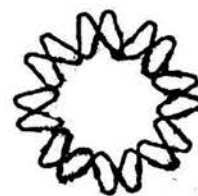




00551



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

“Efecto del control del potencial redox en la renaturalización *in vitro* de la fosfatasa alcalina de *Escherichia coli*”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

I.Q. Luis Rodolfo Vizcaíno Meza

Cuernavaca, Morelos 2004



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.

**ÉSTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

Auto. Asociación General de Bibliotecas de la
UNAM a enviar en formato electrónico el contenido de mi trabajo profesional.
NOMBRE: Dr. Rodolfo Vizcaino
FECHA: 19/Nov/2004
FIRMA: Dr. Vizcaino

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich. Durante la realización de este trabajo, se contó con el apoyo económico del proyecto CONACyT NC-230, DGAPA-UNAM IX254404 y de la beca CONACyT 165002.

A mi madre Graciela Meza Gómez, a Loreto Pradillo Rey y a mis hermanos por su amor y apoyo constante.

A mis amigos: Los Galos, Luz Adrián, Jimmy, Antonio Serrato por su apoyo y sus consejos en nuestras acostumbradas reuniones, y a Luis Adrián Ochoa Fregoso por compartir su experiencia conmigo.

A mis compañeros y verdaderos amigos de los grupos OTR y EG.

Reconocimientos:

Al Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich por brindarme la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo para la realización de esta tesis.

A los miembros del Jurado, por la revisión de la tesis y sus comentarios:

Dr. Rafael Vázquez Duhalt
Dr. Enrique García Hernández
Dr. Jaime Ortega Hernández
Dr. Baltazar Becerril Luján
Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich.

A la Dra. Angélica Meneses Acosta por su asesoría técnica de este trabajo.

A la Dra. Brenda Valderrama por proporcionar parte del material usado en el presente trabajo.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	I
ÍNDICE DE FIGURAS	III
NOMENCLATURA	IV
RESUMEN	1
1.- INTRODUCCIÓN	2
2.- ANTECEDENTES	5
2.1. PROTEÍNAS	
2.1.1 Función y estructura	5
2.1.2 Renaturalización de proteínas	6
2.1.3 Interés industrial de la renaturalización de proteínas	9
2.2. POTENCIAL DE ÓXIDO-REDUCCIÓN (PR)	
2.2.1 Definición	13
2.2.2 Dependencia del pH	17
2.2.3 Dependencia del oxígeno disuelto	18
2.2.4 Medición	19
2.2.5 Aplicación en la biotecnología	19
2.2.6 Renaturalización de proteínas	20
2.3. FOSFATASA ALCALINA DE <i>Escherichia coli</i>	
2.2.1 Estructura y función	24
2.3.2 Plegamiento	24
3.- OBJETIVOS	27
4.- MATERIALES Y MÉTODOS	28
4.1. FOSFATASA ALCALINA DE <i>Escherichia coli</i> (EC 3.1.3.1)	28
4.2. REACTOR	28
4.3. SISTEMA DE CONTROL Y DE ADQUISICIÓN DE DATOS	29
4.4. CALIBRACIÓN DEL ELECTRODO DE POTENCIAL REDOX	30
4.5. CINÉTICA DE RENATURALIZACIÓN	30
4.6. MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	31

4.7. ESPECTROFLUORÍMETRO	32
4.8. MEDICIÓN DE TIOLES	32
5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
5.1. CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA	
5.1.1 Dependencia del potencial redox sobre el pH	33
5.1.2 Dependencia del potencial redox sobre el oxígeno disuelto	35
5.1.3 Dependencia del potencial redox sobre la concentración del β -mercaptoetanol	35
5.1.4 Dependencia de la actividad enzimática sobre la concentración de ME.	36
5.2. CINÉTICAS DE RENATURALIZACIÓN	38
5.2.1 Cinéticas blanco	38
5.2.2 Cinéticas de renaturalización con 10 μ M de CuSO_4 a oxígeno disuelto constante	41
5.2.3 Cinéticas de renaturalización con 5 μ M de CuSO_4 a oxígeno disuelto constante	44
5.2.4 Cinéticas de renaturalización con 5 μ M de CuSO_4 a potencial redox constante	49
5.3 ESPECTROS DE FLUORESCENCIA	54
6.- CONCLUSIONES	58
7.- PERSPECTIVAS	59
8.- BIBLIOGRAFÍA	60
9.- APÉNDICES	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Proceso para la recuperación de proteína activa de los cuerpos de inclusión.	10
Figura 2.2. Celda electroquímica.	14
Figura 2.3. Dependencia del potencial redox del pH.	18
Figura 2.4. Secuencia de aminoácidos de la fosfatasa alcalina de <i>Escherichia coli</i> .	25
Figura 4.1. Diagrama del sistema de adquisición de datos.	30
Figura 5.1. Dependencia del potencial redox sobre el pH con 25 mM de β -mercaptoetanol.	33
Figura 5.2. Dependencia del potencial redox sobre el oxígeno disuelto con 25 mM de β -mercaptoetanol.	34
Figura 5.3. Dependencia del potencial redox sobre la concentración de β -mercaptoetanol.	36
Figura 5.4. Dependencia de la actividad enzimática respecto a la concentración de β -mercaptoetanol.	37
Figura 5.5. Cinética blanco, sin modificar variables.	39
Figura 5.6. Cinética blanco, sin oxidar.	40
Figura 5.7. Cinética de renaturalización a 20% OD y 10 μ M de CuSO_4 .	42
Figura 5.8. Perfiles de renaturalización de la FA a OD constante y 10 μ M de CuSO_4 .	43
Figura 5.9. Cinética de renaturalización de la FA a 20% OD y 5 μ M de CuSO_4 .	45
Figura 5.10. Perfiles de renaturalización de la FA a OD constante y 5 μ M de CuSO_4 .	47
Figura 5.11. Dependencia del grado de renaturalización de la FA sobre la velocidad de renaturalización de la FA.	48
Figura 5.12. Esquema de renaturalización de la fosfatasa alcalina de <i>Escherichia coli</i> .	49
Figura 5.13. Cinética de renaturalización de la FA a -370 mV y 5 μ M de CuSO_4 .	50
Figura 5.14. Perfiles de renaturalización de la FA a PR constante y 5 μ M de CuSO_4 .	51
Figura 5.15. Perfiles de renaturalización de la FA a OD constante y 5 μ M de CuSO_4 .	52
Figura 5.16. Primera cinética de desnaturalización de la FA en el espectro de fluorescencia.	54
Figura 5.17. Segunda cinética de desnaturalización de la FA en el espectro de fluorescencia.	55
Figura 5.18. Cambio de la longitud de onda, emisión a 314 nm y máximos de emisión de los espectros de fluorescencia.	56

