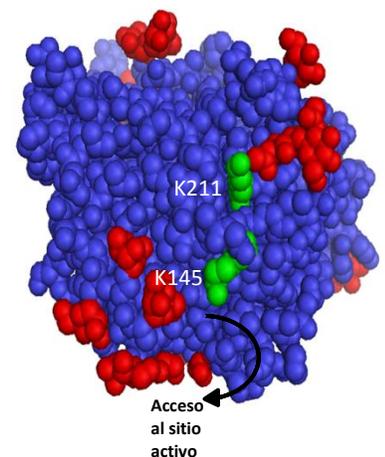
A. Identificar y/o generar grupos funcionales en la superficie de CPO, alejados del sitio activo y que sean reactivos bajo las condiciones en que se preserve la estabilidad de CPO.

B. Inmovilizar covalentemente a la CPO en un soporte con alta densidad de grupos funcionales específicos para los grupos funcionales mencionados en el objetivo anterior.

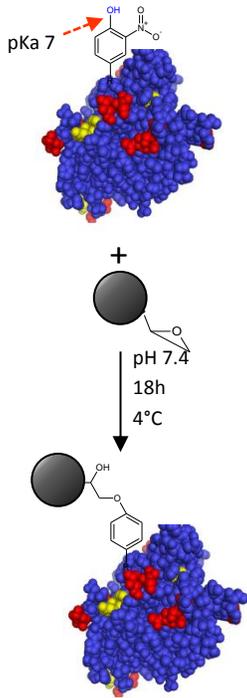
C. Caracterizar el biocatalizador obtenido en función de la capacidad de carga del soporte, la actividad retenida en la enzima inmovilizada y su estabilidad



**Figura 9. Tirosinas blanco para la inmovilización de la CPO.** Rojo, carbohidratos; amarillo, tirosinas potenciales para la inmovilización de la CPO; y azul, el resto de la parte proteica (Imagen generada en PyMOL v0.99 a partir del 1CPO.PDB).



**Figura 10. Lisinas blanco para la inmovilización de la CPO.** Rojo, carbohidratos; verde, lisinas potenciales para la inmovilización de la CPO; y azul, el resto de la parte proteica (Imagen generada en PyMOL v0.99 a partir del 1CPO.PDB).



**Figura 11. Inmovilización de CPO-nitro en Eupergit**

## 5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

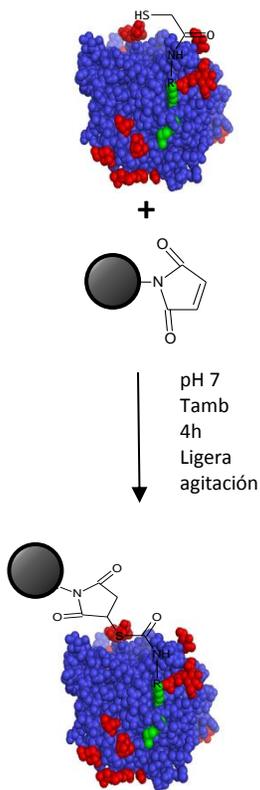
La estrategia general consiste en regular los factores que consideramos juegan un rol importante en la inactivación de la CPO y la baja carga de la misma al ser inmovilizada.

El primero de ellos es mantener libre el acceso al sitio activo, inmovilizando a la cloroperoxidasa específicamente a través de residuos de aminoácidos alejados del acceso al mismo. Por lo que el soporte es activado con grupos específicos para los aminoácidos seleccionados.

El segundo es realizar la inmovilización en donde las condiciones óptimas de reacción sean compatibles con las condiciones de estabilidad de la cloroperoxidasa. Esto permitirá mantener la actividad de la enzima logrando una reacción eficiente, esta última definida por la cantidad de enzima inmovilizada por gramo de soporte.

Las cadenas laterales de las lisinas 145 y 211 y de las tirosinas 114, 287 y 288 (Figuras 9 y 10) fueron seleccionadas para la inmovilización de la CPO con base en un análisis de la localización y posible reactividad de los aminoácidos nucleófilos de la CPO. Para la inmovilización covalente de la cloroperoxidasa en Eupergit® C a través de los residuos seleccionados se proponen 4 estrategias (Tabla 2). Las estrategias 1 y 2 parten de CPO modificada con la finalidad de aumentar la especificidad de inmovilización o bien la reactividad de los residuos de aminoácido y las estrategias 3 y 4 parten de CPO nativa.

Estrategia 1: Inmovilización de cloroperoxidasa con residuos de tirosina activados con grupos nitro (CPO-nitro), que disminuyen el pKa del grupo fenólico. Esto permitiría la inmovilización de la enzima en Eupergit® C (activado con grupos epóxido) a través de la formación de un enlace éter, a un pH por debajo del común (Figura 11).



**Figura 12. Inmovilización de CPO-tiol en E-maleimida.**

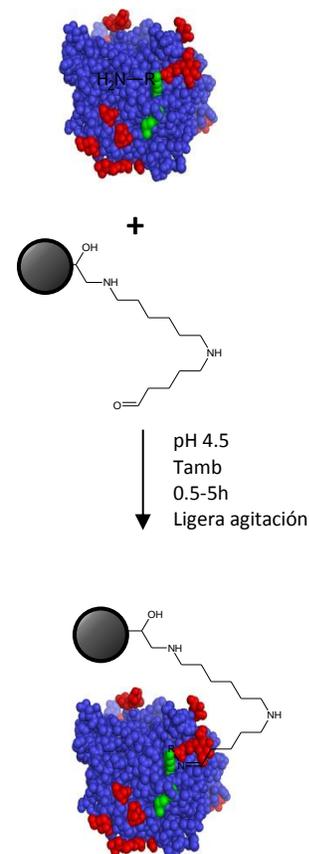
Estrategia 2: Inmovilización de la cloroperoxidasa modificada con grupos tiol unidos covalentemente a lisinas (CPO-tiol) a partir de los cuales es posible inmovilizar a la enzima en Eupergit® C activado con grupos maleimida (E-maleimida), los cuales son altamente específicos para grupos tiol bajo condiciones de estabilidad de la cloroperoxidasa (Figura 12).

Estrategia 3: Inmovilización a través de los residuos de lisina en Eupergit® C activado con glutaraldehído (E-glutaraldehído), mediante la formación de una base de Schiff entre los grupos aminos de la lisina y los grupos aldehído del soporte a pH 4.5 y a temperatura ambiente (Figura 13).

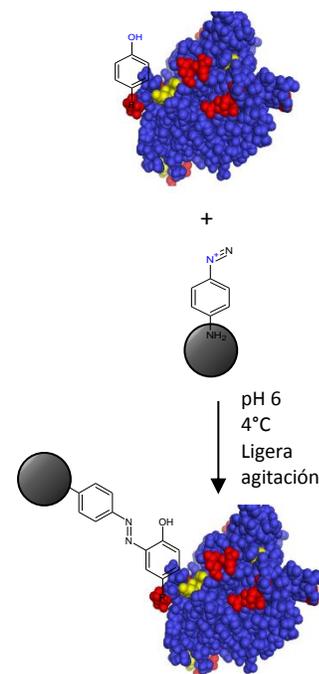
Estrategia 4: Inmovilización a través de los residuos de tirosina en Eupergit® C activado con iones diazonio (E-diazonio). Esta reacción involucraría la formación de un enlace azo entre los iones diazonio y los grupos fenólicos de las tirosinas a pH 6 y 4°C (Figura 14).

**Tabla 2.** Estrategias para la inmovilización de la cloroperoxidasa.

CPO	Soporte	Condiciones de inmovilización
CPO-nitro	Eupergit® C	pH 7.4 a 4°C
CPO-tiol	E-maleimida	pH 7 a 4°C
Nativa	E-glutaraldehído	pH 4.5 a temperatura ambiente
Nativa	E-diazonio	pH 6 a 4°C



**Figura 13.** Inmovilización de CPO nativa en E-glutaraldehído a través de residuos de lisina.



**Figura 14.** Inmovilización de CPO nativa en E-diazonio a través de residuos de tirosina.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Materiales

Los reactivos fueron adquiridos con distintos proveedores

Alfa Aesar: 2-cloro-5,5-dimetil-1,3-ciclohexanodiona (monoclorodimedona). Fluka BioChemika: reactivo de Folin-Ciocalteu para fenoles. Honeywell: acetonitrilo. J.T. Baker: acetato de sodio, ácido bórico, ácido clorhídrico, bisulfito de sodio, carbonato de sodio, clorhidrato de anilina, cloruro de sodio, cloruro de potasio, fenilmercaptano, fosfato de sodio dibásico, fosfato de sodio monobásico y 6-maleimida ácido hexanóico N-hidroxisuccinimida éster. Merk: tert-Butanol. Sigma Aldrich: ácido ditiopropanoico, borato de sodio, cianoborohidruro de sodio, cromato de potasio, 4,4'-ditiopiridina (Aldritiol-4), DL-ditiotreitol (DTT), fenol, glutaraldehído, 1,6-hexano-diamina, hidrocioruro de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida, membranas para diálisis de celulosa, nitrito de sodio, nitrato de plata, L-cisteína, peróxido de hidrógeno, *p*-fenilendiamina, quitosano y tetranitrometano. Mallinckrodf Chemicals: ácido acético glacial.

La cloroperoxidasa fue producida de *C. fumago* ATCC 11925 en nuestro grupo de trabajo de acuerdo al protocolo reportado por Pickard y colaboradores en 1991.

Los equipos utilizados fueron: centrífuga para eppendorf Brinkmann 5415 C, potenciómetro Corning 430, HPLC Agilent serie 1100, espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 25 y agitador Labquake.

### 6.2. Caracterización de la cloroperoxidasa

#### 6.2.1. Concentración

El hemo de la cloroperoxidasa posee una intensa y estrecha banda de absorción a 398 nm, llamada banda Soret. Esta característica permite la cuantificación de la enzima utilizando su coeficiente de extinción molar que es de 85, 000 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> (Libby *et al.*, 1989 y Rimington, 1960).

### **6.2.2. Pureza**

La pureza de las hemoperoxidasas se expresa como la relación de la absorbancia en la banda Soret entre la absorbancia a 280 nm, llamada relación de Reinzhalt (*Rz*). Una solución pura de cloroperoxidasa presenta un *Rz* de 1.44 (Hallenberg and Hager, 1978), cabe señalar que el proceso de purificación utilizado convencionalmente (Pickard *et al.*, 1991) resulta en una enzima con un *Rz* de alrededor de 1.2.

### **6.2.3. Actividad**

La actividad enzimática de la cloroperoxidasa puede ser determinada mediante el ensayo típico de la monoclorodimedona (MCD), un compuesto detectable a 278 nm. Esta es una reacción de tipo halogenasa que rinde diclorodimedona (DCD) y permite el monitoreo de consumo de sustrato, cuyo coeficiente de extinción es 12, 200 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> (Hallenberg and Hager, 1978). Típicamente se realiza en amortiguador acetatos 60 mM a pH 3 conteniendo: 1 mM de peróxido de hidrógeno, 100 μM de MCD y 20 mM de KCl.

Una unidad enzimática se define como la cantidad de enzima que es capaz de convertir 1 μmol de sustrato por minuto.

## **6.3. Modificación de la cloroperoxidasa**

### **6.3.1. Modificación de tirosinas con tetranitrometano**

Se incubó cloroperoxidasa en amortiguador de fosfatos 60 mM a pH 7.4 conteniendo 0.15 M de NaCl con 28 equivalentes molares de tetranitrometano. La concentración de la enzima en la mezcla de reacción fue 108 μM.

Debido a la inestabilidad de la CPO a pH por arriba de 7 a temperatura ambiente, la modificación se realizó a 4°C, donde la enzima es más estable al pH óptimo de esta reacción, 7.4. El tiempo de reacción fue aumentado a 4 h con la finalidad de compensar la disminución en la temperatura. El exceso de reactivos fue retirado por diálisis con 300 volúmenes de amortiguador fosfatos 60 mM a pH 6. La cloroperoxidasa resultante se denomina CPO-nitro.

La alta absorbancia del 3-nitrofenolato (ion negativo de la 3-nitrotirosina, pKa 7) a 428 nm (coeficiente de extinción molar 42, 000 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> (Hermanson, 2008)) puede ser aprovechada para determinar de manera

cuantitativa el grado de modificación de los residuos de tirosina por el tratamiento con tetranitrometano.

Se midió la absorbancia a 428 nm de una solución de CPO-nitro a pH 9, donde la 3-nitrotirosina se encuentra en forma de 3-nitrofenolato. La concentración de dicho ion fue calculada con la ecuación de Lambert-Beer y fue relacionada con el número de tirosinas modificadas por molécula de cloroperoxidasa. Como blanco se utilizó una solución de cloroperoxidasa nativa a la misma concentración y pH.

### *6.3.2. Modificación de lisinas con ácido ditiopropanoico*

#### *Reacción de modificación con ácido ditiopropanoico*

Se incubó cloroperoxidasa en amortiguador fosfatos 60 mM a pH 6 con 100 equivalentes molares de carbodiimida y 20 equivalentes molares de ácido ditiopropanoico. La reacción se mantuvo a temperatura ambiente y con ligera agitación durante 4 h. La concentración de la enzima en la mezcla de reacción fue 2.5  $\mu$ M.

El exceso de reactivos fue eliminado dializando en 250 volúmenes de amortiguador fosfatos 60 mM a pH 5. La cloroperoxidasa resultante será referida en adelante como CPO-ditiopropanoico.

#### *Reducción del enlace disulfuro*

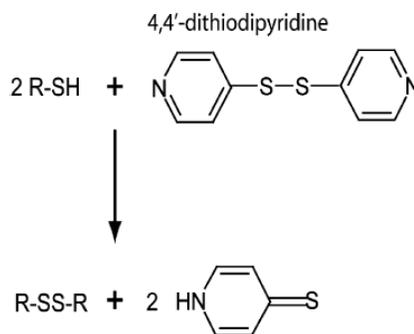
Con la finalidad de exponer el grupo tiol introducido en la CPO, antes de la inmovilización se incubó CPO-ditiopropanoico en amortiguador fosfatos 60 mM a pH 5 con 10 equivalentes molares de ditiotreitól (DTT), a temperatura ambiente y ligera agitación durante 2 h (Scigelova *et al.*, 2001).

Para la inmovilización en E-maleimida, el exceso de DTT fue eliminado por diálisis con 200 volúmenes de amortiguador fosfatos 60 mM a pH 6 a temperatura ambiente y 200 volúmenes de amortiguador fosfatos 60 mM a pH 7.4 a 4°C.

#### *Evaluación del grado de modificación de lisinas*

La reacción de intercambio tiol-disulfuro entre la 4,4'-ditiopiridina (4-DDP) y grupos tiol genera 4-tiopiridona (4-TP) (Figura 15), un compuesto cromogénico detectable a 324 nm que puede ser separado por HPLC fase reversa (Hansen *et al.*, 2007).

Debido a que la cloroperoxidasa no presenta residuos de cisteína superficiales, se espera que la aparición de la 4-TP sea evidencia de la modificación.



**Figura 15. Reacción de intercambio tiol-disulfuro.** La 4,4'-ditiopiridina (4-DPS) reacciona con los grupos tiol en una reacción de intercambio tiol-disulfuro, generando la 4-tiopiridona (4-TP).

Se incubó la misma cantidad de CPO-tiol y CPO nativa (esta última para ser tomada como referencia) con 150 equivalentes molares de 4,4'-ditiopiridina en amortiguador de citratos 60 mM a pH 4.5, a temperatura ambiente y ligera agitación durante 30 min.

La 4-TP presente en cada muestra fue identificada por HPLC a una longitud de onda de 324 nm en una columna fase reversa Spelco 250 mm x 4.6 mm C-8, eluyendo isocráticamente con 1 ml/min de amortiguador de acetatos 25 mM a pH 4. Bajo estas condiciones, la 4-TP tiene un tiempo de retención de 5 min.

## 6.4. Activación de Eupergit® C con diferentes grupos funcionales

### 6.4.1. Activación de Eupergit® C con grupos amino

#### *Activación del soporte*

Los grupos epóxido u oxirano son altamente reactivos con aminas primarias a valores de pH 9 o superiores, en una reacción de nucleófilo que involucra la apertura del anillo del epóxido y la formación de una amina secundaria (Figura 16). Los grupos oxirano son reactivos susceptibles a hidrólisis en ambientes ácidos (Hermanson, 2008). De acuerdo con el proveedor, el Eupergit C® contiene de 800 a 1,000  $\mu\text{mol}$  de grupos epóxido por gramo de material.

Se incubó Eupergit® C con siete equivalentes molares de diamina, ya sea *p*-fenilendiamina o hexanodiamina (tomando como referencia el número de

grupos epóxido contenidos en el soporte) en 200  $\mu\text{L}$  de agua desionizada por cada 1-1.2 mg de soporte, a temperatura ambiente y ligera agitación durante 2 horas. El pH de la solución se encontró alrededor de 12.

Al final de la reacción y para retirar el exceso de reactivos, se lavó el soporte con agua desionizada hasta alcanzar un pH neutro, el agua de cada lavado fue separada por centrifugación a 10,000 rpm durante 2 minutos.

Los soportes resultantes han sido referidos en el apartado de estrategia experimental como E-amino y E-arilamino (Eupergit® C activado con hexanodiamina y *p*-fenilendiamina respectivamente).