NOMENCLATURA

ΔG	Cambio de energía libre de Gibbs
ΔG°	Cambio de energía libre de Gibbs en condiciones estándar: la actividad de los reactivos es la unidad, 1 atmósfera de presión para los gases, 25 °C de temperatura y pH = 0
Abs	Absorbancia
AH [•]	Ácido
CT	Concentración de tioles
DTNB	5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzoico)
DTT	Ditiotreitol
E	Fuerza electromotriz
e ⁻	Electrones
E°	Fuerza electromotriz a condiciones estándar
E ₀	Potencial a 25°C cuando la concentración del oxidante es igual a la del reductor, [H ⁺] = 1 M y n = 1 (en la ecuación de Nernst)
EDTA	Ácido etilendiamin-tetraacético
E _m	Potencial a 25°C cuando la concentración del oxidante es igual a la del reductor
F	La constante de Faraday (F = 9.6485*10 ⁴ C mol ⁻¹)
FA	Fosfatasa alcalina
fem	Fuerza electromotriz
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
K _a	Constante de disociación del ácido
ME	β-Mercaptoetanol
n	Coefficiente estequiométrico de los electrones transferidos en la reacción de óxido-reducción
OD	Porcentaje de oxígeno disuelto
PDI	Proteína disulfuro isomerasa
PR.	Potencial redox
PRC	Potencial redox del cultivo
R	Constante de los gases ideales (R = 8.314 J K ⁻¹ mol ⁻¹)
RE	Retículo endoplásmico
SHE	Electrodo estándar de hidrógeno
T	Temperatura
tPA	Activador de plasminógeno tisular
V	Potencial absoluto en un punto en el espacio
Φ	Potencial absoluto de un electrodo en una celda electroquímica

RESUMEN

Cuando las técnicas de ingeniería genética dieron como resultado la expresión de proteínas eucariotes en bacterias, se logró producir en *E. coli* cantidades abundantes de proteínas de interés industrial o clínico las cuales se obtenían sólo en cantidades traza. Sin embargo, la proteína recombinante sintetizada generalmente es inactiva, es decir, no tiene la estructura terciaria que le da su bioactividad, y tiende a formar agregados de proteína insoluble llamados cuerpos de inclusión, y en el caso de proteínas que contienen enlaces disulfuro en su estado nativo, pueden formar enlaces disulfuro inter- e intra-moleculares incorrectos, así como también residuos de cisteína reducida en dichos cuerpos de inclusión. Debido a lo anterior, el proceso de renaturalización de proteínas recombinantes a partir de cuerpos de inclusión ha sido ampliamente estudiado, y se ha encontrado que el potencial redox (PR) influye decisivamente en el rendimiento. El PR en un medio acuoso está determinado por la concentración de especies químicas tanto oxidadas como reducidas, por lo que en el proceso de renaturalización oxidativa de varias proteínas con enlaces disulfuro se han usado diferentes proporciones de tioles oxidados y reducidos para favorecer a un máximo rendimiento de dicho proceso. En el presente trabajo se observó el efecto del control el PR en el proceso de renaturalización de la fosfatasa alcalina (FA) de *Escherichia coli*, la cual contiene dos enlaces disulfuro responsables de actividad enzimática y de la resistencia a proteólisis respectivamente. En este caso el agente oxidante fue el oxígeno disuelto (OD) en el medio de renaturalización y el agente reductor fue el β -Mercaptoetanol (ME), pero la reacción de oxidación se catalizó mediante el Cu^{+2} . Primero se agregó ME al medio donde se encontraba FA, con lo cual inmediatamente perdió actividad enzimática, después se burbujeó O_2 para reactivar a nuestra enzima modelo. Se controló el OD a 20%, 45%, 65% y 150% y se observó que cuando se usó 5 μM de Cu^{+2} el grado de renaturalización varió de 13% a 45% mientras que cuando se usó 10 μM el grado de recuperación varió de 30% a 45%. Se controló el PR mediante el OD a -370 mV, -350 mV, -330 mV y se observó que cuando se oxidó a -370 mV la actividad enzimática se mantuvo constante durante toda la cinética. El OD y el PR se midieron en línea con sus respectivos electrodos lo cual nos sirvió para detectar que al bajar la concentración a 5 μM de Cu^{+2} , la FA se expuso a un ambiente redox más reductor, ya que se tuvo que elevar hasta 150% de OD para obtener el mismo grado de recuperación de actividad que cuando se usó 10 μM y 65% de OD. Otro aspecto importante fue que al reducir la velocidad de renaturalización de la FA se disminuyó el grado de renaturalización con lo cual puede indicar que hubo dos procesos en competencia: el de renaturalización y el de desnaturalización irreversible. Nuestros resultados son los pioneros al encontrar una relación entre el PR medido en línea y el grado de renaturalización de una proteína con enlaces disulfuro.

1.- INTRODUCCIÓN

Los procesos químicos industriales se pueden dividir en dos partes: la producción y la recuperación de la sustancia. La primera parte consiste en la generación del producto mediante una o varias reacciones químicas en un reactor, mientras que la segunda parte consiste de un conjunto de etapas que tienen como objetivo llevar al producto a un grado de pureza apropiado para el uso que se le va a dar. En los procesos biotecnológicos, la generación de un producto puede ser a partir de una reacción enzimática o a partir del crecimiento de un microorganismo, el cual puede generar ácido acético, un biopolímero de interés industrial como la goma de Xantana o una proteína entre otros productos. Las proteínas se utilizan en una variedad de campos como es el caso de la fabricación de quesos, en los cuales la quimosina o renina juega un papel fundamental; en el tratamiento de personas que padecen diabetes melitus se ha suministrado insulina producida ya sea mediante síntesis química o mediante organismos genéticamente modificados.