### *Cuantificación de grupos amino*

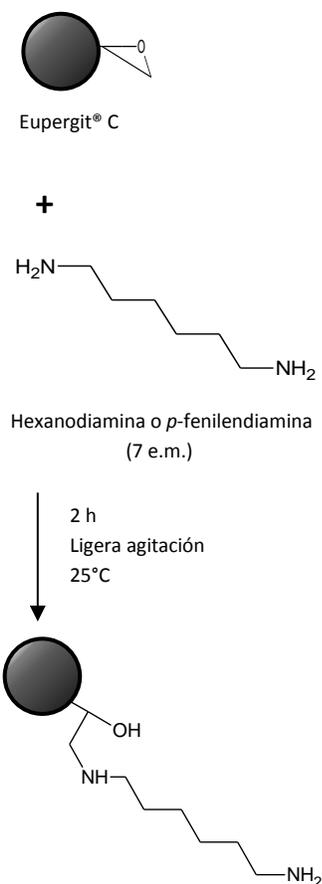
En una solución de HCl los grupos amino del E-amino deben encontrarse protonados e interactuando en una relación 1:1 con el ion  $\text{Cl}^-$ . Por lo tanto, si el E-amino o E-arilamino es puesto en solución con un exceso de HCl (tomando como referencia un máximo de 1,000  $\mu\text{mol}$  amino/g soporte) y la cantidad  $\text{Cl}^-$  libre es cuantificada, podrá saberse por diferencia, el número de grupos amino en el soporte (Ecuación 1).

$$\begin{aligned} \text{Cl}^- \text{ en interacción con } \text{NH}_3^+ &= \text{Cl}^- \text{ en exceso} - \text{Cl}^- \text{ libre} \\ \text{NH}_3^+ &= \text{Cl}^- \text{ exceso} - \text{Cl}^- \text{ libre} \end{aligned}$$

**Ecuación 1. Fórmula para determinar por diferencia el número de grupos amino en el soporte.**

El método de Mohr determina la concentración de iones cloruro en una solución por titulación con nitrato de plata en presencia de iones cromato. El nitrato de plata formará cloruro de plata (precipitado blanco) mientras haya iones cloruro disueltos, cuando estos son consumidos el exceso de nitrato de plata reacciona con los iones cromato formando cromato de plata (precipitado rojo marrón), cuya aparición indica que la titulación ha terminado (Knopkar, 1998).

Se suspendió E-amino o E-arilamino en una solución con 3 equivalentes molares de HCl (tomando como referencia un máximo esperado de 1,000  $\mu\text{mol}$  amino/g soporte), se agitó, se centrifugó a 10,000 rpm durante 2 min y se extrajo el sobrenadante.



**Figura 16. Activación de Eupergit® C con grupos amino.**

Se adicionó  $K_2CrO_4$  a una concentración final de 0.25 M y se llevó a pH 7.5 con una solución de  $NaHCO_3$ . La solución anterior fue titulada con  $AgNO_3$  1.2 M hasta observar un precipitado rojo marrón.

#### 6.4.2. Activación de E-amino con grupos maleimida

##### Activación del soporte

El E-amino puede ser activado con grupos maleimida por medio de 6-maleimida ácido hexanoico *N*-hidroxisuccinimida éster, un agente heterobifuncional con un grupo succinimida y un grupo maleimida.

Los grupos succinimida reaccionan preferencialmente con grupos amino eliminando *N*-hidroxisuccinimida como grupo saliente (Figura 17). La reacción es completada entre 10 y 20 min en un pH entre 6 y 9; ya que los aminos son los grupos reactivos, la velocidad de reacción incrementa conforme aumenta el pH. Sin embargo la succinimida es rápidamente hidrolizable a pH mayor a 7.5 (a pH 7.5 el tiempo de vida media de 4 a 5 horas mientras que a 8.6 es de 10 minutos), por lo que es recomendable realizar la reacción a un pH por debajo de 7.5 (Wong, 1993).

Se incubó E-amino en amortiguador fosfatos 60 mM a pH 7 con un equivalente molar de 6-maleimida ácido hexanoico *N*-hidroxisuccinimida éster. A temperatura ambiente y ligera agitación durante 30 minutos. El volumen de reacción fue de 200  $\mu$ L por 1-1.2 mg de soporte.

Para retirar el exceso de reactivos se lavó el soporte exhaustivamente con agua desionizada, el agua de cada lavado fue separada por centrifugación a 10,000 rpm durante 2 minutos.

El soporte resultante ha sido referido en el apartado de estrategia experimental como E-maleimida.

##### Cuantificación de grupos maleimida

Las maleimidias pueden ser cuantificadas aprovechando su reactividad con los grupos tiol si se incubaba el E-maleimida con un exceso molar de un compuesto tiolado, fenilmercaptano en este caso. La cuantifi

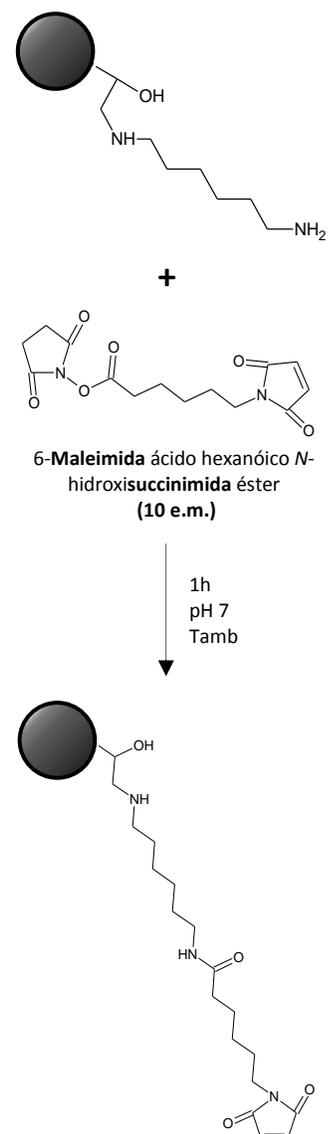


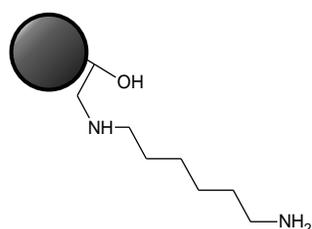
Figura 17. Activación de E-amino con grupos maleimida.

cación del compuesto tiolado remanente permitirá por diferencia determinar la cantidad de grupos maleimida en el soporte.

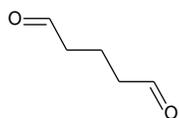
Se incubó el E-maleimida en amortiguador fosfatos 60 mM a pH 6.5 con 2 equivalentes molares de fenilmercaptano, tomando como referencia un máximo esperado de 1933  $\mu\text{mol}$  maleimida/ $\text{g}_{\text{soporte}}$ , que es la densidad de grupos funcionales en el soporte de partida (E-amino), a temperatura ambiente y ligera agitación durante 30 minutos.

La mezcla de reacción fue centrifugada durante 2 min a 10,000 rpm, se extrajo el sobrenadante y se cuantificó el fenilmercaptano remanente.

El fenilmercaptano fue cuantificado por HPLC en una columna fase reversa Machery-Nagel 250 mm x 4.6 mm C-18 a una longitud de onda de 240 nm y eluyendo con un gradiente  $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$  0.5 ml/min, donde el fenilmercaptano tiene un tiempo de retención de 6.7 minutos. La cantidad de fenilmercaptano remanente fue determinada evaluando el área resultante en una curva patrón de fenilmercaptano realizada con el mismo método.

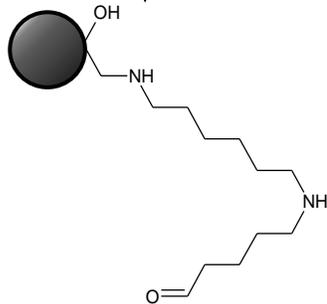


+



Glutaraldehído  
(10 e.m.)

30min  
pH 8.5



#### 6.4.3. Activación de E-amino con grupos aldehído

##### Activación del soporte

Los grupos aldehído pueden reaccionar con aminas para formar bases de Schiff (Figura 18), siendo la reacción más eficiente a condiciones de pH alto. La base de Schiff es un enlace débil que puede ser estabilizado por reducción con borohidruro y cianoborohidruro de sodio a una amina secundaria (Hermanson, 2008).

Se incubó E-amino con 10 equivalentes molares de glutaraldehído (con referencia a los 1933  $\mu\text{mol}$  amino/ $\text{g}_{\text{soporte}}$  determinados en la sección anterior) en amortiguador fosfatos 60 mM a pH 8.5 a temperatura ambiente y con ligera agitación durante 30 min, en un volumen de reacción de 200  $\mu\text{L}$  por cada 1-1.2 mg de soporte. El exceso de reactivos fue retirado mediante lavado con agua destilada. El agua de cada lavado fue separada por centrifugación a 10,000 rpm durante 2 min.

**Figura 18. Activación de E-amino con glutaraldehído.**

### *Cuantificación de grupos aldehído*

La densidad de grupos aldehído en el soporte fue evaluada de dos formas. La primera, cuantificando el glutaraldehído remanente de la reacción de activación, por medio de su reacción con el reactivo de Schiff, se determinó un cambio en espectro de absorción del reactivo de Schiff a 360 nm debido a su reacción con el glutaraldehído.

El reactivo de Schiff se preparó adicionando 37 equivalentes molares de HCl concentrado y 30 equivalentes molares de bisulfito de sodio a una solución 13 mM de clorhidrato de anilina (fucsina).

Se activaron 1-1.1 mg de E-amino con 10 equivalentes molares de glutaraldehído (ver *Activación del soporte*). La mezcla de reacción fue centrifugada, 20  $\mu\text{L}$  del sobrenadante fueron reaccionados con 780  $\mu\text{L}$  del reactivo de Schiff y se midió la absorbancia de la solución a 360 nm. La cantidad de glutaraldehído remanente fue determinada evaluando la absorbancia resultante en una curva patrón de glutaraldehído obtenida por el mismo método. La segunda forma fue determinando la cantidad de grupos aldehído en el soporte mediante su reactividad con la *p*-fenilendiamina, la cual puede ser cuantificada a través de su máximo de absorción a 304 nm. La incubación de E-glutaraldehído con un exceso de *p*-fenilendiamina permitió, por diferencia, conocer la cantidad de grupos aldehído reactivos en soporte. Se incubaron 1-1.1 mg de E-glutaraldehído con 2.5 equivalentes molares de *p*-fenilendiamina (con referencia a los 1933  $\mu\text{mol}$  amino/g <sub>soporte</sub> determinados en la sección anterior) en amortiguador boratos 60 mM a pH 8.5, a temperatura ambiente y con ligera agitación durante 30 min, en un volumen de reacción de 200  $\mu\text{L}$ . La mezcla de reacción fue centrifugada, 20  $\mu\text{L}$  del sobrenadante fueron aforados a 1 ml con amortiguador boratos 60 mM a pH 8.5 y se midió su absorbancia a 304 nm. La cantidad de *p*-fenilendiamina remanente fue determinada evaluando la absorbancia de la solución anterior en una curva patrón de *p*-fenilendiamina realizada con el mismo método.

#### ***6.4.4. Activación de E-arilamino con iones diazonio***

##### *Activación del soporte*

La reacción de aminas aromáticas primarias con ácido nitroso a 0°C rinde sales de diazonio, en una reacción denominada diazotación (Figura 19) (Beyer, 1987).

Se incubó E-arilamino con 2.5 equivalentes molares de HCl y 1 equivalente molar de nitrito de sodio (con referencia a los 960  $\mu\text{mol}$  arilamino/g <sub>soporte</sub>, DGF determinada en la sección anterior), a 4°C y ligera agitación durante 30 min. El volumen de reacción fue de 200  $\mu\text{L}$  por 1-1.2 mg de soporte.

Para retirar los reactivos se lavó el soporte exhaustivamente con agua desionizada a 0°C, el agua de cada lavado fue separada por centrifugación a 10,000 rpm durante 2 min. El soporte resultante ha sido referido en el apartado de estrategia experimental como E-diazonio.

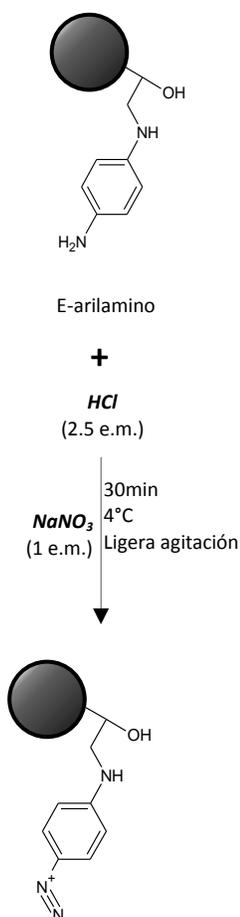
### *Cuantificación de iones diazonio*

Los grupos diazonio pueden ser cuantificados aprovechando su reactividad con compuestos fenólicos. Si se incubaba E-diazonio con un exceso molar de fenol es esperado que cada mol de fenol consumido corresponda a un mol de iones diazonio en el soporte. La cantidad de fenol consumida puede ser determinada por diferencia sabiendo la cantidad de fenol al inicio y al final de la reacción.

El método de Folin-Ciocalteu es un método colorimétrico para cuantificación de compuestos fenólicos basado en la reducción química de una mezcla de óxidos de tungsteno y molibdeno, siendo el fenol el agente reductor. Los productos reducidos absorben a 765 nm proporcionalmente a la concentración de fenol (Waterhouse, 2002).

Se incubó el E-diazonio en amortiguador fosfatos 60 mM a pH 7.5 con 1 equivalente molar de fenol (tomando como referencia un máximo esperado de 960  $\mu\text{mol}$  diazonio/g <sub>soporte</sub>) en un volumen de reacción de 200  $\mu\text{L}$  por cada 1-1.2 mg de soporte, a 4°C y ligera agitación durante 16 h.

Para separar el fenol remanente se centrifugó la mezcla de reacción durante 2 min a 10, 000 rpm y se extrajo el sobrenadante.



**Figura 19. Activación de E-arilamino con iones diazonio.**

Se incubaron 20  $\mu\text{L}$  del sobrenadante con 100  $\mu\text{L}$  de reactivo de Folin-Ciocalteu para fenoles y 1580  $\mu\text{L}$  de agua destilada a temperatura ambiente durante 5 min. Se adicionaron 300  $\mu\text{L}$  de una solución de carbonato sódico a 200 g/L y se incubó a temperatura ambiente durante 2 h. Se midió absorbancia a 765 nm. La cantidad de fenol remanente se calculó al evaluar la absorbancia a 765 nm en una curva patrón de fenol construida con el mismo método.

## 6.5. Inmovilización de la CPO

### *Inmovilización de CPO-nitro en Eupergit® C*

Se incubó CPO-nitro en una relación molar CPO-nitro: grupos oxirano en el soporte igual a 1:40. En amortiguador fosfatos 60 mM a pH 7.4, 4°C y ligera agitación durante 18 h. La concentración final de la enzima fue 61  $\mu\text{M}$ .

### *Inmovilización de la CPO-tiol en E-maleimida*

La cloroperoxidasa modificada con ácido ditiopropanoico debe tratarse con un reductor fuerte que libere los grupos tiol, DTT en este caso. Teóricamente los grupos tiol permitirán inmovilizar covalentemente a la cloroperoxidasa en soportes activados con grupos maleimida.

### Reducción del puente disulfuro

Se incubó CPO-ditiopropanoico con 10 equivalentes molares de ditiotreitól (DTT) en amortiguador fosfatos 60 mM a pH 5, temperatura ambiente y ligera agitación por 2 horas. El exceso de reactivos fue eliminado por diálisis a 4°C con al menos 200 volúmenes de amortiguador fosfatos 60 mM a pH 7, resultando en CPO con grupos tiol libres, denominada CPO-tiol en el apartado de estrategia experimental.

### Inmovilización

Se incubó la CPO-tiol con E-maleimida en una relación molar CPO-tiol: grupos maleimida igual 1:42 en amortiguador fosfatos 60 mM a pH 7, 4°C y ligera agitación durante 15 horas. La concentración de la enzima en la mezcla de reacción fue 3  $\mu\text{M}$ .

### *Inmovilización de CPO nativa en E-glutaraldehído*

Se incubó E-glutaraldehído en una relación molar CPO: grupos aldehído igual a 1:800 y una concentración final de la enzima de 13  $\mu\text{M}$ . En amortiguador fosfatos 60 mM a pH 4.5, temperatura ambiente y ligera agitación, evaluando el efecto del tiempo de inmovilización.

### *Inmovilización de CPO nativa en E-diazonio*

Se incubó CPO nativa con E-diazonio en una relación molar CPO: iones diazonio igual a 1:20 en amortiguador fosfatos 60 mM a pH 6, 4°C y ligera agitación. La concentración de la enzima en la mezcla de reacción fue 105  $\mu\text{M}$  (Rani *et al.*, 2006 y El-Masry *et al.*, 2001).

### *Controles de inmovilización en soportes intermediarios*

Dado que en cada paso de activación del soporte no hay un 100% de eficiencia, se asume que en el soporte utilizado para la inmovilización (soporte final) se encuentran grupos funcionales residuales de anteriores pasos de activación. En la Tabla 3 se muestran los controles realizados para evaluar la inmovilización de la CPO en los soportes activados con los grupos residuales (soportes intermediarios). Se muestran además las condiciones a las que se lleva a cabo la inmovilización y bajo las cuales es necesario evaluar a los soportes intermediarios.