Las fuerzas hidrofóbicas, electrostáticas, los puentes de hidrógeno y los enlaces disulfuro, principalmente, estabilizan hélices alfa, láminas beta y asas (“loops”) para que la proteína mantenga su estructura terciaria que le da actividad biológica. Por ende, dichos factores también influyen fuertemente tanto en la desnaturalización y renaturalización de las proteínas como en procesos que implican reconocimiento molecular tales como la agregación, catálisis enzimática y purificación de proteínas. La mayoría de los productos biotecnológicos son activos una vez que son generados por el microorganismo, por lo que las etapas para obtener dichos productos son sólo de separación y recuperación. Pero las proteínas eucariotes expresadas en bacterias recombinantes suelen ser inactivas y, en general, se acumulan intracelularmente formando agregados, llamados cuerpos de inclusión, los cuales tienen que ser procesados para obtener la proteína activa. En el caso de

proteínas que tienen enlaces disulfuro en su estado nativo, suelen formarse enlaces disulfuro inter- e intra- moleculares incorrectos en el cuerpo de inclusión. Una de las etapas para obtener la proteína activa es el proceso de renaturalización, por lo cual se han estudiado los factores que afectan dicho proceso *in vitro* tanto desde el punto de vista industrial (Buswell *et al.*, 2002) como bioquímico, y se ha demostrado que la relación entre tioles oxidados y reducidos (ambiente redox) afecta la cinética y el grado de renaturalización de proteínas con enlaces disulfuro (Walker y Gilbert, 1994, Winter *et al.*, 2002, Wetlaufer *et al.*, 1987). En el presente estudio se tomó como modelo de estudio la fosfatasa alcalina (FA) de *Escherichia coli* que consiste de dos subunidades idénticas las cuales contienen cada una dos enlaces disulfuro que le confieren actividad enzimática y resistencia a proteólisis (Sone *et al.*, 1997). Una vez sintetizada la FA, la bacteria la exporta a la región periplásmica donde la proteína DsbA es la responsable de la formación de los enlaces disulfuro y el consecuente plegamiento de la enzima activa (Bardwell *et al.*, 1991; Wunderlich y Glockshuber, 1993).

El potencial redox de una sustancia se puede considerar como la fuerza con que dicha sustancia acepta o cede los electrones. Así, el potencial redox del medio está determinado por la relación entre sustancias oxidantes y reductoras que coexisten en equilibrio. Existen diversas formas de medir el potencial redox: mediante sustancias cuyo color depende del potencial redox, midiendo directamente la concentración de las especies oxidadas y reducidas, y mediante electrodos. En los procesos de crecimiento celular comúnmente se ha medido en línea el pH, el oxígeno disuelto (OD) y la temperatura, pero el potencial redox (PR) ha sido relativamente poco estudiado. La medición del PR mediante electrodos ha sido una herramienta en el estudio de fermentaciones anaerobias, cultivo de células animales y la biorremediación de suelos, ya que es posible asociar valores de dicha variable con parámetros del crecimiento de los microorganismos como biomasa y/o la concentración de algún

metabolito (Bühler y Bucher, 1982; Hwang y Sinskey, 1991; Kaake *et al.*, 1992, Higareda *et al.*, 1997; Meneses *et al.*, 1999; De León *et al.*, 1998). Hasta el momento sólo se han usado diferentes concentraciones de tioles oxidado y reducido para controlar el PR durante la renaturalización *in vitro* de proteínas con enlaces disulfuro; por ejemplo, en el trabajo realizado por Wetlaufer *et al* (1987) se puede afirmar que el PR se mantiene constante ya que no cambia la concentración de ME durante el proceso de reactivación de la RNasa y aplican la ecuación de Nernst para medir el PR pero no le asignan unidades. Respecto a los estudios de renaturalización con oxígeno de proteínas con enlaces disulfuro, no existe alguno que relacione el PR con dicho proceso, ya que sólo se menciona que la ausencia de catalizador disminuye considerablemente el rendimiento de recuperación de actividad (Achareya y Taniuchi, 1976; Menzella *et al.*, 2002). En general un catalizador acelera una reacción mediante la disminución de la barrera energética de activación lo cual implica que el catalizador cambia la trayectoria molecular de la reacción (Fogler, 1999). Lo anterior nos dio la idea de que pudiera haber diferencias medibles en el ambiente redox al que se expone la proteína en proceso de renaturalización con diferentes concentraciones de catalizador y de agente oxidante combinados. Entonces, en el presente proyecto se planteó el objetivo de estudiar la renaturalización *in vitro* de la FA mediante el monitoreo y control del PR en línea con el electrodo correspondiente, siendo el agente reductor el β -mercaptoetanol (ME), cobre el catalizador y el oxígeno (O_2) el oxidante.