**Tabla 3.** Controles de inmovilización en soportes intermediarios.

<b>CPO</b>	<b>Soporte final</b>	<b>Soporte intermediario</b>	<b>Grupo funcional</b>	<b>Condiciones de incubación</b>
CPO-nitro	Eupergit® C	-	-	-
CPO-tiol	E-maleimida	Eupergit® C E-amino	Epóxido Amino	pH 6.5 y temperatura ambiente durante 4 h.
Nativa	E-glutaraldehído	Eupergit® C E-amino	Epóxido Amino	pH 4.5 y temperatura ambiente durante 2.5 h.
Nativa	E-diazonio	Eupergit® C E-arilamino	Epóxido Arilamino	pH 6 y 4°C durante 8 h.

Los soportes intermediarios se incubaron con la cloroperoxidasa correspondiente bajo las condiciones indicadas en la Tabla 3. Los

controles fueron evaluados de la misma forma que el resto de los inmovilizados.

## 6.6. Caracterización de los inmovilizados

En un proceso de inmovilización es importante evaluar la cantidad de enzima unida al soporte y el efecto de la inmovilización en su actividad. La carga, es la cantidad de proteína unida al soporte, reportada generalmente en  $\text{mg}_{\text{proteína}}/\text{g}_{\text{soporte}}$ . Otro parámetro importante es el porcentaje de actividad retenida por la enzima inmovilizada, es decir la relación de la actividad específica de la enzima inmovilizada entre la actividad específica de la enzima en solución multiplicada por cien. La actividad específica de una enzima son las unidades enzimáticas presentes por unidad de masa, por ejemplo U/mol. Una unidad enzimática es la cantidad de enzima necesaria para convertir un  $\mu\text{mol}$  de sustrato a su producto en un minuto.

Después de la reacción de inmovilización, todas las mezclas de reacción fueron centrifugadas a 6,000 rpm durante 3 min, se extrajo el sobrenadante y los soportes fueron lavados con volúmenes de 500  $\mu\text{L}$  de amortiguador fosfatos 60 mM a pH 6 hasta no encontrar actividad en el sobrenadante, el amortiguador de cada lavado fue separado por centrifugación.

Los sobrenadantes y el soporte fueron evaluados por cuantificación de actividad mediante el método de la MCD (ver el método en la sección 6.1.3.). El ensayo de actividad fue suficiente para la evaluación de las preparaciones donde la suma de la actividad en el soporte y en los lavados resultó igual al 100%, es decir igual a la actividad contenida en la solución de CPO utilizada para la reacción de inmovilización. Lo anterior significa que la actividad específica de la enzima inmovilizada y en solución al inicio y al final de la reacción es la misma, y por lo tanto, la inmovilización no ha afectado la actividad de la enzima, presentando esta un 100% de actividad retenida.

Cuando la suma de la actividad en el soporte y en los lavados es menor al 100%, significa generalmente que la actividad de enzima inmovilizada ha mermado. En estos casos, es necesaria la cuantificación de proteína en

los sobrenadantes, lo cual, por diferencia, permitirá estimar la cantidad de enzima unida al soporte y en porcentaje de actividad retenida, utilizando el valor de actividad en el soporte (Figura 20).

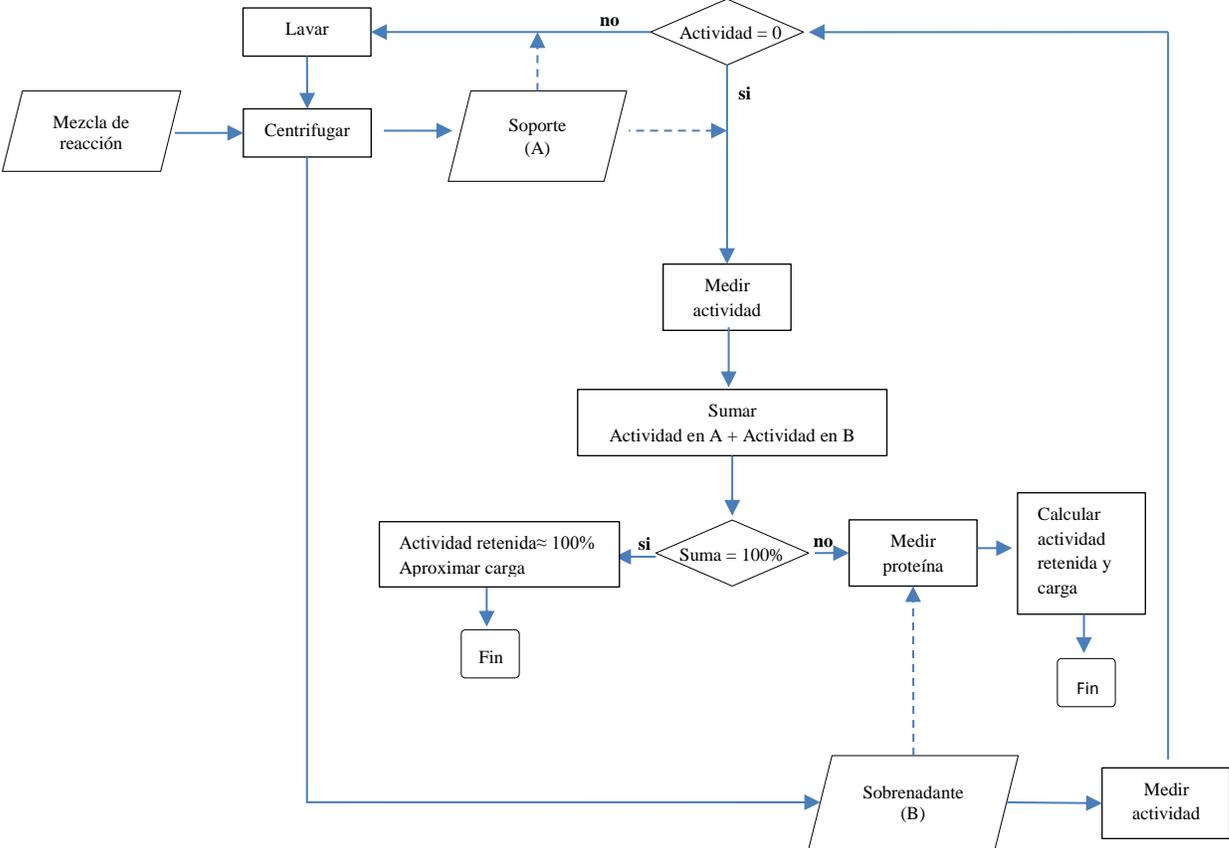


Figura 20. Proceso de la caracterización de los inmovilizados.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo se presentan en las siguientes cinco secciones. En la primera sección se encuentra el análisis de aminoácidos realizado para la selección de los aminoácidos blanco para la inmovilización de la cloroperoxidasa, utilizando el criterio de inmovilizar a la enzima a través de residuos de aminoácidos alejados del acceso al sitio activo. En la segunda sección se muestran los resultados de las modificaciones químicas realizadas sobre los aminoácidos blanco, con el fin de generar sitios reactivos que puedan favorecer una inmovilización eficiente. En la tercera sección se presenta la activación del Eupergit® C con grupos funcionales específicos para los aminoácidos blanco nativos y los aminoácidos modificados en la segunda sección, además de algunos controles para identificar y cuantificar interacciones no covalentes de la enzima con los diferentes soportes utilizados. En la cuarta sección se muestran los resultados obtenidos para las estrategias de inmovilización planteadas en este trabajo. Por último en la quinta sección se presenta un resumen de los resultados.

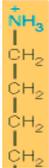
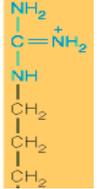
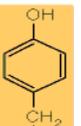
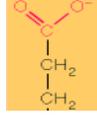
### 7.1. Selección de los aminoácidos blanco

Comúnmente, la inmovilización covalente de proteínas se realiza mediante reacciones de sustitución nucleofílica a través de las cadenas laterales de los aminoácidos que poseen grupos funcionales ionizables (nucleófilos): lisinas, argininas, histidinas, ácidos aspárticos, ácidos glutámicos, cisteínas y tirosinas. Las reacciones de nucleófilo involucran el desplazamiento de un grupo saliente por el ataque de un nucleófilo. La velocidad de reacción depende de al menos dos factores: la capacidad de salida del grupo saliente y la nucleofilicidad del grupo de ataque. En las proteínas, básicamente la reactividad es función de la nucleofilicidad de las cadenas laterales de los aminoácidos. Un nucleófilo es una especie con un par de electrones desapareados, ya sea neutro o cargado negativamente. Como regla general que define el grado de nucleofilicidad de los grupos funcionales, un nucleófilo cargado negativamente siempre es más poderoso que su ácido conjugado (Shan, 1993). Dado que una especie desprotonada es un nucleófilo más fuerte, podemos decir que el pH básico favorece la inmovilización por ataque nucleofílico.

Como se mencionó anteriormente, un obstáculo para la inmovilización covalente de la cloroperoxidasa radica en su inactivación irreversible a valores de pH superiores a 7, lo que impide someter a la enzima a valores de pH donde la mayoría de los nucleófilos en cadenas laterales están desprotonados y son reactivos.

La cloroperoxidasa posee 74 residuos de aminoácidos ionizables (Tabla 4); de acuerdo a las estrategias de inmovilización diseñadas en este trabajo los candidatos ideales para la inmovilización de la CPO son aquellos: localizados en la superficie proteica; no obstaculizados por carbohidratos; alejados del acceso al sitio activo; no estabilizados por puentes de hidrógeno, enlaces disulfuro o algún tipo de interacción primordial para la integridad de la enzima.

**Tabla 4.** Residuos de aminoácidos ionizables en la estructura de la cloroperoxidasa identificados a través de PyMOL v0.99.

Aminoácido	Lys	His	Arg	Tyr	Asp	Glu	Cys
<b>Cadena lateral</b>							
<b>Núm. total</b>	5	9	9	11	20	17	3
<b>Núm. de superficiales</b>	5	5	3	5	15	11	0
<b>Núm. de cercanos al sitio activo</b>	0	1	0	0	0	4	-
<b>Núm. de enlaces de H</b>	3	3	3	1	4	0	-
<b>pKa</b>	9.3-9.5	6.7-7.1	>12	9.7-10.1	3.7-4	4.2-4.5	8.8-9.1

Núm. total, número de residuos en la estructura de CPO; Núm. de superficiales, número de residuos cuyo grupo funcional ionizable se encuentra en la superficie proteica y sin bloqueo por carbohidratos; Núm. de cercanos al sitio activo, número de residuos que de participar en la inmovilización bloquearía el acceso al sitio activo; y Núm. de enlaces de hidrógeno, aquellos átomos ionizables que podrían formar enlaces de hidrógeno con átomos vecinos.

La identificación de aminoácidos blanco fue realizada manualmente en PyMOL v0.99 mediante el análisis de la estructura cristalográfica de la cloroperoxidasa (CPO1.PDB). En la cloroperoxidasa se encuentran 9 residuos de histidina, uno de ellos, la His101, cercano al acceso al sitio activo, existiendo la probabilidad de inmovilizar a la cloroperoxidasa a través de una zona poco favorable para la retención de actividad.

La enzima posee también tres residuos de cisteína, dos de ellos comprometidos en un enlace disulfuro, Cys79 y Cys87, y uno de ellos como ligando al grupo hemo, Cys29, por lo que la inmovilización a través de estos residuos no sería factible ni deseable.

Por su parte, 3 de los 9 residuos de arginina (Arg46, Arg50 y Arg206) presentan ambos nitrógenos ionizables en la superficie proteica y libres de carbohidratos, sin embargo, su vecindad con de átomos de oxígeno y su alto pKa los convierte en residuos estables y por tanto malos candidatos para la inmovilización de la enzima.

La cloroperoxidasa posee además 17 ácidos glutámicos y 20 ácidos aspárticos. De estos, 12 ácidos aspárticos presentan las características deseables para la inmovilización de la cloroperoxidasa, sin embargo, 4 ácidos glutámicos (Glu69, Glu233, Glu235 y Glu266) se encuentran formando una especie de corona alrededor del acceso al sitio activo. La dificultad de discernir entre ácidos aspárticos y glutámicos impide el uso de los ácidos aspárticos como blanco de inmovilización. De hecho, en nuestro laboratorio se ha probado ya que la inmovilización de la cloroperoxidasa a través de los grupos carboxilo resulta en la pérdida del 93.5% de actividad la catalítica y una carga de sólo 5.9 mg CPO/g<sub>soporte</sub> (Trujillo, 2010).

Los 5 residuos de lisina se encuentran en la superficie proteica y con el grupo ionizable NZ expuesto al solvente. Si bien las Lys112, Lys115 y Lys177 se encuentran menos accesibles debido a la formación de puentes de hidrógeno con aminoácidos vecinos, las Lys145 y Lys211 poseen las características idóneas para la inmovilización de la cloroperoxidasa. Cabe mencionar que la Lys177 se ubica cerca del acceso al sitio activo, sin embargo, esta comprometida en enlaces de hidrógeno con aminoácidos internos, por lo que posiblemente sea poco reactiva.

Por último 3 de los 11 residuos de tirosina presentan las características ideales para la inmovilización de la cloroperoxidasa (Tyr114, Tyr287 y Tyr288), ya que se localizan apartados del acceso al sitio activo, con el grupo ionizable -OH expuesto al solvente y sin formación de enlaces de hidrógeno.

De acuerdo con el análisis presentado, los residuos de lisina y tirosina son los nucleófilos que mejor cumplen con las características requeridas para la inmovilización de la cloroperoxidasa. El análisis completo de los aminoácidos ionizables puede consultarse para mayor detalle en la Tabla 2 del anexo.

El uso de los residuos de lisina y tirosina (pKa 9.3-9.5 y 9.7-10.1 respectivamente) como blanco para la inmovilización de la CPO requiere la

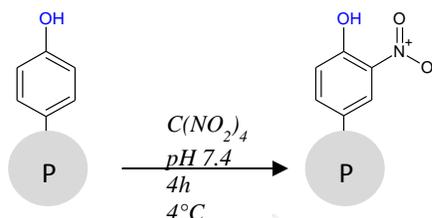
identificación de reacciones químicas específicas para estos residuos cuyas condiciones óptimas de reacción sean compatibles con las condiciones de estabilidad de la cloroperoxidasa. Estas pueden estar apoyadas, por ejemplo, con el uso de moléculas activadoras o la modificación de la enzima.

## 7.2. Modificación química de la cloroperoxidasa

### 7.2.1. Modificación de tirosinas con tetranitrometano

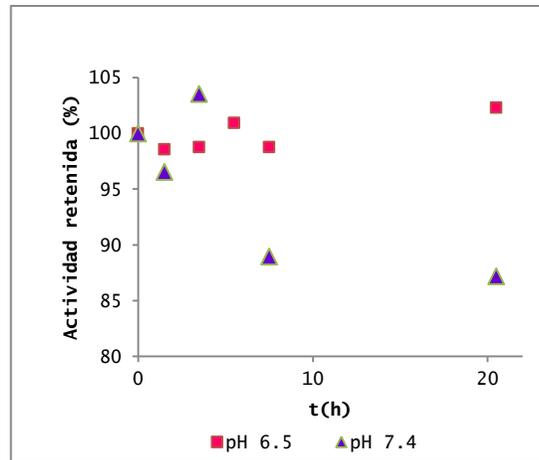
La modificación de tirosinas utilizando tetranitrometano resulta en la nitración de la posición *orto* del anillo bencénico (3-nitrotirosina, Figura 21).

El residuo fenólico de la 3-nitrotirosina tiene un  $pK_a=7$ , que es mucho más bajo que el del residuo de tirosina ( $pK_a=11$  (Wong, 1993)). Las condiciones óptimas de reacción son: pH 7.4 a temperatura ambiente durante 1 h (Hermanson, 2008). La activación de las tirosinas expuestas al solvente (Y114, Y287 y Y288) permitiría, teóricamente, la inmovilización de la cloroperoxidasa en Eupergit® C, a un pH por debajo del común, a través de la formación de un enlace éter.



**Figura 21. Modificación de la cloroperoxidasa con tetranitrometano.**

Para la identificación del pH máximo de estabilidad de la cloroperoxidasa a 4°C se incubó la enzima en amortiguador fosfatos 60 mM a pH 6.5 y 7.4 y se observó que a pH 7.4 la enzima pierde sólo el 13% de actividad después de 20.5 h (Figura 22). Los resultados anteriores permitieron determinar las condiciones de reacción para la modificación: pH 7.4 a 4°C durante 18 h.



**Figura 22. Estabilidad de la cloroperoxidasa a pH 6.5 y 7.4 a 4°C.**

La modificación de la cloroperoxidasa con tetranitrometano fue evaluada determinando la concentración del 3-nitrofenolato en una solución de CPO-nitro de concentración conocida (ver métodos, sección 6.3.1.). Cada molécula de 3-nitrofenolato corresponde a una molécula de tirosina modificada, si consideramos que hay aproximadamente 3 residuos de tirosina en la superficie por molécula de CPO, el porcentaje de residuos de tirosina modificados es del 5%. Este es un porcentaje muy bajo, en promedio no alcanza el equivalente a un residuo de tirosina modificado por molécula de proteína. Cabe señalar que este proceso de modificación bajo condiciones óptimas ha resultado en una eficiencia de casi el 100% en varias proteínas (Sokolovsk *et al.*, 1966).

Las condiciones óptimas de modificación son pH 7.4 y temperatura ambiente durante 1 h, sin embargo, con la finalidad de mantener la estabilidad de la CPO la reacción se realizó a pH 7.4 y 4°C, compensando la disminución de la temperatura aumentando el tiempo de reacción a 4 h.

De acuerdo al porcentaje de modificación obtenido es probable que la temperatura sea un factor muy importante en la reacción que no puede ser llevado al óptimo debido a la inestabilidad de la CPO bajo esas condiciones.

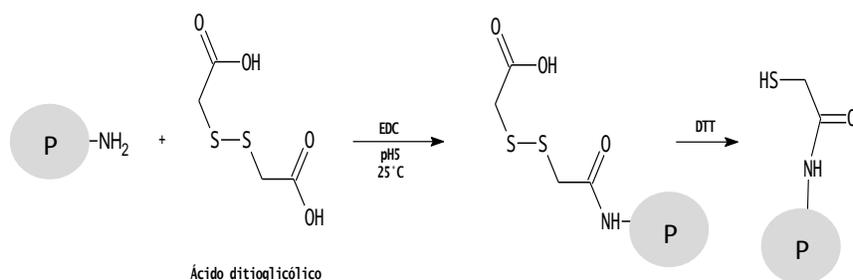
Por otro lado, el proceso de modificación provoca la pérdida del 17% de actividad enzimática, sugerimos que la inactivación parcial de la enzima puede deberse a la combinación del pH de incubación y la presencia del tetranitrometano. El tetranitrometano es una molécula oxidante que podría afectar otras partes de la estructura proteica además de las tirosinas.

En resumen se obtuvo CPO-nitro con el 5% de residuos de tirosina modificados y una actividad residual del 83%. Debido al bajo porcentaje de modificación es esperado que la inmovilización de CPO-nitro en Eupergit® C resulte en una carga enzimática baja.

### 7.2.2. *Modificación de lisinas con ácido ditiopropanoico*

Las carbodiimidas son agentes entrecruzantes de cero longitud utilizados como mediadores en la formación de enlaces amida estables entre ácidos carboxílicos y aminas. Las carbodiimidas activan a los ácidos carboxílicos formando *o*-acilisourea, un intermediario muy inestable que reacciona con aminas primarias liberando isourea como subproducto (Hermanson, 2008). La activación de grupos carboxilato ocurre efectivamente en un intervalo de pH de 3.5 a 4.5, mientras la formación del enlace amida ocurre a pH entre 4 y 6. Sin embargo la carbodiimida se hidroliza rápidamente a valores de pH ácidos, siendo estable a pH por arriba de 6.5. Se ha demostrado que un pH de 4.5 a 7.5 en amortiguador MES o fosfatos funciona eficientemente en la formación de enlaces amida en muestras proteicas (Hermanson, 2008).

La utilización de carbodiimida permitiría la formación de enlaces amida entre el ácido ditiopropanoico (agente homobifuncional con grupos carboxilo) y los grupos amino de las lisinas 145 y 211 ubicadas en la superficie de la cloroperoxidasa, a un pH donde la enzima es estable. En la estructura del ácido ditiopropanoico se encuentra un enlace disulfuro que debe ser reducido para generar grupos tiol en la superficie de la cloroperoxidasa (Figura 23).



**Figura 23. Modificación de la CPO con ácido ditiopropanoico y posterior reducción del enlace disulfuro para la liberación del grupo tiol.**

La modificación de la cloroperoxidasa con grupos tiol permitiría la inmovilización de la enzima en soportes activados con grupos maleimida,

que son específicos para grupos tiol y cuyas condiciones óptimas de reacción son compatibles con la estabilidad de la cloroperoxidasa.

### *Selección del amortiguador*

Para reacciones de aminos con carboxilos auxiliadas por carbodiimida son recomendados amortiguadores MES y fosfatos. Sin embargo, antecedentes en nuestro grupo de trabajo indican la pérdida de actividad catalítica de la CPO por su incubación en amortiguador MES 60 mM a pH 6.

Para la selección del amortiguador adecuado para la modificación química de la cloroperoxidasa con ácido ditiopropanoico, se realizaron los siguientes ensayos: en las muestras Control 1 y Control 2 se incubó CPO únicamente en amortiguador MES y fosfatos respectivamente, ambos 60 mM a pH 6. Mientras que con la finalidad de evaluar el efecto del amortiguador sumado al efecto de la modificación química, en las muestras Reacción 1 y Reacción 2 se incubó CPO en amortiguador MES y fosfatos respectivamente en presencia de carbodiimida y ácido ditiopropanoico (Tabla 5).

**Tabla 5.** Evaluación de los amortiguadores MES y fosfatos en la reacción de modificación química con ácido ditiopropanoico de la CPO.

Muestra	Amortiguador	Carbodiimida (equivalentes molares)	Ácido ditiopropanoico (equivalentes molares)	Actividad residual (%)
Control 1	MES pH 6	0	0	51
Control 2	Fosfatos pH 6	0	0	100
Reacción 1	MES pH 6	100	20	23
Reacción 2	Fosfatos pH 6	100	20	61

**En todas las reacciones fue incubada cloroperoxidasa 9.63  $\mu$ M a temperatura ambiente y ligera agitación durante 4 horas. Se define actividad residual como el porcentaje de actividad de la CPO después del tratamiento de modificación entre la actividad de la CPO sin tratar.**

De acuerdo con los ensayos de actividad, la incubación de CPO en amortiguador MES 60 mM a pH 6 (Control 1) por sí misma provoca la pérdida del 49% de la actividad enzimática. La modificación química en dicho amortiguador (Reacción 1) provoca una pérdida de actividad adicional, resultando en una pérdida total del 78% de la actividad.

Por otro lado la incubación de CPO en amortiguador de fosfatos 60 mM a pH 6 no tiene efectos adversos en la actividad (Control 2), aunque se pierde el 39% de esta debido a la reacción de modificación (Reacción 2).

De acuerdo a los resultados obtenidos podemos concluir que el amortiguador más adecuado para realizar la reacción de modificación

química es el amortiguador de fosfatos 60 mM a pH 6, en el cual la cloroperoxidasa modificada con ácido ditiopropanoico presenta una actividad residual del 61%.

#### *Evaluación del grado de modificación de las lisinas*

La modificación de las lisinas con grupos tiol fue evaluada mediante el método de intercambio tiol-disulfuro entre los grupos tiol agregados a la superficie de la cloroperoxidasa y el reactivo 4-DDP, resultando en la generación 4-TP (ver métodos, sección 6.3.2.).

La cloroperoxidasa nativa posee 3 residuos de cisteína, uno como ligando al grupo hemo y los dos restantes formando un enlace disulfuro. Debido a la ausencia de grupos tiol libres o expuestos en la superficie era esperado que la incubación de CPO nativa con 4-DDP no generara 4-TP y la aparición de este producto fuera propia de los tioles integrados a la superficie de la enzima modificada (CPO-tiol). Sin embargo, de acuerdo a la detección de 4-TP por HPLC, al inyectar la misma cantidad de CPO nativa y de CPO-tiol es posible detectar 4-TP en ambas muestras, lo que significa que en la CPO nativa de algún modo se encuentran grupos tiol accesibles para la reacción con la 4-DDP.

Si bien puede detectarse generación de 4-TP en la cloroperoxidasa nativa, el área relativa reportada por el HPLC es 4 veces mayor en el caso de la CPO-tiol (Figura 24), lo que es un indicador positivo de su modificación con ácido ditiopropanoico y la posterior reducción del enlace disulfuro con DTT, aunque no es posible determinar el porcentaje de modificación debido a que el método de evaluación es cualitativo.

Con los resultados presentados podemos concluir que la cloroperoxidasa fue modificada exitosamente con ácido ditiopropanoico, el cual fue posteriormente reducido con DTT, dando lugar a la CPO-tiol, una preparación de cloroperoxidasa con grupos tiol libres a través de los cuales fue evaluada la inmovilización de la enzima en Eupergit® C activado con grupos maleimida.

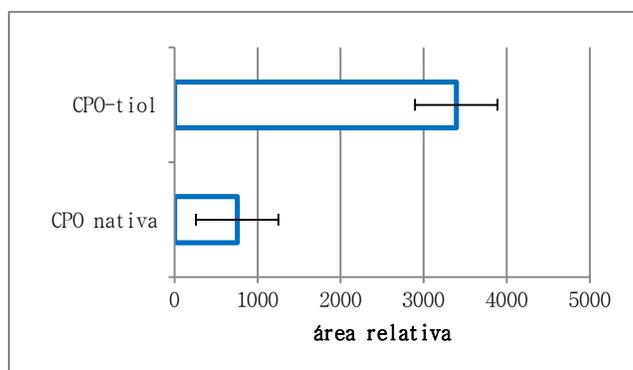


Figura 24. Área relativa en la detección del 4-TP en CPO nativa y CPO-tiol

### 7.3. Activación de Eupergit® C con diferentes grupos funcionales

#### *Determinación la DGF en los soportes activados*

Tal como se resume en la Tabla 6 el Eupergit® C fue activado exitosamente con diferentes grupos reactivos (amino, arilamino, diazonio, aldehído y maleimida) resultando en soportes con alta densidad de grupos funcionales (DGF). Es importante resaltar que los soportes E-amino y E-arilamino son únicamente soportes intermediarios, los soportes activados con grupos funcionales específicos para la inmovilización de la cloroperoxidasa (soportes finales) son: E-diazonio, E-glutaraldehído y E-maleimida. Además del Eupergit® C, soporte inicial que será evaluado sin ninguna modificación.

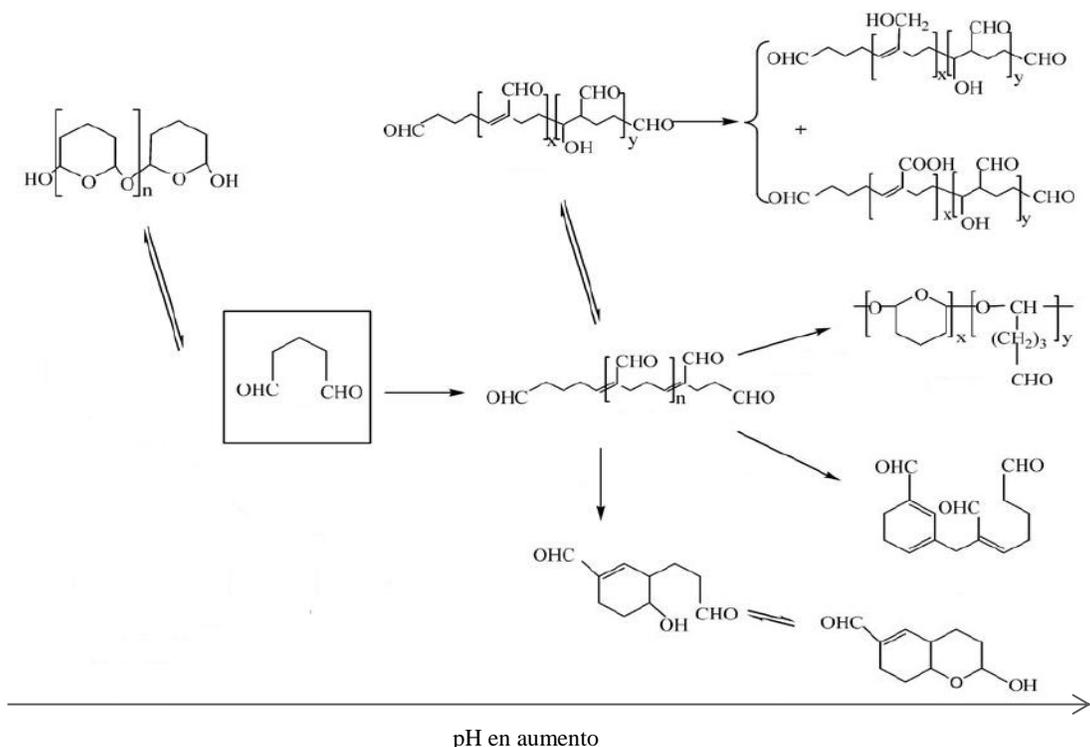
Tabla 6. DGF en los soportes activados.

Soporte	Descripción	DGF ( $\mu\text{mol}$ grupo funcional/g soporte)
E-amino	Eupergit® C activado con grupos amino	1933 $\pm$ 163
E-arilamino	Eupergit® C activado con grupos arilamino	940 $\pm$ 35
E-diazonio	E-arilamino activado con iones diazonio	330 $\pm$ 58
E-glutaraldehído	E-amino activado con grupos aldehído	2751 $\pm$ 97
E-maleimida	E-amino activado con grupos maleimida	1417 $\pm$ 130

DGF: Densidad de Grupos Funcionales.

Debido a que el glutaraldehído tiende a formar polímeros (Figura 25, Walt, 1994 y Migneault *et al.*, 2004), la DGF en el E-glutaraldehído fue evaluada de dos formas. La primera, midiendo glutaraldehído residual en la reacción de activación del E-amino con glutaraldehído, y la segunda, determinado directamente la DGF de aldehído en el E-glutaraldehído (ver

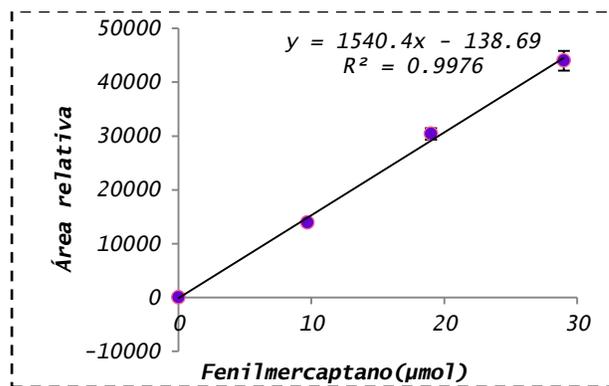
métodos, sección 6.4.3.). El glutaraldehído residual sugiere que en el E-glutaraldehído se encuentran  $17,495 \pm 1490 \mu\text{mol}$  de glutaraldehído por gramo de soporte, aunque la determinación directa corresponde al 16% de ese valor ( $2,751 \pm 97 \mu\text{mol}$  aldehído/g soporte). Lo anterior parece indicar que el glutaraldehído se encuentra unido al Eupergit® C en forma de polímero, estado que no representa ninguna complicación para la inmovilización de la cloroperoxidasa, ya que la cantidad de grupos aldehído disponibles por gramo de material es alta.



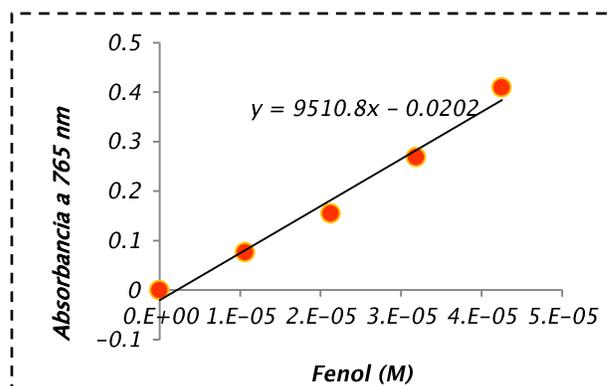
**Figura 25. Estructuras poliméricas del glutaraldehído probables en solución acuosa. Tales estructuras son pH dependientes, en el recuadro se muestra la estructura del monómero de glutaraldehído lineal, a su izquierda el polímero encontrado bajo condiciones ácidas y a su derecha los polímeros encontrados en condiciones alcalinas.**

Cabe mencionar que de acuerdo con el proveedor la DGF del Eupergit® C es alrededor de  $1000 \mu\text{mol}$  epóxido/g soporte, por lo que se esperaba que la DGF en los soportes activados, en general, fuera menor o igual a dicho valor. Sin embargo, en los casos del E-amino y E-maleimida la DGF es 90 y 40% mayor; ante la consistencia de nuestros datos podemos proponer que la DGF en el Eupergit® C utilizado es al menos  $1933 \pm 163 \mu\text{mol}$  epóxido/g soporte que es la DGF más alta encontrada en nuestros soportes activados, esto sin tomar en cuenta el E-glutaraldehído, donde la reacción glutaraldehído-amino no es en una relación 1:1.

Como puede verse en el apartado de métodos la cuantificación de grupos funcionales en el E-maleimida y E-diazonio requirió la construcción de curvas patrón de fenilmercaptano y fenol, grupos específicos para maleimida y diazonio respectivamente, que son mostradas en las Figuras 26 y 27.



**Figura 26. Curva patrón de fenilmercaptano.** Cada punto representa el valor promedio de tres muestras analizadas.



**Figura 27. Curva patrón de fenol.** Cada punto representa el valor promedio de tres muestras analizadas.

### *Controles de inmovilización en soportes intermediarios*

Como se ha mencionado ya en el apartado de métodos, en el soporte utilizado para la inmovilización (soporte final), a excepción del Eupergit® C, se encuentran grupos funcionales residuales de los soportes intermediarios.

Debido a que la finalidad de este trabajo es lograr la inmovilización de la cloroperoxidasa a través de sitios específicos es necesario evaluar la posible interacción de la enzima con los grupos funcionales residuales, por lo que se realizaron algunos controles. Como puede verse en la Tabla 7 el Eupergit® C a pesar de tener grupos reactivos epóxido y

ser un material poroso, no posee la capacidad de retener CPO, ni nativa ni modificada con grupos tiol, bajo ninguna de las condiciones de evaluadas.