2.- ANTECEDENTES

2.1 PROTEÍNAS

2.1.1 Función y estructura

En general la estructura de una proteína depende de factores tanto externos como internos. Dentro de los factores internos se encuentran las propiedades y estructura de los aminoácidos que determinan directamente en la estructura general de la proteína. La polaridad, carga eléctrica e hidrofobicidad que puedan tener los aminoácidos determinan el tipo de interacciones que estabilizan la conformación (arreglo espacial de los átomos) de la proteína: enlaces disulfuro, puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas e iónicas. Los enlaces disulfuro estabilizan la estructura nativa de una proteína uniendo covalentemente partes que pueden estar lejanas en la cadena polipeptídica pero cercanas espacialmente como en el caso de la ribonucleasa pancreática bovina A que contiene cuatro enlaces disulfuro (26-84, 40-95, 58-110 y 65-72); también unen cadenas de péptidos individuales como las dos de la insulina que están unidas mediante dos enlaces disulfuro. Algunos aminoácidos (fenilalanina, triptofano, etc.) que son no polares e hidrofóbicos, tienden a encerrarse dentro de la molécula de proteína, ya que como su nombre lo indica la interacción con el agua no se favorece. La hidrofobicidad se debe a que las moléculas de agua que interactúan con el soluto (molécula no polar) tienden a ordenarse más que si lo hicieran con otras moléculas de agua, entonces forman una capa alrededor del soluto en la que las moléculas de agua tienen mayor restricción para girar debido a que no forman puentes hidrógeno con dicho soluto, lo que da como resultado un incremento en su entropía. La entropía es la función termodinámica más importante en la asociación de grupos hidrófobos en solución acuosa (Lazaridis, 2001). Aunque el soluto sea polar y forme enlaces hidrógeno con el agua, en cierto grado, también se formará la capa de agua estructurada alrededor del mismo, ya que el número de puentes de hidrógeno por unidad

de masa es mayor en el agua pura que en cualquier otro líquido o solución, y la presencia de cualquier otra sustancia por más polar que sea disminuirá su número.

Los factores externos que influyen en la estructura de una proteína están determinados por el medio donde se encuentra ésta. Una proteína puede cambiar estructuralmente si se somete a un ambiente en el cual se interrumpen las interacciones que estabilizan su conformación. Un cambio estructural que cause la pérdida de función de la proteína se llama desnaturalización, pero no necesariamente equivale a un desplegamiento total de la cadena polipeptídica. Las proteínas pueden ser desnaturalizadas ya sea mediante temperatura extrema, pH extremo, por solventes orgánicos miscibles como alcohol o acetona, por agentes caotrópicos como el cloruro de guanidinio y urea o por detergentes. El calor afecta las interacciones débiles principalmente (puentes de hidrógeno). Los solventes orgánicos, los agentes caotrópicos y los detergentes interrumpen las interacciones hidrofóbicas que estabilizan el interior de la proteína, el pH extremo altera la carga neta de la proteína causando la repulsión electrostática y la ruptura de algunos puentes de hidrógeno. A una proteína en estado extremo de desnaturalización se le llama “espiral aleatoria” (Smith *et al.*, 1996).

2.1.2 Renaturalización de proteínas

En la célula, las proteínas se sintetizan en los ribosomas como cadenas de varios cientos de aminoácidos, en un orden específico de acuerdo con el código que se encuentra en el ADN. Para que las proteínas sintetizadas sean funcionales es necesario que adquieran su estructura tridimensional, nativa y única que es característica de cada proteína. Es evidente que el proceso de plegamiento *in vivo* tiene que ser rápido y específico ya que la velocidad de síntesis de las proteínas en la célula puede ser de hasta 20 aminoácidos por segundo (Bremer y Dennis, 1996).

Existe una familia de proteínas llamadas chaperonas que favorecen al plegamiento *in vivo*, ya que en el citoplasma de una bacteria típica, la concentración de macromoléculas es de alrededor de 350 mg/mL (Zimmerman y Minton, 1993), lo que implica un ambiente favorable para la agregación. Las chaperonas previenen la agregación de la cadena polipeptídica que se encuentra en proceso de plegamiento en un medio tan complejo como el interior de una célula. Las chaperonas pequeñas son aquellas de peso molecular menor que 200 kDa, mientras que las grandes se encuentran por arriba de 800 kDa. Tanto células eucariotes como procariotes tienen ambos tipos de chaperonas, y al parecer la mayoría de las chaperonas pequeñas se unen temporalmente a pequeñas regiones hidrofóbicas de la cadena polipeptídica que se encuentra en síntesis previniendo su agregación y plegamiento prematuro. Las chaperonas grandes encierran completamente en una “caja molecular” sólo a cadenas polipeptídicas parcialmente plegadas las cuales continúan plegándose adentro hasta que pase el riesgo de agregación (Ellis y Hartl, 1999). Existe otro tipo de proteínas que aceleran pasos en el proceso de renaturalización de varias proteínas que de otra forma serían muy lentos, como por ejemplo, la isomerización de las prolinas y la formación e isomerización de enlaces disulfuro (Schiene y Fischer, 2000).

Las proteínas también se renaturalizan *in vitro* espontáneamente cuando se remueven de las condiciones desnaturizantes y sin la ayuda de otras proteínas (Anfinsen, 1973), pero tanto *in vivo* como *in vitro* la agregación intermolecular compite con el plegamiento debido a que ambos procesos se llevan a cabo por el mismo tipo de interacciones moleculares (Jaenicke, 1998). El problema de la agregación *in vitro* se ha tratado de resolver usando bajas concentraciones de proteína o mediante la adición de chaperonas y oxidoreductasas purificadas (Tsumoto *et al.*, 2003) o de sustancias que impidan la asociación molecular y se han obtenido incrementos en la eficiencia de renaturalización de varias proteínas. Hasta ahora no hay evidencia de que las proteínas dependan de algún otro factor

que no sea su propia secuencia como información fundamental para la conformación de su estado nativo. Otro principio establecido es que el estado nativo de una proteína corresponde a la estructura con la mínima energía libre bajo un conjunto de condiciones determinadas.

El proceso de plegamiento es altamente específico ya que, por ejemplo, una cadena de 100 aminoácidos (proteína pequeña) teóricamente podría tardar 10^{30} años en adquirir su conformación nativa si adquiriera previamente todas las posibles conformaciones (10^{18}), sin embargo, la mayoría de las proteínas alcanzan su estado nativo en intervalos de tiempo del orden de minutos (Dobson *et al.*, 1998). Esta aparente incompatibilidad entre la teoría y lo observado en el plegamiento de las proteínas se le conoce como la paradoja de Levinthal. Diversas teorías han surgido para explicar dicha paradoja, de las cuales se han desarrollado modelos respectivos dentro de los que se encuentran el modelo estructural, el modelo del colapso hidrofóbico y el modelo de difusión-colisión (Creighton, 1992; Fersht, 1999). Ha sido de particular interés la idea de que un conjunto de proteínas desnaturalizadas puede llegar independientemente a una misma estructura por diferentes caminos (Harrison y Durbin, 1985). Dichas teorías han podido explicar razonablemente bien datos experimentales particulares del plegamiento de proteínas individuales, pero ninguno ofrece una clara descripción de los principios más importantes del proceso de renaturalización o explica convincentemente cómo la paradoja de Levinthal puede ser resuelta. El avance en el estudio del plegamiento de proteínas ha dependido y dependerá fuertemente de la sinergia entre teoría y experimentación.

2.1.3 Interés industrial de la renaturalización de proteínas

Al desarrollarse la tecnología de ADN recombinante se logró la sobreexpresión de proteínas de células eucariotes en células procariotes, entonces la clonación y expresión del gen correspondiente en *E. coli* dio como resultado una fuente abundante de diversas proteínas de interés industrial las cuales se obtenían sólo en cantidades traza. Sin embargo, la proteína recombinante formada en bacterias generalmente es inactiva, es decir, no tiene la estructura terciaria que le da su función biológica, y tiende a formar agregados de proteína insoluble llamados cuerpos de inclusión. En el caso de proteínas recombinantes que contienen enlaces disulfuro en su forma activa, suelen formar enlaces disulfuro no nativos inter- e intra- moleculares cuando se encuentran agregadas en los cuerpos de inclusión. La renaturalización de las proteínas adquirió importancia industrial ya que antes era de ser una etapa de procedimiento de laboratorio pasó a ser una de las operaciones unitarias del proceso de producción a gran escala de varias hormonas y otras proteínas recombinantes de actual uso terapéutico (Fischer *et al.*, 1992).

Para obtener proteína activa a partir de los cuerpos de inclusión se lleva a cabo una estrategia general de tres pasos (Figura 2.1): separación y lavado de los cuerpos de inclusión; solubilización de la proteína agregada y renaturalización de la proteína solubilizada (De Bernardez Clark, 2001). Las células que contienen los cuerpos de inclusión se rompen mediante el uso de presiones altas o una combinación de métodos mecánicos, químicos y enzimáticos; después los cuerpos de inclusión se sedimentan mediante una centrifugación de baja velocidad.

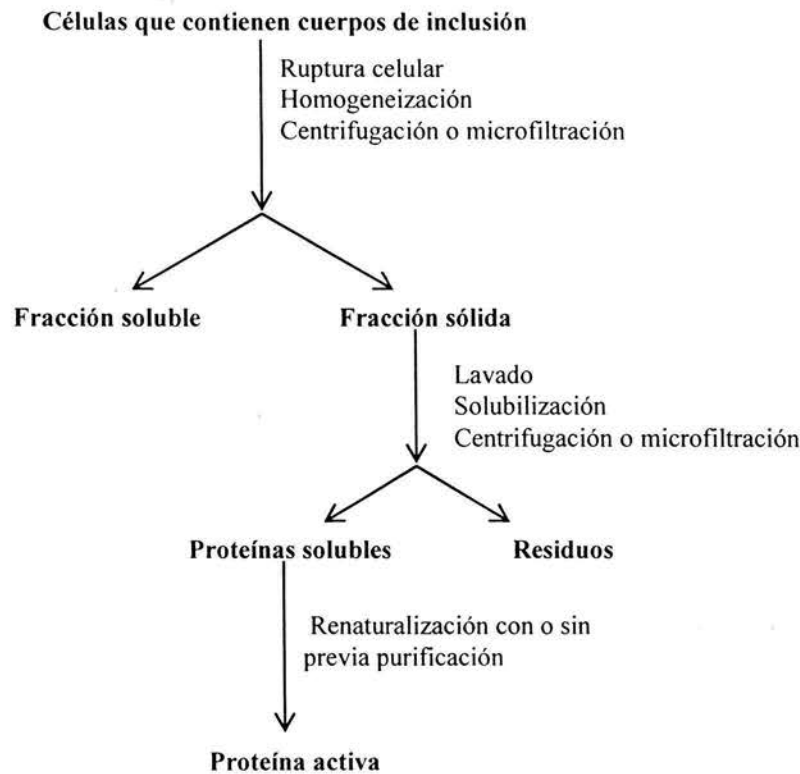


Figura 2.1 Proceso para la recuperación de proteína activa de los cuerpos de inclusión.

La etapa de lavado de los cuerpos de inclusión tiene el objetivo de retirar las proteínas de membrana, lípidos y otros contaminantes para lo cual típicamente se utilizan EDTA y bajas concentraciones de agentes desnaturalizantes y/o detergentes como Tritón X-100, deoxicolato y octilglucósido (Georgiou y Valax, 1999; De Bernardez Clark *et al.*, 1999). Los agentes desnaturalizantes más usados para la solubilización de los cuerpos de inclusión son la urea y el cloruro de guanidinio, los cuales, dependiendo de su concentración, pueden desnaturalizar completamente a la proteína o solamente romper las interacciones intermoleculares con una desnaturalización parcial. Otros agentes desnaturalizantes son los detergentes dodecil sulfato de sodio y bromuro de n-cetil trimetilamonio, que tienen la ventaja de solubilizar a la proteína y a la vez renaturalizarla sin desnaturalizarla completamente ya que “enmascaran” las pequeñas regiones

hidrofóbicas de la superficie de la proteína desnaturalizada evitando su agregación (Patra *et al.*, 2000; Kim y Lee, 2000). Los cuerpos de inclusión también se solubilizan mediante pH extremos, como ha sido el caso para algunos péptidos antifúngicos (Gavit y Better, 2000) y hormonas de crecimiento (Khan *et al.*, 1998; Patra *et al.*, 2000). Aparte de los agentes desnaturalizantes, en el proceso de solubilización se adicionan agentes reductores como β -mercaptoetanol (ME) y ditiotreitól (DTT) para mantener reducidas a las cisteínas y evitar la formación de enlaces disulfuro no nativos inter e intramoleculares (Fischer *et al.*, 1993).