**Tabla 7.** Evaluación de los soportes intermediarios.

<b>CPO</b>	<b>Soporte final</b>	<b>Soportes intermediarios</b>	<b>Resultados</b>
CPO-tiol	E-maleimida	Eupergit® C E-amino	Inmovilización nula No determinado
Nativa	E-glutaraldehído	Eupergit® C E-amino	Inmovilización nula 1761±510 U/g, 6±1% de actividad retenida y desorción
Nativa	E-diazonio	Eupergit® C E-arilamino	Inmovilización nula 1703±48 U/g, 98±0.4% de actividad retenida y desorción

Por su parte el soporte activado con aminos alifáticos, E-amino, posee la capacidad de unir CPO nativa. La sugerencia de una unión electrostática CPO nativa-E-amino es congruente con el pI de la enzima y el pKa de los aminos alifáticos, 4 y 10.7 respectivamente: a pH 4.5 la cloroperoxidasa se encuentra con carga neta negativa y el soporte cargado positivamente. La enzima retenida bajo estas condiciones presenta una actividad muy baja (alrededor del 6%). Si bien la interacción con CPO-tiol no fue evaluada, se espera que la inserción de los grupos tiol no cambie de forma importante las propiedades eléctricas de la enzima y haya una interacción CPO-tiol-E-amino semejante a la interacción CPO nativa-E-amino.

El E-arilamino también mostró interacción con la CPO nativa a pH 6, una interacción electrostática sería probable, debido a que bajo esas condiciones la enzima se encuentra cargada negativamente y los grupos arilamino parcialmente protonados (pKa alrededor de 6). La enzima unida al soporte presenta una actividad retenida del 98%.

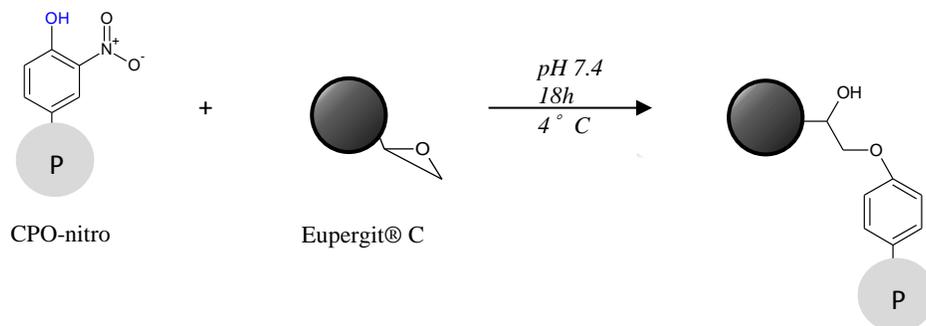
Por otro lado, en los dos casos, CPO nativa-E-amino y CPO nativa-E-arilamino, se observa la desorción de casi la totalidad de la enzima después de 12 horas de incubación en amortiguador de fosfatos pH 6, a temperatura ambiente y con ligera agitación. Es interesante resaltar la diferencia en la actividad retenida entre las dos preparaciones, 6 y 98% para CPO nativa-E-amino y CPO nativa-E-arilamino respectivamente.

El efecto de la capacidad de inmovilización del E-arilamino y el E-amino será analizado en las estrategias de inmovilización correspondientes.

## 7.4. Inmovilización de la CPO en los diferentes soportes

### 7.4.1. Inmovilización de CPO-nitro en Eupergit® C

Como una alternativa para la inmovilización covalente de la CPO a través de los residuos de tirosina, se modificaron dichos residuos con grupos nitro y se evaluó la inmovilización de la enzima modificada (CPO-nitro) en Eupergit® C (Figura 28).



**Figura 28. Inmovilización de CPO-nitro en Eupergit® C.**

Los residuos de nitrotirosina presentan un pKa menor con respecto al de la tirosina, 7 y 9 respectivamente (Wong, 1983). Si bien la reacción entre grupos epóxido e hidroxilo requiere de valores altos de pH, 11-12 (Hermanson, 2008), la modificación química en los residuos de tirosina de la enzima podría permitir que esta reacción se realice a valores de pH por debajo de los comunes. Por motivos de estabilidad de la cloroperoxidasa, 7.4 es el valor de pH máximo para inmovilización de CPO-nitro en Eupergit® C.

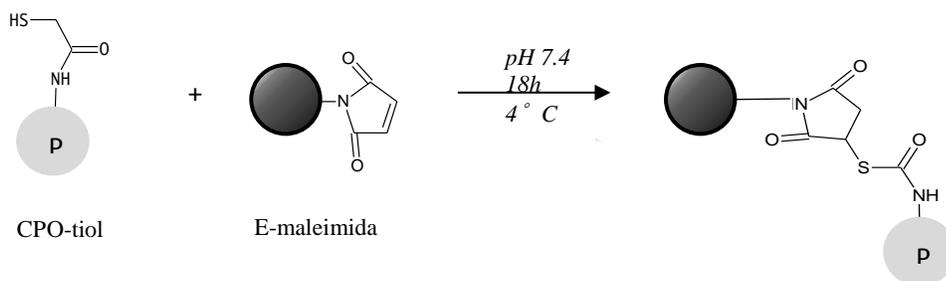
La reacción de inmovilización tuvo una duración de 18 h, sin embargo, no se detectó actividad en el soporte. Por otro lado, las mediciones de proteína y actividad remanentes en el sobrenadante indican que toda la enzima inicialmente presente se encuentra en solución.

Proponemos que el resultado anterior es producto del pH de reacción, que se encuentra lejos del óptimo, y sobre todo como se mencionó en la sección 7.2.1., del bajo porcentaje de tirosinas modificadas en la CPO-nitro.

### 7.4.2. Inmovilización de la CPO-tiol en E-maleimida

Las maleimidas son reactivos específicos para los grupos tiol, especialmente a pH por debajo de 7, donde otros nucleófilos se encuentran protonados. En esta reacción uno de los carbonos adyacentes al doble

enlace de la maleimida sufre ataque nucleofílico por el ion tiolato rindiendo un enlace tioéter estable (Figura 29, Wong, 1993).



**Figura 29. Inmovilización de CPO-tiol en E-maleimida**

Para la inmovilización de CPO-tiol en E-maleimida fueron utilizados 0.605 nmol de cloroperoxidasa, correspondientes a 14 U. De acuerdo a los ensayos de actividad realizados después de la reacción de inmovilización solamente  $1.6 \pm 0.3\%$  de la actividad inicial se encuentra en el soporte, mientras que prácticamente la totalidad de la enzima se encuentra en solución ( $106.1 \pm 1.2\%$  de la actividad inicial). Si bien el balance de actividad resulta en una cantidad de enzima final mayor a la inicial,  $107.7 \pm 1.1\%$ , debemos tomar en cuenta que el ensayo de actividad de la MCD es un método muy sensible que podría detectar una pequeña variación entre la toma de muestra (a partir de la solución stock de la cloroperoxidasa) para la medición de actividad y la toma de muestra para la inmovilización.

Apoyados en la discusión anterior podemos suponer que la cloroperoxidasa tanto en solución como inmovilizada conserva el 100% de su actividad y utilizando la actividad específica en el soporte,  $201 \pm 48 \text{ U/g}_{\text{soporte}}$ , podemos estimar que la carga de proteína es aproximadamente  $0.37 \pm 0.09 \text{ mg CPO/g}_{\text{soporte}}$ .

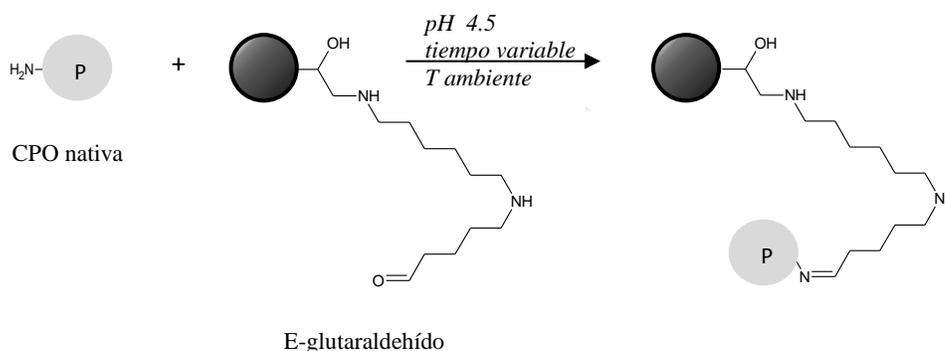
De acuerdo con la actividad retenida, logramos inmovilizar a la cloroperoxidasa específicamente a través de los grupos tiol introducidos por modificación química sobre los residuos K145 o K211. En principio, dichos residuos permiten la unión de la enzima de tal forma que la actividad no es afectada. Sin embargo de acuerdo a la cantidad de enzima inmovilizada la eficiencia de reacción es muy baja a pesar de ser realizada bajo condiciones óptimas.

Comparando los parámetros de inmovilización anteriores con los encontrados en la literatura (Tabla 1), esta estrategia de

inmovilización, a pesar de retener la totalidad de la actividad de la enzima, genera un biocatalizador con una actividad específica muy baja, resultando en una preparación poco ventajosa.

### 7.4.3. Inmovilización de CPO nativa en E-glutaraldehído

Este método de inmovilización fue diseñado con el objetivo de unir covalentemente la cloroperoxidasa nativa a un soporte activado con grupos aldehído (E-glutaraldehído), específicamente a través de residuos de lisina (Figura 30). En principio la localización de estos residuos permite la inmovilización de la enzima sin bloquear el acceso al sitio activo.

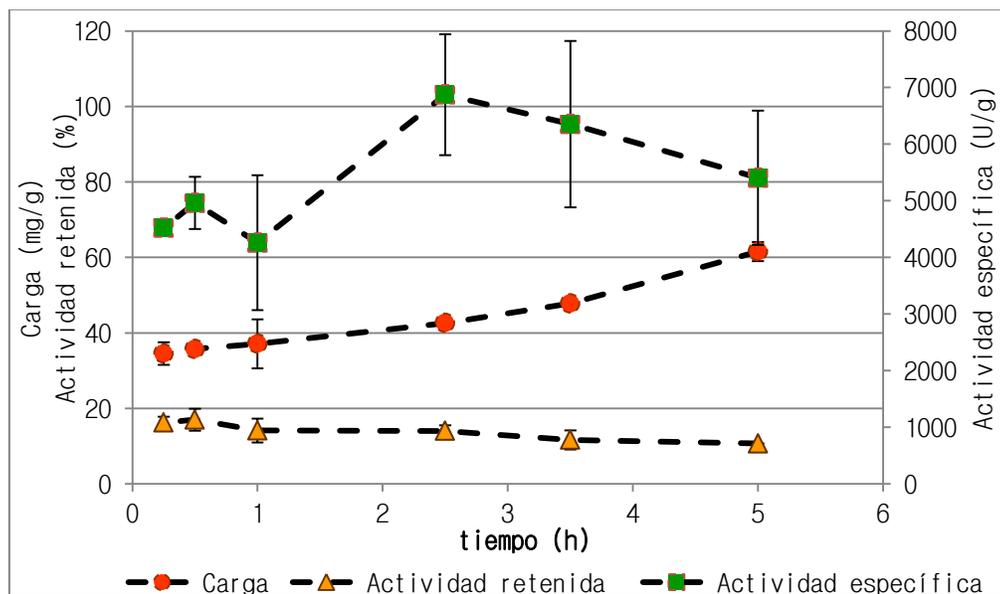


**Figura 30. Inmovilización de la CPO nativa en E-glutaraldehído.**

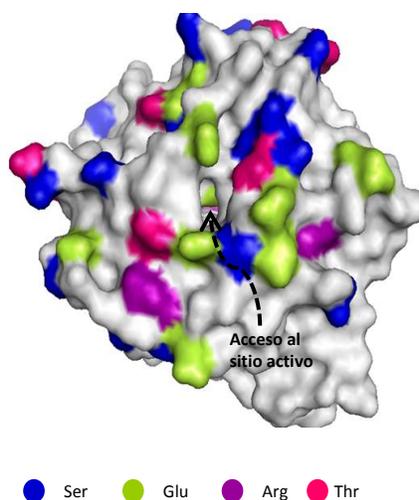
Fue observado un efecto importante del tiempo de reacción sobre la carga, la actividad retenida y por lo tanto sobre la actividad específica. Como puede verse en la Figura 31 la inmovilización de la enzima es muy rápida, encontrándose ya una carga de 35 mg CPO/g<sub>soporte</sub> a los 15 min de reacción y 62 mg CPO/g<sub>soporte</sub> a las 5 h. Sin embargo, la actividad retenida presenta un comportamiento inverso, disminuyendo de 16% a los 15 min a 11% a las 5 h. La combinación del aumento en la carga y la disminución en la actividad retenida lleva a un máximo en la actividad específica de 6,874 U/g<sub>soporte</sub> después de 2.5 h de reacción, siendo esta la preparación óptima.

Como se mencionó antes, esperábamos que la inmovilización específica a través de residuos de lisina resultara en la preservación de la actividad enzimática, sin embargo, los resultados anteriores muestran un alto porcentaje de inactivación. De acuerdo con el análisis de aminoácidos reportado por Ayala en el 2002, el tratamiento de la CPO con

glutaraldehído podría afectar a otros aminoácidos además de las lisinas: ácido glutámico, serina, treonina y arginina. Varios de estos residuos se encuentran muy cerca del acceso al sitio activo (Figura 32), por lo que si estos residuos son modificados durante la inmovilización, podrían conducir a una pérdida de actividad de la enzima.



**Figura 31.** Efecto del tiempo de inmovilización en la actividad retenida, carga y actividad específica de CPO nativa inmovilizada en E-glutaraldehído.



**Figura 32.** Residuos de aminoácidos que se ven afectados por el tratamiento de la CPO con glutaraldehído y mediante los cuales la cloroperoxidasa podría ser inmovilizada en E-glutaraldehído.

Por otro lado, la carga obtenida a las 5 h, 62 mg CPO/g soporte, refleja la alta capacidad de carga del Eupergit® C (100 mg proteína/g soporte). La carga óptima, 43 mg CPO/g soporte, se encuentra dentro de las mayores reportadas en inmobilizaciones covalentes de la CPO, que está entre 6-55 mg CPO/g soporte.

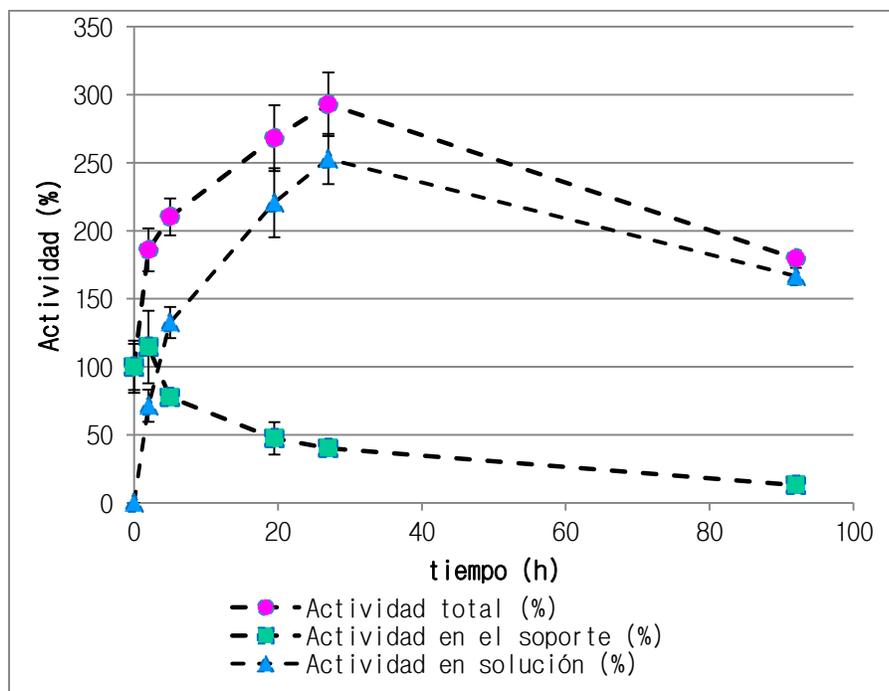
### *Estabilidad de la inmobilización*

Con la finalidad de evaluar la estabilidad de la unión CPO-E-glutaraldehído, se incubó el biocatalizador en amortiguador fosfatos 60 mM a pH 6, a temperatura ambiente y ligera agitación durante 92 h. La desorción se evaluó midiendo actividad enzimática tanto en el soporte como en la solución. Como puede verse en la Figura 33, el inmobilizado pierde el 50% de su actividad a las 20 h debido al despegado de la enzima, interesantemente la actividad encontrada en solución es mayor a la actividad perdida en el soporte. Los resultados anteriores sugieren que la enzima se encuentra unida a soporte de tal forma que su actividad se ve impedida, este efecto se revierte al ser liberada, por lo que la enzima en solución presenta una actividad específica mayor a la de la enzima en el soporte.

De acuerdo con observaciones de otros grupos (Walt y Agayn, 1994), bajo condiciones ácidas las bases de Schiff se degradan regenerando los grupos amino y aldehído que las forman. La desorción de la CPO podría deberse a la ruptura de las bases de Schiff entre los grupos amino del E-amino y el glutaraldehído o bien del glutaraldehído con los grupos amino de la lisinas. Para discernir entre las dos opciones anteriores se evaluó la estabilidad de las bases de Schiff en el E-glutaraldehído incubando el soporte durante 16 h bajo las condiciones de inmobilización, amortiguador acetatos pH 4.5, y en un medio altamente ácido, HCl 1 M.