Una vez solubilizados los cuerpos de inclusión, la renaturalización de la proteína se favorece mediante la remoción de los agentes desnaturalizante y reductor para favorecer a un ambiente más oxidante y por ende la formación de los puentes disulfuro. Los métodos hasta ahora más usados son: dilución, intercambio de solución amortiguadora mediante diálisis, diafiltración, cromatografía de filtración en gel e inmovilización en soportes sólidos (Vernerin *et al.*, 1998; Muller y Rinas, 1999; Berdichevsky *et al.*, 1999). En general, la renaturalización por dilución es el método más usado debido a su simplicidad, pero para fines industriales tiene la desventaja de usar grandes volúmenes de soluciones amortiguadoras y bajas concentraciones de proteína, lo que tiene como consecuencia altos costos de proceso. Se ha renaturalizado la lisozima mediante tres modalidades de dilución: por lotes, lote alimentado y en continuo, obteniéndose mayores rendimientos en los dos últimos (Katoh y Katoh, 2000). En dicho trabajo, a medida que se disminuía la velocidad de dilución se favorecía el grado de renaturalización. Buswell *et al* (2002) encontraron que al aumentar la turbulencia con una agitación más vigorosa y el uso de baffles para favorecer la dispersión de la proteína en el reactor, se disminuye el rendimiento de la renaturalización del tripsinógeno, contrariamente a lo esperado.

Cuando en el proceso de renaturalización de la proteína se remueve el agente reductor se favorece la formación de los enlaces disulfuro, debido a que esto implica un cambio en el PR de la solución amortiguadora hacia un valor más oxidante. Entonces hay que tener en cuenta de que tanto la velocidad de dilución como la de agitación pueden influir directamente en el potencial redox al que se expone la proteína desnaturalizada, lo cual no toman en cuenta los trabajos anteriormente mencionados. También se puede oxidar la proteína mediante aire en presencia de un metal catalizador (Cu^{+2}), que es el proceso más simple y barato, pero se tienen bajos rendimientos y el proceso es poco controlado (Achareya y Taniuchi, 1976; Menzella *et al.*, 2002). El otro método consiste en usar compuestos tiólicos oxidados y reducidos de bajo peso molecular. El par glutatión oxidado y reducido (GSSG/GSH) es el sistema de oxidación más usado pero también se han probado los sistemas cisteamina/cistamina, cisteína/cistina y DTT/GSSG. Se ha encontrado que relaciones de 10 a 1 moles de tiol reducido por mol de tiol oxidado y una concentración total de tioles de 5 a 15 mM son las condiciones óptimas para el proceso de renaturalización (De Bernardez Clark *et al.*, 1998; De Bernardez Clark *et al.*, 1999; Wetlaufer *et al.*, 1987, Fischer *et al.*, 1993). Otra modalidad al renaturalizar mediante tioles es en dos etapas: primero la formación de enlaces disulfuro entre el glutatión y la proteína desnaturalizada y después se renaturaliza en una solución que contenga pequeñas cantidades de agente reductor, como la cisteína, para promover la formación y los enlaces disulfuro (Duda y Light, 1982). Una fuerte desventaja de usar tioles es su alto costo, sobre todo el glutatión.

Aparte de las reacciones de renaturalización de proteínas, también han sido estudiadas las reacciones de agregación. La reacción de renaturalización para una proteína monomérica implica interacciones intramoleculares, por lo que se puede considerar como de primer orden, mientras que las reacciones de agregación son de orden mayor, ya que implican interacciones intermoleculares.

Según algunos autores, el proceso de agregación no es específico, ya que se han renaturalizado mezclas de diferentes proteínas y se observa que los agregados son heterólogos (Goldberg *et al.*, 1991) y que las proteínas que tienden a agregarse cuando se pliegan solas, favorecen la agregación de otras cuando se pliegan mezcladas (Maachupalli-Reddy *et al.*, 1997).

2.2. POTENCIAL DE ÓXIDO-REDUCCIÓN (PR)

2.2.1 Definición

Reacciones de óxido-reducción

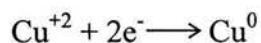
En las reacciones de óxido-reducción (redox) ocurre un cambio del estado de oxidación de los reactivos implicados, lo cual implica una transferencia de electrones de un compuesto a otro. Por definición, el agente reductor se oxida (pierde electrones) y el agente oxidante se reduce (gana electrones), o sea las reacciones de óxido-reducción están acopladas y son complementarias entre sí de tal forma que la reacción de oxidación libera la misma cantidad de electrones que la reacción de reducción consume (Eisenberg y Crothers, 1979).

Diferencia de potencial de óxido-reducción

La energía potencial se podría definir como la capacidad de un cuerpo de realizar un trabajo. El potencial de óxido-reducción se podría definir como la capacidad que tiene una sustancia de aceptar o donar electrones en una reacción química redox. El agente oxidante tiene una mayor afinidad por los electrones y por lo tanto un mayor potencial redox que el agente reductor y en el momento que se permite el intercambio de electrones entre estas dos sustancias (agente oxidante y agente reductor) se establece una diferencia de potencial redox en la cual se realiza un trabajo sobre los electrones (Bühler y Bucher, 1982; Eisenberg y Crothers, 1979).

Celda electroquímica

Ahora si consideramos una celda electroquímica (Figura 2.2), la diferencia de potencial se debe a que la barra de zinc se está oxidando y el cobre iónico disuelto en el recipiente de la derecha se está reduciendo:



que da la siguiente reacción redox general



La diferencia de potencial ($\Delta\Phi$) entre los electrodos queda expresada por:

$$\Delta\Phi = \Phi_{\text{Cu}} - \Phi_{\text{Zn}} \quad (\text{Ecuación 2.1})$$

donde los potenciales absolutos Φ_{Cu} y Φ_{Zn} no pueden ser medidos pero su diferencia sí. En este ejemplo el electrodo de cobre es más positivo, por lo tanto los electrones fluyen desde el electrodo negativo de zinc (el cátodo) a través del circuito externo hasta el electrodo positivo de cobre (ánodo).