La regeneración del glutaraldehído fue determinada midiendo el glutaraldehído en solución después del tratamiento por medio de su reacción con el reactivo de Schiff (ver el método en la sección 6.3.3.). Los resultados muestran que la cantidad de glutaraldehído en solución es despreciable tanto en condiciones de inmobilización como en medio altamente ácido e indican la estabilidad del E-glutaraldehído. Lo anterior nos permite concluir que la desorción de la enzima se debe a una

pérdida de interacción entre el E-glutaraldehído y la CPO, descartando también la adsorción de la CPO en grupos amino del E-amino (ver Tabla 8).



**Figura 33. Cinética de despegado de la CPO nativa unida al E-glutaraldehído.** Actividad total = Actividad en el soporte + Actividad en solución. Las actividades fueron determinadas utilizando monoclorodimedona como sustrato.

A diferencia de lo que comúnmente se cree, la química de la inmovilización de proteínas con glutaraldehído es compleja y va más allá de la formación de bases de Schiff, de hecho se ha visto que el glutaraldehído posee la capacidad de formar polímeros a los cuales se debe la estabilidad de inmovilización o entrecruzamiento de proteínas a través de residuos de lisina (Walt y Agayn, 1994).

Basados en el análisis de aminoácidos de la CPO tratada con glutaraldehído sugerimos que podría tratarse de una interacción débil entre el glutaraldehído y sus polímeros y los residuos de lisina, ácido glutámico, serina, treonina y arginina y no de la formación de bases de Schiff entre glutaraldehído y los residuos de lisina. La relevancia de las bases de Schiff en la estabilidad de la unión CPO-E-glutaraldehído fue evaluada estabilizando dichos enlaces mediante su reducción con cianoborohidruro. Como se muestra en la Tabla 8, el tiempo de desorción

indica que la desorción de la CPO es observada aun después de la estabilización de las bases de Schiff, sustentado la escasa relevancia de las bases de Schiff en la unión de la CPO al E-glutaraldehído. Cabe mencionar que la presencia del agente reductor propició la disminución del 32% de la carga, 2% de la actividad retenida y 44% de la actividad específica del biocatalizador.

**Tabla 8.** Evaluación de la reducción de las bases de Schiff con cianoborohidruro.

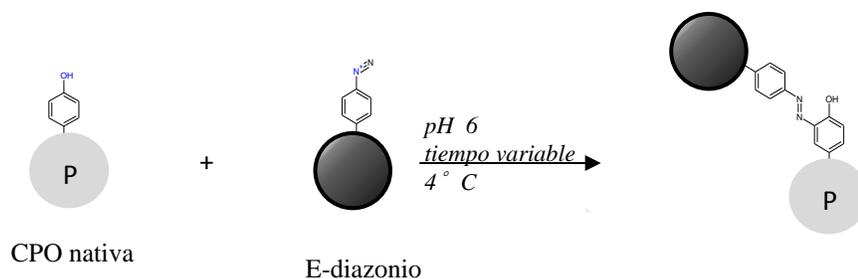
<b>CIANOBOROHIDRURO</b>	<b>Carga (mg CPO/g<sub>soporte</sub>)</b>	<b>Actividad retenida (%)</b>	<b>Actividad específica (U/g<sub>soporte</sub>)</b>	<b>60% de desorción (h)</b>
<b>POSITIVO</b>	42	9	3044	14
Desviación estándar	2	0.3	43	
<b>NEGATIVO</b>	62	11	5404	17
Desviación estándar	2	0.0	37	

Se incubó E-glutaraldehído en una relación molar CPO: grupos aldehído igual a 1:800 y una concentración final de la enzima de 13  $\mu$ M. En amortiguador fosfatos 60 mM a pH 4.5, a temperatura ambiente y ligera agitación durante 5 h. En presencia de 20 equivalentes molares de cianoborohidruro con respecto a la CPO en las muestras positivas.

En resumen, se obtuvo un biocatalizador con una actividad específica máxima de 6, 874 U/g<sub>soporte</sub>, equivalentes a 43 mg CPO/g<sub>soporte</sub> con 14% de actividad retenida. Es un biocatalizador que presenta desorción de la enzima, con un tiempo de liberación media de 20 h y que no se estabiliza en presencia de un agente reductor.

#### **7.4.4. Inmovilización en E-diazonio**

Las sales de diazonio son grupos altamente reactivos e inestables que reaccionan con compuestos que contienen hidrógeno activo, como el grupo fenol de las tirosinas a pH 8-10. La reacción es un ataque electrofílico del grupo diazonio hacia puntos ricos en electrones del compuesto fenólico, modificando las posiciones *orto* o *para* al grupo hidroxilo. En el caso de la tirosina, al encontrarse ya ocupada la posición *para*, la sustitución es en la posición *orto* (Figura 34, Hermanson, 2008).



**Figura 34. Inmovilización de la cloroperoxidasa nativa en E-diazonio a través de los residuos de tirosina.**

La inmovilización de la CPO nativa en E-diazonio en una relación molar CPO: iones diazonio igual a 1:20 fue evaluada a diferentes tiempos de inmovilización: 2, 4, 8 y 17 h. En todos los casos fue evaluado el porcentaje de actividad recuperada y como se muestra la Tabla 9 en todos los casos se obtuvieron valores cercanos al 100%.

**Tabla 9.** Resultados de la inmovilización de CPO nativa en E-diazonio a diferentes tiempos de reacción.

Tiempo (h)	Actividad recuperada (%)		Proteína en lavados (%)		Actividad específica (U/g)	
	Promedio	D.E.	Promedio	D.E.	Promedio	D.E.
2	96	1	100	1	12732	1160
4	98	0.3	100	3	12912	2164
8	92	2	121	3	22136	717
17	101	4	105	1	25040	7033

D.E.: desviación estándar.

Con la finalidad de estimar la carga de enzima en el soporte se cuantificó proteína en los lavados, sin embargo, en todos los casos la enzima cuantificada es prácticamente 100%. Los resultados anteriores impiden calcular la carga de proteína en el soporte y por ende su actividad retenida.

Por su parte la actividad en el soporte (actividad específica) fue medida a través del método de la monoclorodimedona, sin encontrar una relación entre el tiempo de inmovilización y la actividad específica. Si bien los valores promedio sugieren un aumento en la actividad específica proporcional al tiempo de inmovilización, las desviaciones estándar indican una variación importante en este parámetro. La explicación a la variación anterior podría encontrarse en la toma de muestra utilizada para la cuantificación de actividad en el soporte. El Eupergit C es un material insoluble que precipita rápidamente, lo que hace complicado mantenerlo homogéneo en solución. La toma de muestra para la medición de

actividad de la preparación CPO-E-diazonio se realiza tomado un volumen conocido del material en suspensión.

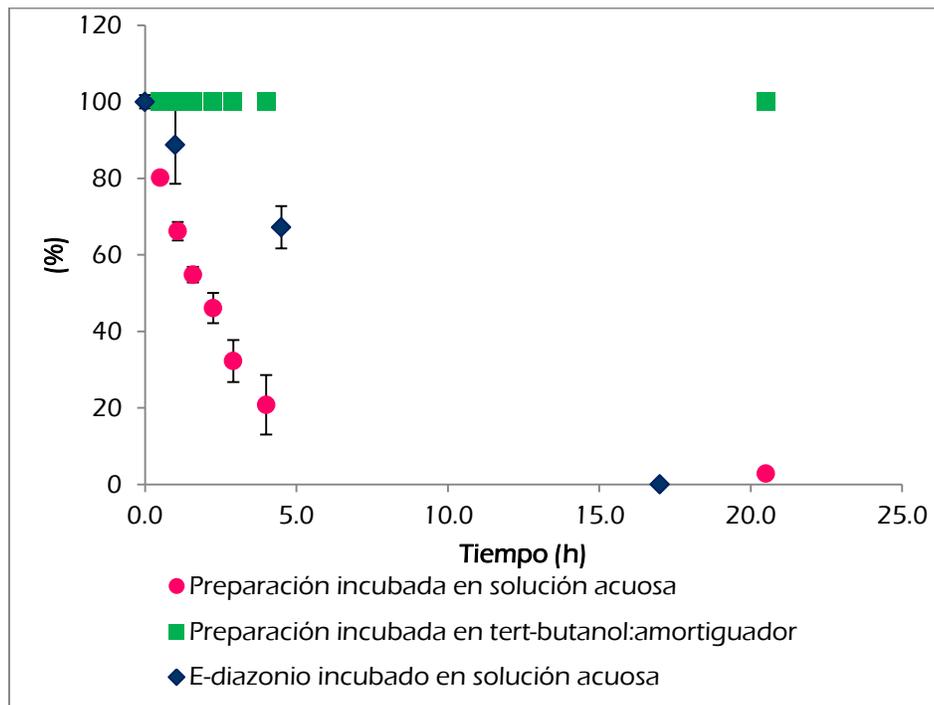
### *Estabilidad de la inmovilización*

En solución acuosa se ha observado la desorción de la enzima inmovilizada en E-diazonio (Figura 35), presentando un  $t_{1/2}$  de desorción de 2.5 h. Como puede verse en el apartado 6.5., la inmovilización se realizó a pH 6. Si bien existen reportes de inmovilización covalente de proteínas a través de la formación de enlaces *azo* a pH 6 (El-Masry *et al.*, 2001), se observa generalmente que la reacción entre grupos fenol (tirosinas) y iones diazonio tiene un pH óptimo entre 7 y 8 (Hermanson, 2008). En nuestro caso, es posible que a pH 6 las tirosinas de la cloroperoxidasa no sean lo suficientemente reactivas para la formación de un enlace covalente.

A pH 6 la cloroperoxidasa se encuentra cargada negativamente ( $pI=4$ ) mientras que los grupos funcionales diazonio poseen carga positiva. Por otro lado grupos diazonio son altamente inestables y reaccionan con agua generando grupos fenol. La información anterior sugiere la unión de la CPO al E-diazonio por adsorción iónica, y su inestabilidad podría deberse a la degradación de los iones diazonio. Para comprobar lo anterior, se determinó el contenido de iones diazonio en E-diazonio incubando en amortiguador a temperatura ambiente, a lo largo de varias horas (Figura 35). El tiempo de degradación total de los grupos funcionales es muy similar al tiempo de desorción total de la enzima, 17 y 22 h respectivamente.

Por otro lado, es importante considerar el efecto de los grupos arilamino residuales en la adsorción de la CPO en el E-diazonio. De acuerdo a la evaluación de los soportes intermediarios el E-arilamino con una DGF de  $940\pm 35$   $\mu\text{mol/g}$  presenta una actividad específica de  $1703\pm 48$  U/g. Tomando en cuenta en DGF arilamino residuales en el E-diazonio y suponiendo que la actividad específica es directamente proporcional a la DGF, podemos aproximar que 9% es el porcentaje máximo de actividad específica que podría deberse a los grupos arilamino.

El análisis anterior nos permite concluir que la unión de la CPO al E-diazonio se debe principalmente a la interacción iónica enzima-iones diazonio y en menor medida a la interacción enzima-grupos arilamino.



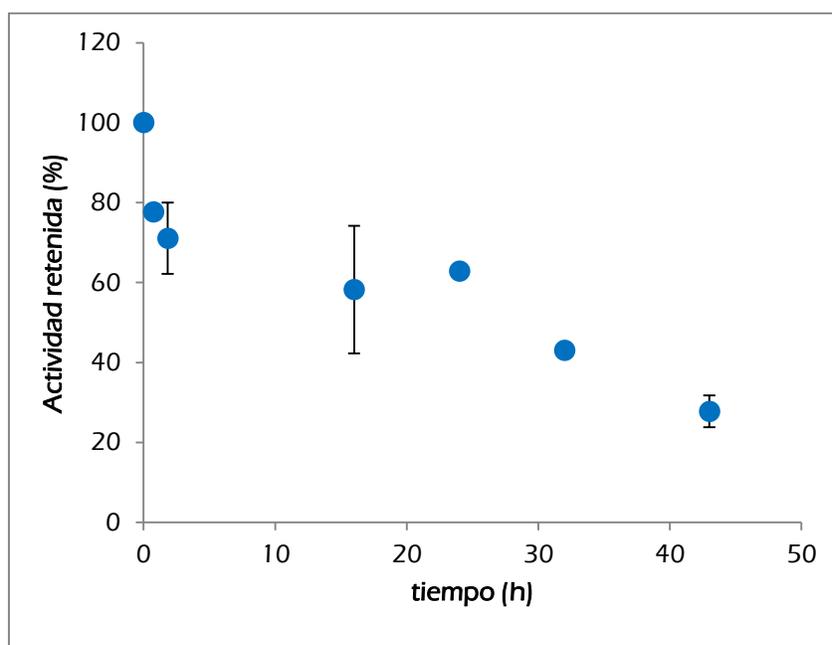
**Figura 35. Cinética de desorción de la cloroperoxidasa inmovilizada en E-diazonio y la degradación de iones diazonio.** Cuadrado: % de enzima unida al soporte al incubar en una mezcla de tert-butanol al 80% en amortiguador fosfatos 60 mM pH=6. Círculo: % de enzima unida al soporte durante su incubación en amortiguador fosfatos 60 mM pH=6. Rombo: % de iones diazonio en el E-diazonio incubado en amortiguador fosfatos 60 mM pH=6, tomando como 100% la DGF al momento de la activación.

Con la finalidad de estabilizar la unión CPO-E-diazonio se evaluaron tres estrategias. La primera de ellas fue realizar la reacción de inmovilización a un pH dentro del intervalo óptimo. La inmovilización de la cloroperoxidasa en E-diazonio a pH 7.4 durante 16 h resultó en una preparación con una actividad específica de  $363 \pm 135$  U/g. En este inmovilizado al igual que en los inmovilizados obtenidos a pH 6 se observó la desorción de la totalidad de la enzima.

La segunda estrategia se basó en la formación de una red de quitosano alrededor de las esferas del E-diazonio-CPO a través de la reacción de los grupos carboxilo de la cloroperoxidasa activados por carbodiimida con los grupos amino del quitosano y los grupos arilamino presentes en el E-diazonio. El recubrimiento de la cloroperoxidasa nativa con quitosano se ha realizado exitosamente en nuestro grupo de trabajo (Hernández, 2011). Al término de la reacción de recubrimiento se encontró el 85% de la

enzima en el medio de reacción. Esto indica que el tiempo de unión de la enzima al E-diazonio no es suficiente para permitir el recubrimiento con quitosano o bien no se forma la red esperada.

La tercera y última estrategia consistió en almacenar la preparación CPO-E-diazonio en un solvente donde la enzima no es soluble, lo que obliga a la enzima a mantenerse unida al soporte. Esta técnica se basa en antecedentes de actividad de la cloroperoxidasa en soluciones de tert-butanol/agua con contenidos por arriba del 70% de solvente orgánico en la sulfoxidación de tioanisol (99% de conversión y enantioselectividad) (van Deurzen *et al.*, 1994). Se incubó cloroperoxidasa en mezclas con 40, 60 y 80% de tert-butanol en amortiguador fosfatos 60 mM a pH=6. En estos ensayos pudo observarse la inactivación total de la enzima inmovilizada en las soluciones al 40 y 60 % después de 3 horas de incubación. En la solución 80% tert-butanol, la CPO presentó un  $t_{1/2}$  de 30 h (Figura 36) y no presentó desorción (Figura 35). Este sistema fue evaluado en la oxidación de guayacol y tioanisol, en el primer caso la enzima presenta una velocidad de reacción 295 veces menor a la encontrada en el sistema acuoso y en el segundo caso no presentó actividad.



**Figura 36. Curva de estabilidad de la preparación CPO-E-diazonio en una mezcla tert-butanol al 80% en amortiguador fosfatos pH 6 y 60 mM.**

En resumen se obtuvo un biocatalizador de cloroperoxidasa con alta actividad específica ( $18,205 \pm 5,480$  U/g) y estabilidad importante en un sistema 80% tert-butanol en amortiguador fosfatos 60 mM a pH 6 ( $t_{1/2}$  de 30

h). Este sistema podría ser interesante para el uso de sustratos hidrofóbicos que se encuentran limitados a sistemas acuosos.

### 7.5. Resumen de resultados

Se obtuvo cloroperoxidasa modificada con grupos tiol (CPO-tiol) a través de la reacción de los residuos de lisina con ácido ditiopropanoico mediada por carbodiimida con una actividad residual del 61%, aunque la eficiencia de modificación no ha sido determinada. En la literatura pueden encontrarse reportes de enzimas modificadas con grupos tiol a través de reactivos específicos para lisinas como el *N*-succinimidil-*S*-acetilpropionato. Mediante dicho reactivo se han modificado enzimas como la peroxidasa de rabano blanco de *Armoracia rusticana*, la  $\alpha$ -glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* y la colagenasa de *Clostridium histolyticum* introduciendo  $6\pm 3$ ,  $5\pm 1$  y  $23\pm 12$  grupos tiol por molécula de proteína con el 100% de actividad retenida (Kuhn *et al.*, 2007). Sin embargo, las condiciones de modificación requieren un pH entre 7 y 9 a temperaturas entre 4 y 37°, si bien la modificación de la cloroperoxidasa podría realizarse a pH 7.4 y 4°C (condiciones que se encuentran en el límite de estabilidad de la enzima) en este trabajo se optó por un método de modificación alternativo que pudo realizarse bajo las condiciones de estabilidad de la cloroperoxidasa.