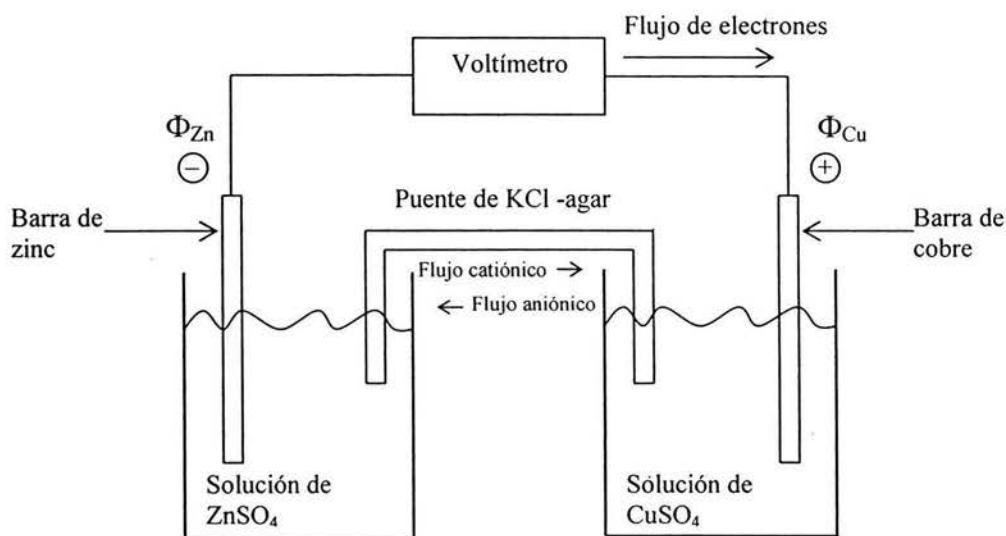


Figura 2.2. Celda electroquímica

La diferencia de potencial entre los electrodos depende de la cantidad de corriente electrónica que está fluyendo, entonces a medida que transcurre el tiempo la cantidad de corriente y la diferencia de potencial disminuyen debido a que la reacción llega al equilibrio. Pero como en la mayoría de los procesos, el máximo trabajo posible es cuando se realiza reversiblemente. Entonces, el potencial máximo es cuando el flujo de electrones en el circuito externo de la celda es despreciable, y se conoce como *fuerza electromotriz (fem)*, E (Eisenberg y Crothers, 1979).

El trabajo realizado por la reacción química es el cambio de energía libre de Gibbs de la misma y se relaciona con la *fem* de la siguiente forma:

$$\Delta G = -nFE \quad (\text{Ecuación 2.2})$$

donde F es la constante de Faraday ($F = 9.6485 \cdot 10^4 \text{ C mol}^{-1}$) y “ n ” es el coeficiente estequiométrico de los electrones transferidos en la reacción de óxido-reducción (Eisenberg y Crothers, 1979).

Recordando el cambio de energía libre para una reacción química redox



$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln Q \quad (\text{Ecuación 2.3})$$

donde

$$Q = \frac{[\text{Ox}_1]^c [\text{Red}_2]^d}{[\text{Red}_1]^a [\text{Ox}_2]^b}$$

ΔG° es el cambio de energía libre de Gibbs en condiciones estándar: la actividad de los reactivos es la unidad, 1 atmósfera de presión para los gases, 25 °C de temperatura y $\text{pH} = 0$. Si igualamos las ecuaciones 2.2 y 2.3, podemos obtener una expresión que relaciona E con las concentraciones de los reactivos de la celda electroquímica, la cual se llama ecuación de Nernst (Schafer y Buettner, 2001):

$$E = E^\circ - \frac{RT}{nF} \ln Q \quad (\text{Ecuación 2.4})$$

donde R es la constante de los gases ideales ($R = 8.314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), T es la temperatura (K) y E° es la *fem* a condiciones estándar. Entonces, la ecuación de Nernst nos sirve para estimar el potencial de óxido-reducción o *fem* de una celda electroquímica conociendo la diferencia de potencial estándar y las concentraciones de los reactivos.

Electrodo estándar de referencia

Sería impráctico calcular la *fem* para cada una de las celdas electroquímicas posibles, por lo que se usa un electrodo de referencia. Entonces la *fem* a condiciones estándar de la reacción de oxidación del zinc (E°_{Zn}) es la diferencia entre el potencial del electrodo de zinc y el electrodo de referencia:

$$E^\circ_{\text{Zn}} = \Phi^\circ_{\text{Zn}} - \Phi^\circ_{\text{ref}}$$

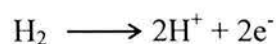
y la *fem* estándar para la otra celda sería

$$E^\circ_{\text{Cu}} = \Phi^\circ_{\text{Cu}} - \Phi^\circ_{\text{ref}}$$

entonces la diferencia de potencial para toda la celda es

$$E^\circ = \Delta\Phi^\circ = \Phi^\circ_{\text{Cu}} - \Phi^\circ_{\text{Zn}} = E^\circ_{\text{Cu}} - E^\circ_{\text{Zn}} \quad (\text{Ecuación 2.5})$$

Entonces podemos calcular la diferencia de potencial de la celda electroquímica (E°) tomando la diferencia entre los potenciales estándar de semireacción relativos a un potencial de referencia arbitrarios. El electrodo de referencia universal es el Electrodo Estándar de Hidrógeno (SHE) en el cual se lleva a cabo la siguiente semi reacción



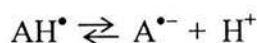
y su potencial de electrodo se puede estimar con

$$\Phi_H = \Phi_H^\circ - \frac{RT}{nF} \ln \frac{[H^+]^2}{[H_2]} \quad (\text{Ecuación 2.6})$$

El SHE consiste de una hoja de metal en contacto con H₂ gas a una atmósfera de presión y una solución ideal de iones H⁺ a una concentración de un 1 mol/L. Prácticamente el SHE no se utiliza ya que es impráctico y por lo tanto son de uso común los electrodos de referencia de mercurio/calomel saturado con KCl y el de plata/cloruro de plata (Bühler y Bucher, 1982). Por convención, los signos relativos a la SHE son la polaridad experimental del electrodo bajo condiciones estándar; así, una reacción que acepte electrones del electrodo de hidrógeno tendrá signo positivo. Entonces los valores de E° son tabulados como potenciales de *reducción* estándar, por que se entiende que si E° de una media celda es positivo, la reducción se llevará a cabo espontáneamente bajo condiciones estándar cuando dicha media celda es combinada con el SHE (Eisenberg y Crothers, 1979).