Además se obtuvo cloroperoxidasa modificada con grupos nitro con una eficiencia del 5% y actividad retenida del 87%. Dicha modificación fue realizada a través de la incubación de la proteína con tetranitometano a pH 7 y 4°C. Esta reacción ha mostrado ser muy eficiente a pH por arriba de 8, obteniéndose prácticamente el 100% de modificación en proteínas como la insulina, ribozima, lisozima, BSA, ovalbúmina, carboxipeptidasa A y el pepsinógeno (Sokolovsk *et al.*, 1966). Debido a la inestabilidad de la cloroperoxidasa a pH por arriba del neutro, la modificación no pudo realizarse dentro de las condiciones óptimas, lo cual se ve reflejado en la baja eficiencia de modificación.

Por otro lado, los métodos de activación del Eupergit® C desarrollados en este trabajo mostraron ser muy eficientes, permitiendo generar soportes activados con grupos amino alifáticos, arilamino, maleimida, glutaraldehído, y diazonio con densidades de grupos funcionales altas,  $1,933\pm 163$ ,  $940\pm 35$ ,  $330\pm 58$ ,  $2,751\pm 97$  y  $1,471\pm 130$ , respectivamente. Además,

fueron estandarizados métodos simples para la determinación de la densidad de grupos funcionales en cada uno de los materiales mencionados.

Por último, se generaron 3 biocatalizadores a base de cloroperoxidasa (Tabla 10). El primero de ellos es CPO nativa adsorbida en E-diazonio con alta actividad específica ( $18,205 \pm 5,480$  U/g), que en sistemas acuosos presenta un tiempo medio de desorción de 2 h mientras que en mezclas tert-butanol: amortiguador (por ejemplo 80:20 v/v) no se desorbe. La preparación anterior podría ser un biocatalizador con aplicaciones interesantes en estos medios; cabe mencionar que una limitante en el uso de la cloroperoxidasa a nivel industrial es la baja solubilidad de muchos sustratos de interés en sistemas acuosos. El segundo biocatalizador es CPO nativa inmovilizada en E-glutaraldehído, que presenta un tiempo medio de desorción de 20 h, este tiempo podría resultar suficiente para la utilización del biocatalizador; cabe mencionar que la actividad específica de esta preparación es alta ( $6,874 \pm 1,469$  U/g) y que el procedimiento para su obtención es corto y sencillo. El tercer biocatalizador es CPO-tiol unida covalentemente a E-maleimida, este biocatalizador presenta una actividad específica muy baja ( $201 \pm 48$  U/g) pero aparentemente preserva la actividad de la enzima, por lo que su caracterización en términos de su estabilidad sería interesante.

**Tabla 10.** Biocatalizadores obtenidos

Método de inmovilización	Soporte	CPO	Actividad retenida (%)	Carga ( $\text{mg}_{\text{CPO}}/\text{g}$ )	Actividad específica (U/g)	t $\frac{1}{2}$ de desorción (h)
Adsorción	E-diazonio	Nativa	N.D.	N.D.	$18,205 \pm 5,480$	2
Adsorción	E-glutaraldehído	Nativa	14	43	$6,874 \pm 1,469$	20
Covalente	E-maleimida	CPO-tiol	100	0.4	$201 \pm 48$	N.D.

N.D.: no determinado.

Cabe mencionar que las estrategias de inmovilización planteadas en este trabajo ya han sido utilizadas para la inmovilización de algunas enzimas, incluso la cloroperoxidasa ya ha sido inmovilizada a través de glutaraldehído (Tabla 11). Además de este trabajo existen dos reportes de inmovilización de la cloroperoxidasa con glutaraldehído (Bayramoglu *et al.*, 2008 y Wang *et al.*, 2009). Interesantemente, la técnica de inmovilización de Wang y colaboradores 2009 resulta en una buena carga (16 mg/g) y 100% de actividad retenida, a diferencia de Bayramoglu y colaboradores 2008 que obtienen una carga muy baja (2.2 mg /g) y una actividad retenida del 58%, y de este trabajo donde a pesar de obtenerse una carga alta (43 mg/g) la actividad retenida es de solo el 14%. Las

condiciones de inmovilización pueden descartarse como un factor relevante ya que fueron las mismas tanto en este trabajo como en el reporte de Wang y colaboradores, sin embargo, la carga y la actividad retenida son distintas. Por otro lado, el soporte utilizado por Wang y colaboradores y por Bayramoglu y colaboradores es básicamente el mismo y también se observan resultados distintos. Por último es importante mencionar que sólo en nuestro trabajo se ha observado la desorción de la enzima y es donde se obtiene la mayor carga de enzima por unidad de soporte.

La diferencia de carga es un resultado esperado debido a que el soporte utilizado en los casos citados no es el mismo y por lo tanto la densidad de grupos aldehído a los que puede unirse la enzima debe ser distinta. Sin embargo, también sería sugerido que al utilizarse el mismo entrecruzante la enzima sea unida al soporte de la misma forma y por lo tanto su actividad retenida sea similar en todos los casos. De forma contraria y como muestra la variabilidad de resultados de los ejemplos citados, la unión de la enzima al soporte va más allá de la interacción de la enzima con el grupo funcional con que se ha activado el soporte y existen más factores relevantes difíciles de predecir al hacer un diseño racional de inmovilización. Estos factores son probablemente interacciones de tipo no covalente entre la enzima y partes inertes del material e incluso del mismo entrecruzante.

Tabla 11. Reportes de inmovilización de la cloroperoxidasa a través de glutaraldehído.

<b>Soporte</b>	<b>Condiciones de inmovilización</b>	<b>Resultados</b>	<b>Referencia</b>
Microesferas magnéticas deacrílico porosas con núcleos de óxido de hierro y activadas con glutaraldehído.	pH 6 a 15°C	Carga: 2.2 mg/g Actividad retenida: 58%	Bayramoglu <i>et al.</i> , 2008
Nanoesferas magnéticas acrílicas con un único núcleo de óxido de hierro activadas con grupos amino.	pH 4.75 a temperatura ambiente en presencia de glutaraldehído.	Carga: 16.1 mg/g Actividad retenida: 100%	Wang <i>et al.</i> , 2009
Eupergit C activado con glutaraldehído.	pH 4.75 a temperatura ambiente	Carga: 43 mg/g Actividad retenida: 14%	Este trabajo

Por otro lado, si bien en este trabajo la inmovilización de la cloroperoxidasa en un soporte activado con iones diazonio se debió a una interacción iónica, en la literatura pueden encontrarse algunos ejemplos

de enzimas inmovilizadas covalentemente en este tipo de soportes. Por ejemplo, la amilasa fúngica, la  $\beta$ -galactosidasa y la fosfatasa ácida con cargas de 8, 2 y 70 mg proteína/g soporte y actividades retenidas del 73, 63 y 46% respectivamente (Tabla 12). Recordando que las proteínas son moléculas complejas, con composición de aminoácidos y estabilidad distintas, y que la interacción de estas con el soporte va más allá del grupo reactivo con el que el soporte está activado, es esperado también que exista variabilidad tanto en carga como en actividad retenida.

Tabla 12. Ejemplos de enzimas inmovilizadas en soportes activados con iones diazonio.

Enzima	Soporte	Condiciones de inmovilización	Resultados	Referencia
Amilasa fúngica	Perlas de vidrio	pH 7, ligera agitación, 4-10°C, por 48 h	Carga: 8 mg/g Actividad retenida: 73%	Rani <i>et al.</i> , 2007
$\beta$ -galactosidasa de <i>Aspergillus oryzae</i>	Membranas de Nylon	pH 6.5, 4°C por 16 h	Carga: 2 mg/g Actividad retenida: 63%	El-Masry <i>et al.</i> , 2001
Fosfatasa ácida de papa	AlPO <sub>4</sub>	pH 5.6. durante 24 h.	Carga: 70 mg/g Actividad retenida: 46%	Bautista <i>et al.</i> , 1999

La inmovilización de enzimas a través de grupos tiol es menos común debido a las pocas proteínas que presentan residuos de cisteína en contacto con el solvente, sin embargo, los grupos tiol pueden ser introducidos por modificación química o mutación del gen de la proteína (Blank *et al.*, 2006 y Kuhn *et al.*, 2007). Por ejemplo, la peroxidasa de rabano blanco de *A. rusticana*, la  $\alpha$ -glucosidasa de *S. cerevisiae* y la colagenasa de *C. histolyticum* fueron modificadas químicamente con grupos tiol e inmovilizadas simultáneamente en partículas magnéticas de óxido de hierro y sílica-dextrano activadas con grupos maleimida (Kuhn *et al.*, 2007). En el trabajo mencionado se obtuvieron cargas de 0.002, 0.034, 0.021 mg proteína/g soporte para la peroxidasa de rabano blanco, la  $\alpha$ -glucosidasa y la colágenasa respectivamente. La actividad de las enzimas

no se vio afectada por el proceso de inmovilización. Estos resultados son similares a los obtenidos en la inmovilización de la CPO-tiol en E-maleimida, donde si bien la eficiencia de la reacción es baja ( $0.4 \text{ mg}_{\text{CPO}} / \text{g}_{\text{soporte}}$ ) esta no afecta la actividad de la enzima. De acuerdo a los resultados encontrados en la literatura y este trabajo podemos decir que este método de inmovilización si bien es poco eficiente también es muy específico y puede ser de gran utilidad en preparaciones donde no se busque una alta carga de enzima, por ejemplo en biosensores.

## 8. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En este trabajo fue planteado que la obtención de un biocatalizador a base de cloroperoxidasa con una alta actividad específica, podría lograrse a través de tres elementos: i) inmovilizando a la enzima específicamente a través de residuos de aminoácidos alejados del acceso al sitio activo; ii) dichos aminoácidos deben ser reactivos bajo condiciones de estabilidad de la cloroperoxidasa; y iii) utilizar un soporte con alta densidad de grupos funcionales.

Con base en esta hipótesis fueron diseñadas cuatro estrategias de inmovilización covalente, cada una de ellas evidencia parcialmente la importancia de los elementos señalados en el diseño de este trabajo. Por ejemplo, la retención del 100% de la actividad de la CPO-tiol inmovilizada en E-maleimida indica que la inmovilización específica a través de residuos de aminoácidos alejados del acceso al sitio activo preserva la actividad de la cloroperoxidasa. La inmovilización de CPO nativa en E-glutaraldehído, indica que el uso de un soporte con alta densidad de grupos funcionales permite una carga alta. Por último, todas las estrategias evidenciaron la baja reactividad de los aminoácidos seleccionados, a pesar de cumplir con los criterios de estar expuestos al solvente, no presentar interacciones que impidieran su modificación (aparentes en la estructura cristalográfica) y estar alejados del sitio activo. Por ejemplo, el bajo porcentaje de modificación de la cloroperoxidasa con grupos nitro y la dificultad de obtener cloroperoxidasa unida covalentemente al E-diazonio señala que los residuos de tirosina no son aminoácidos reactivos a las condiciones utilizadas. Por otro lado, los residuos de lisina pudieron ser modificados, sin embargo, la inmovilización covalente a través de los residuos modificados (CPO-tiol) resultó en una carga baja y a través de residuos nativos (sobre E-glutaraldehído) resultó en una interacción inestable. Es importante hacer notar que con la finalidad de preservar la actividad de la enzima en ocasiones fue necesario realizar la reacción de modificación o de inmovilización fuera de las condiciones óptimas.

Tomando en cuenta que la modificación de las lisinas con grupos tiol permitió la inmovilización específica de la CPO sin disminuir su actividad catalítica, es necesario realizar la cuantificación de grupos tiol en la CPO-tiol con métodos alternativos, como el de Ellman (Ellman, 1958), que permitan determinar la eficiencia de modificación del método desarrollado en este trabajo. Además de probar el uso de otros

reactivos específicos para grupos amino, como aldehído y succinimida de cadena larga que permitan cierta libertad para la unión de la enzima y sean más accesibles. Por ejemplo sería interesante la unión de cadenas simples y largas de DNA o RNA a las lisinas de la CPO, las cuales podrían permitir la fácil inmovilización de la enzima en materiales activados con las cadenas complementarias.

El análisis de aminoácidos y el número de estrategias probadas en este trabajo consideramos son suficientes para concluir que la carencia residuos de aminoácidos reactivos bajo condiciones de estabilidad de la cloroperoxidasa y con una ubicación adecuada, es la principal limitante para el tratamiento químico de dicha enzima. Por lo que es importante considerar técnicas inmovilización que no impliquen la formación de enlaces covalentes y la unión de la enzima a través de un sitio específico. Como una alternativa proponemos la formación de agregados de CPO en tert-butanol donde se ha observado que la enzima es estable y el confinamiento de los mismos en una membrana con tamaño de poro menor al tamaño de la proteína. Esta técnica en comparación al confinamiento de la CPO en solución presenta la ventaja de disminuir el volumen del catalizador, sin embargo, podría ser poco útil para reacciones de tipo peroxidasa donde se producen polímeros que al acumularse terminarían con la vida útil del biocatalizador. Para el caso de reacciones de tipo peroxidasa podría confinarse CPO en solución en una membrana con las mismas características que al ser de mayor volumen permita la acumulación polímeros, lo que además podría ser interesante si se busca la síntesis de polímeros largos, ya que su concentración en la membrana podría aumentar la probabilidad de polimerización de los radicales. Estos métodos permitirían la generación de un biocatalizador básicamente con las mismas propiedades catalíticas de la CPO nativa.

## 9. REFERENCIAS

Aburto J., Ayala M., Bustos-Jaimes I. *et al.* (2005) Stability and catalytic properties of chloroperoxidase immobilized on SBA-16 mesoporous materials. *Microporous and mesoporous materials* 83: 193 – 200

Águila S., Vazquez-Duhalt R., Covarrubias C. *et al.* (2011) Enhancing oxidation activity and stability of iso-1-cytochrome c and chloroperoxidase by immobilization in nanostructured supports. *Journal of molecular catalysis B: enzymatic* 70: 81 – 87

Aoun S., Chebli C., y Baboulene M. (1998) Noncovalent immobilization of chloroperoxidase onto talc: catalytic properties of a new biocatalyst. *Enzyme and microbial technology* 23: 380 – 385

Ayala M. (2002) Obtención y caracterización de cristales catalíticos de cloroperoxidasa. Tesis doctoral. Instituto de Biotecnología UNAM. Cuernavaca Morelos, México: 72

Ayala M., Batista V. y Vázquez-Duhalt R. (2011) Heme destruction, the main molecular event during the peroxide-mediated inactivation of chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago*. *Journal of biological inorganic chemistry* 16: 63 – 68

Bakker M., van de Velde F., van Rantwijk F. *et al.* (2000) Highly efficient immobilization of glycosylated enzymes into polyurethane foams. *Biotechnology and bioengineering* 70: 342-348

Bautista F., Bravo M., Campelo J. *et al.* (1999) Covalent immobilization of acid phosphatase on amorphous AlPO<sub>4</sub> support. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 6: 473 – 481

Bengtson P., Bastviken D., de Boer W. *et al.* (2009) Possible role of reactive chlorine in microbial antagonism and organic matter chlorination in terrestrial environments. *Environmental microbiology* 11: 1330 – 1339

Beyer H (1987) Manual de química orgánica. Barcelona: Editorial Reverté: 619.

Blank K., Morfill J. y Gaub H. (2006) Site-specific immobilization of genetically engineered variants of *Candida antarctica* lipase B. *ChemBioChem* 7: 1349 – 1351

Borole A., Dai S., Cheng C. *et al.* (2004) Performance of chloroperoxidase stabilization in mesoporous sol-gel glass using in situ glucose oxidase peroxide generation. *Applied biochemistry and biotechnology* 113: 273-285

Bornscheuer U. (2003) Immobilizing enzymes: how to create more suitable biocatalyst. *Angewandte chemie* 42: 3336 – 3337

Bruns N. y Tiller J. (2005) Amphiphilic network as nanoreactor for enzymes in organic solvents. *Nano letters* 5:45-48

Cao L. (2005) Immobilised enzymes: science or art?. *Current opinion in chemical biology* 9: 217-226

Conesa A., van de Velde F., van Rantwijk F. *et al.* (2001) Expression of the *Caldariomyces fumago* chloroperoxidase in *Aspergillus niger* and characterization of the recombinant enzyme. *The journal of biological chemistry* 276: 17635-17640

de Hoog H., Nallani M., Cornelissen J., *et al* (2009) Biocatalytic oxidation by chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago* in polymersome nanoreactors. *Organic and biomolecular chemistry* 7:4604-4610

Dembitsky V. (2003) Oxidation, epoxidation and sulfoxidation reactions catalysed by haloperoxidases. *Tetrahedron* 59: 4701-4720

Ellman G. (1958) A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans. *Archives of biochemistry and biophysics* 74: 443-459

El-Masry M., De Maio A., Martelli P. *et al.* (2001) Influence of the immobilization process on the activity of galactosidase bound to Nylon membranes grafted with glycidyl methacrylate Part 1. Isothermal behavior. *Journal of molecular catalysis B: enzymatic* 16: 175-189

Elovson G., Hedström M. y Adlercreutz P. (2007) A mass spectrometric investigation of native and oxidatively inactivated chloroperoxidase. *ChemBioChem* 8: 1055 - 1062

Griffin R. (1981) *Química orgánica moderna*. Reverté: 438-439.

Hager L. and Morris D. (1966) Chloroperoxidase I. Isolation and properties of the crystalline glycoprotein. *Journal of biological chemistry* 241: 1763-1768

Hager L., Morris D., Brown F. *et al.* (1966) Chloroperoxidase II. Utilization of halogen anions. *Journal of biological chemistry* 241: 1769-1777

Han Yong., Watson J., Stucky G. *et al.* (2002) Catalytic activity of mesoporous silicate-immobilized chloroperoxidase. *Journal of molecular catalysis B: enzymatic* 17: 1-87

Hansen R., Østergaard H., Nørgaard P. *et al.* (2007) Quantification of protein thiols and dithiols in the picomolar range using sodium borohydride and 4,4'-dithiodipyridine. *Analytical biochemistry* 363:77-82

Hallenberg P. y Hager L. (1978) Purification of chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago*. *Methods in enzymology* 264: 521-529.

Hartmann M. (2005) Ordered mesoporous materials for bioadsorption and biocatalysis. *Chemistry of materials* 17: 4577-4593

Hartmann M. y Streb C. (2006) Selective oxidation of indole by chloroperoxidase immobilized on the mesoporous molecular sieve SBA-15. *Journal of porous materials* 13: 347-352

Hermanson G. (2008) Bioconjugate techniques 2a edición. Elsevier: 176-178, 217-228

Hernández E. (2011) Diseño de un biocatalizador tricomponente para la desulfuración en medios orgánicos. Tesis de Maestría. Instituto de Biotecnología UNAM. Cuernavaca Morelos, México: 22

Hofrichter M. y Ullrich R. (2006) Heme-thiolate haloperoxidases: versatile biocatalysts with biotechnological and environmental significance. *Applied microbiology and biotechnology* 71: 276-288

Hofrichter M., Ullrich R., Pecyna M. *et al.* (2010) New and classic families of secreted fungal heme peroxidases. *Applied microbiology and biotechnology* 87: 871-897.

Jung D., Paradiso M., Wallacher D. *et al.* (2009) Formation of cross-linked chloroperoxidase aggregates in the pores of mesocellular foams: characterization by SANS and catalytic properties. *ChemSusChem* 2: 161 - 164

Katchalski-Katzir E. y Kraemer D. (2000) Eupergit® C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. *Journal of molecular catalysis B: enzymatic* 10: 157 - 176

Kenigsberg P., Fang G. y Hager L. (1987) Post-translational modifications of chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago*. *Archives of biochemistry and biophysics* 254, 2: 409-415

Knopkar S. (1998) Basic concepts of analytical chemistry. New age international publishers, 2<sup>nd</sup> edición: 57-58

Kühnel K., Derat E., Terner J. *et al.* (2007) Structure and quantum chemical characterization of chloroperoxidase compound 0, a common reaction intermediate of diverse heme enzymes. *Proceedings of the national academy of sciences* 104: 99-104

Migneault I., Dartiguenave C., Bertrand M. *et al.* (2004) Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *Biotechniques* 37: 790-802

Nuell M., Fang G., Axley M. *et al.* (1988) Isolation and nucleotide sequence of the chloroperoxidase gene from *Caldariomyces fumago*. *Journal of bacteriology*: 1007-1011

Libby R., Rotberg N. y Emerson J. (1989) The chloride-activated peroxidation of catechol as a mechanistic probe of chloroperoxidase reactions. *The journal of biological chemistry* 264: 15284-1529

Lifei Z., Yucheng J., Yingsong W. *et al.* (2007) Effects of additives on the thermostability of chloroperoxidase. *Biotechnology Progress* 23: 729-733

Longoria A., Tinoco R. y Torres E. (2010) Enzyme technology of peroxidases: immobilization, chemical and genetic modification. *Biocatalysis based on hemo peroxidases* 9: 209-214

Montiel C., Terrés E., Domínguez J. *et al.* (2007) Immobilization of chloroperoxidase on silica-based materials for 4,6-dimethyl dibenzothiophene oxidation. *Journal of molecular catalysis B: enzymatic* 48: 90-98

Murali M. y Hager L. (2001) Utilization of peroxide and its relevance in oxygen insertion reactions catalyzed by chloroperoxidase. *Biochimica et Biophysica* 1547:408-417

Neidleman S. (1975) Microbial halogenation. *CRC Criticool reviews in microbiology*: 333-358

Ortiz de Montellano P. (2001) Catalytic mechanisms of heme peroxidases. . Biocatalysis based on hemo peroxidases 5: 78-88

Ouzounis C., Coulson R., Enright A. *et al.* (2003) Classification schemes for protein structure and function. *Nature publishing group* 4: 508-519.

Petri A., Gambicorti T. y Salvadori P. (2004) Covalent immobilization of chloroperoxidase on silica gel and properties of the immobilized biocatalyst. *Journal of molecular catalysis B: enzymatic* 27:103-106

Pickard M., Kadima T. y Carmichael R. (1991) Chloroperoxidase, a peroxidase with potential. *Journal of industrial microbiology* 7: 235-242

Rani P., Sharma M., Kumar V. *et al.* (2007) Immobilization of amylase onto arylamine glass beads affixed inside a plastic beaker: kinetic properties and application. *Indian journal of biotechnology* 6: 230-233

Rimington C. (1960) Spectral-absorption coefficients of some porphyrins in the solet-band region. *Biochemical journal* 75: 620-623

Scigelova M., Green P., Giannakopoulos A. *et al.* (2001) A practical protocol for the reduction of disulfide bonds in proteins prior analysis by mass spectrometry. *European journal of mass spectrometry* 7: 29-34

Sheldon R. (2007) Enzyme immobilization: the quest for optimum performance. *Advanced Synthesis and Catalysis* 349: 1289 - 1307

Sokolovsky M., Riordan J. y Vallee B. (1966) Tetranitromethane. A reagent for the nitration of tyrosyl residues in proteins. *Biochemistry* 5: 3582-3589

Stone K., Behan R. y Green M. (2005). X-ray absorption spectroscopy of chloroperoxidase compound I: insight into the reactive intermediate of P450 chemistry. *Proceedings of the national academy of sciences* 102: 16563 - 16565

Stone K., Behan R. y Green M. (2006) Resonance raman spectroscopy of chloroperoxidase compound II provides direct evidence for the existence of an iron(IV)-hydroxide. *Proceedings of the national academy of sciences* 103: 12307 - 12310

Sundaramoorthy M., Turner J. y L. P. (1995) The crystal structure of chloroperoxidase: a heme peroxidase-cytochrome P450 functional hybrid. *Structure* 3: 1367-1377

Terrés E., Montiel M., Le Borgne S. *et al.* (2008) Immobilization of chloroperoxidase on mesoporous materials for the oxidation of 4,6-

dimethyldibenzothiophene, a recalcitrant organic sulfur compound present in petroleum fractions. *Biotechnology letters* 30: 173-179

Trujillo B. (2010) Diseño de un biocatalizador activo en presencia de solventes polares empleando peroxidasas. Tesis de Maestría. Instituto de Biotecnología UNAM. Cuernavaca Morelos, México: 37-47

van Deurzen M., Groen B., van Rantwijk F. *et al.* (1994) A simple purification method for chloroperoxidase and its use in organic media. *Biocatalysis and biotransformation* 10: 247-255

van Pée K. (2001) Microbial biosynthesis of halometabolites. *Archives of microbiology* 175 :250 - 258

Valderrama B., Ayala M. y Vázquez-Duhalt R. (2002) Suicide inactivation of peroxidases and the challenge of engineering more robust enzymes. *Chemistry and biology* 9: 555 - 565

Veselova I., Kireiko A. y Shekhovtsova T. (2009) Catalytic activity and the stability of horseradish peroxidase increase as a result of its incorporation into a polyelectrolyte complex with chitosan. *Applied biochemistry and microbiology* 45: 125-129

Wagenknecht H. y Woggon W. (1997) Identification of intermediates in the catalytic cycle of chloroperoxidase. *Chemistry and Biology* 4: 367-372

Walt D. y Agayn V. (1994) The chemistry of enzyme and protein immobilization with glutaraldehyde. *Trends in analytical chemistry* 13: 425-30

Wang W., Xu Y., Wang D. *et al.* (2009) Recyclable nanobiocatalyst for enantioselective sulfoxidation: facile fabrication and high performance of chloroperoxidase-coated magnetic nanoparticles with iron oxide core and polymer shell. *Journal of the american chemical society* 131:12892 - 12893

Waterhouse A. (2002) Current protocols in food analytical chemistry. John Wiley and sons, Inc.: 11.1

Welinder K. (1992) Superfamily of plant, fungal, and bacterial peroxidases. *Current opinion in structural biology* 2: 388-393

Wong S. (1993) Chemistry of protein conjugation and cross-linking. CRC Press LLC: 1 - 40

Zámoký M. y Obinger C. (2010) Molecular phylogeny of heme peroxidases. *Biocatalysis based on hemo peroxidases* 2: 7-3

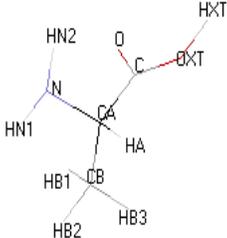
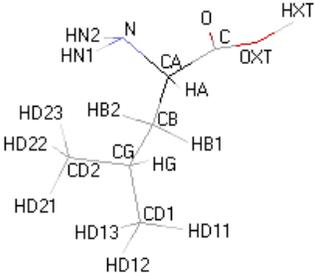
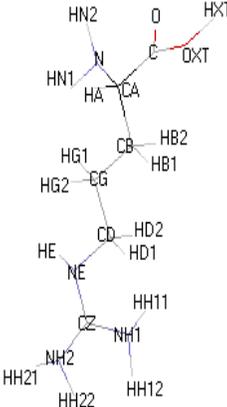
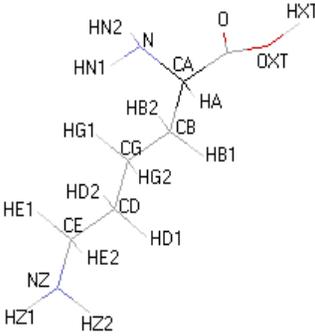
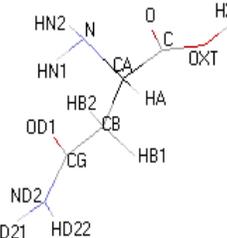
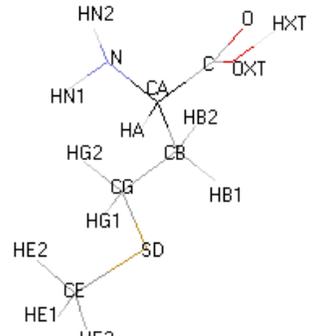
[http://www.imgt.org/IMGTeducation/Aide-memoire/\\_UK/aminoacids/formuleAA/#MLformula](http://www.imgt.org/IMGTeducation/Aide-memoire/_UK/aminoacids/formuleAA/#MLformula)

## 10. ANEXO

### 10.1. Nomenclatura atómica de los aminoácidos

El diseño racional de una estrategia de inmovilización requiere del análisis de la estructura tridimensional de la proteína a inmovilizar, por lo que es importante el conocimiento de la nomenclatura de los átomos de los aminoácidos, esta es mostrada en la Tabla 1.

Tabla 1. Nomenclatura de los aminoácidos y sus átomos.

Aminoácido	Nomenclatura de sus átomos	Aminoácido	Nomenclatura de sus átomos
Alanina		Leucina	
Arginina		Lisina	
Asparagina		Metionina	

<p>Ácido aspártico</p>		<p>Fenilalanina</p>	
<p>Cisteína</p>		<p>Prolina</p>	
<p>Glutamina</p>		<p>Serina</p>	
<p>Ácido glutámico</p>		<p>Treonina</p>	
<p>Glicina</p>		<p>Triptófano</p>	

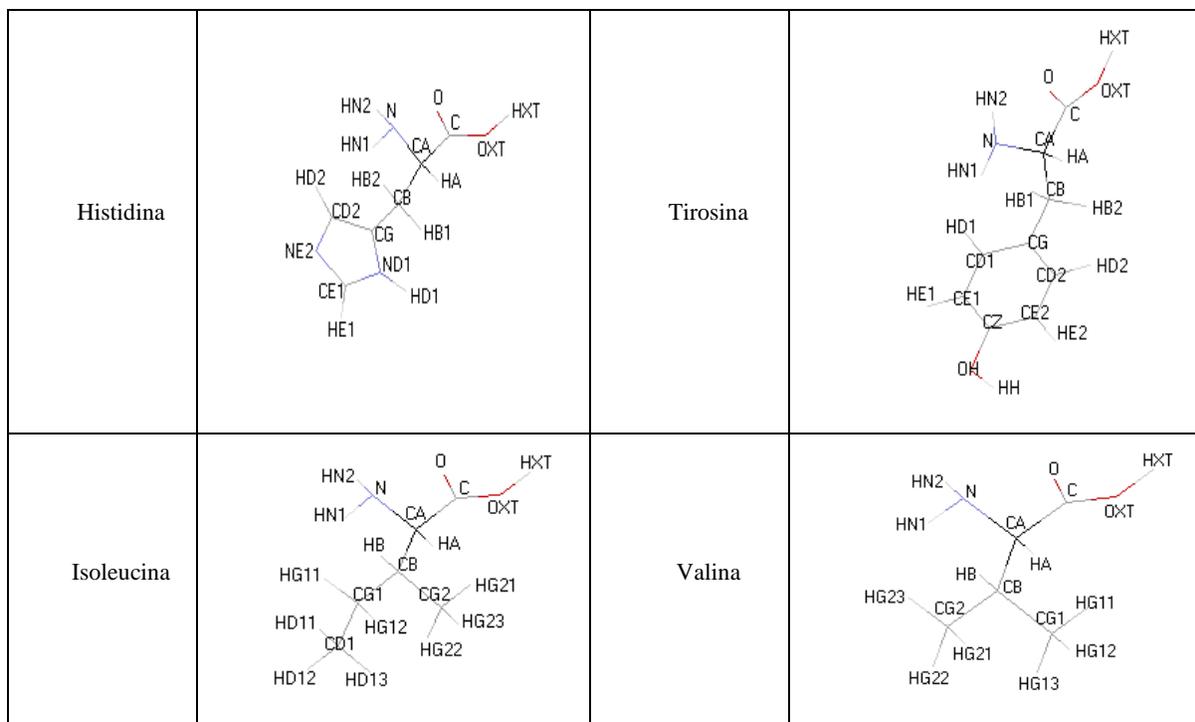


Tabla adaptada de [http://www.imgt.org/IMGTeducation/Aide-memoire/\\_UK/aminoacids/formuleAA/#MLformula](http://www.imgt.org/IMGTeducation/Aide-memoire/_UK/aminoacids/formuleAA/#MLformula)

## 10.2. Aminoácidos ionizables en la CPO

Tabla 2. Átomos ionizables en la superficie de la cloroperoxidasa.

Aminoácido	Átomo ionizable superficial	Formación de puentes de H	
		Aminoácido vecino	Átomo donador o aceptor de H
His43	ND1	-	-
His60	NE2	Asn13	NE2 (Donador)
His101	ND1	-	-
His147	ND1	Thr146	OG1 (Donador o aceptor)
His222	ND1 NE2	- Asp298	- ND2 (Aceptor)
Arg46	NH1 NH2	NAG1303 Thr23	O7 (Aceptor) O (Aceptor)
Arg50	NH1 NH2	Gly88 Asp89 -	O (Aceptor) OD1 (Aceptor) -
Arg206	NH1 NH2	- Asp208 Leu223	- OD2 (Aceptor) O (Aceptor)

Glu1	OE1A	-	-
	OE2A	-	-
	OE1B	-	-
	OE2B	-	-
Glu51	OE1	-	-
	OE2	-	-
Glu69	OE1	-	-
	OE2	-	-
Glu80	OE1	-	-
	OE2	-	-
Glu133	OE1	-	-
	OE2	-	-
Glu166	OE1	-	-
	OE2	-	-
Glu175	OE1	-	-
Glu201	OE1	-	-
	OE2	-	-
Glu233	OE1	-	-
	OE2	-	-
Glu235	OE1	-	-
	OE2	-	-
Glu266	OE1	-	-
	OE2	-	-
Asp11	OD1	-	-
Asp24	OD1	-	-
	OD2	-	-
Asp44	OD1	-	-
	OD2	-	-
Asp86	OD1	-	-
	OD2	-	-
Asp89	OD2	-	-
Asp123	OD1	-	-
	OD2	-	-
Asp126	OD2	Asn129	ND2 (Donador)
Asp131	OD2	-	-
Asp140	OD1	Gln136	NE2 (Donador)
	OD2	-	-
Asp149	OD2	-	-
Asp152	OD1	-	-
	OD2	-	-
Asp193	OD1	-	-
	OD2	His147	NE2 (Donador)
Asp198	OD1	-	-
	OD2	-	-
Asp200	OD1	-	-
	OD2	-	-
Asp208	OD2	Arg206	NH2 (Donador)
Lys112	NZ	Glu133	OE1 (Aceptor)
		Gln116	NE2 (Aceptor)
Lys115	NZ	Ser121	O (Aceptor)
Lys145	NZ	-	-
Lys177	NZ	Gly159	O (Aceptor)
		Pro263	O (Aceptor)
Lys211	NZ	-	-
Tyr8	OH	-	-

Tyr10	OH	His226	NE2 (Donador o aceptor)
Tyr114	OH	-	-
Tyr287	OH	-	-
Tyr288	OH	-	-