2.2.2 Dependencia del potencial redox sobre el pH

Para reacciones redox en las que está implicada la transferencia de un solo protón como la disociación de un ácido AH[•]:



donde la concentración total de radicales es la suma de las concentraciones de AH[•] y A^{•-}, la dependencia del pH se puede describir con una versión simplificada de la ecuación de Nernst:

$$E_m = E_0 - 59.1 \text{ mV} \log \left(\frac{1}{K_a + [H^+]} \right) \quad (\text{Ecuación 2.7})$$

donde E_m es potencial a 25°C cuando la concentración del oxidante es igual a la del reductor, E₀ es el potencial cuando [H⁺] = 1 M y n = 1 (ver la ecuación de Nernst). Al graficar la ecuación 2.7

(Figura 2.3) se puede ver la relación entre el PR y pH para dos pares redox diferentes, uno que tiene un $pK_a = 5$ y otro con $pK_a = 9$. Cuando el pH equivale al pK , el PR deja de depender de dicha variable, ya que mantiene un valor constante a medida que se continúa incrementando el pH (Schafer y Buettner, 2001).

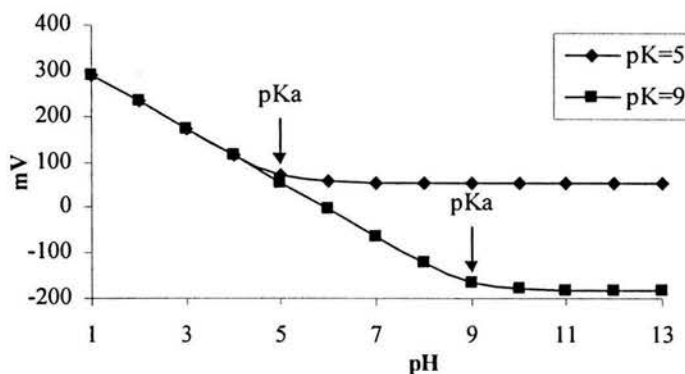
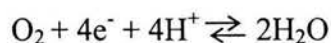


Figura 2.3. Dependencia del potencial redox sobre pH (Schafer y Buettner, 2001)

2.2.3 Dependencia del potencial redox sobre el oxígeno disuelto

Uno de los pares redox más importantes durante un proceso que se lleve a cabo en un medio acuoso, ya sea reacción química o crecimiento microbiano, es:



y aplicando la ecuación de Nernst tenemos:

$$E_{O_2/H_2O} = E^{\circ}_{O_2/H_2O} + \frac{RT}{4F} \ln \frac{[O_2][H^+]^4}{[H_2O]^2} \quad (\text{Ecuación 2.8})$$

donde si consideramos que $[H_2O] = 1 \text{ M}$ y $pH = -\log_{10}[H^+]$ y reacomodamos términos queda

$$E_{O_2/H_2O} = E^{\circ}_{O_2/H_2O} + \frac{RT}{4F} \ln[O_2] - \frac{RT}{F} 2.303 \text{ pH} \quad (\text{Ecuación 2.9})$$

Entonces en un medio acuoso el PR es una función logarítmica del OD. Es notable que la ecuación 2.9 muestra una relación totalmente lineal entre el PR y el pH, a diferencia de la ecuación 2.7, que considera la K_a de la sustancia amortiguadora de pH (Kjaergaard, 1977).

2.2.4 Medición

El PR se puede medir ya sea por medio de colorantes (sustancias cuyo color depende del potencial redox del medio), midiendo la concentración de los agentes oxidante y reductor o por medio de electrodos (Kjaergaard, 1977; Wetlaufer, 1987). En el presente trabajo se utilizó un electrodo de platino ya que es altamente conductor de electrones, es químicamente neutro hacia el buffer de reacción utilizado en las reacciones de renaturalización y puede llevar a cabo un intercambio electrónico con suficiente velocidad en la interface del metal que se encuentra entre la solución y el electrodo. De esta forma se puede garantizar valores estables del potencial del electrodo y reversibilidad en un sistema redox específico. Los dos primeros requisitos son ideales y no los puede reunir completamente electrodo alguno (Kjaergaard, 1977). Durante la medición del PR hay un intercambio de electrones entre el material del electrodo y el sistema redox, y el equilibrio se alcanza cuando la separación de cargas forma un potencial en la superficie del metal. Este potencial se opone a cualquier flujo neto de electrones lo que significa que el potencial del electrodo y del medio se igualan (Bühler y Bucher, 1982).

2.2.5 Aplicación en la biotecnología

Así como el pH, el oxígeno disuelto y la temperatura, el potencial redox es un parámetro fácilmente medible en línea y puede brindar información importante sobre los procesos biotecnológicos, sin embargo su aplicación ha sido relativamente escasa refiriéndose principalmente a su monitoreo. La aplicación del PR ha sido en las siguientes áreas de la biotecnología: biorremediación (Kaake *et al.*, 1992), fermentaciones microbianas (Kwong y Rao, 1991, Lee *et al.*, 1998), cultivo de células eucariotes superiores (Meneses *et al.*, 1999; Hwang y Sinskey, 1991; Higareda *et al.*, 1997; De León *et al.*, 1998) y plegamiento de proteínas. A continuación se hizo una recapitulación de los estudios sobre el efecto del PR sobre la renaturalización de proteínas tanto *in vivo* como *in vitro*.

2.2.6 Renaturalización de proteínas

Como ya se había mencionado antes, el PR es una variable que afecta fuertemente el proceso de renaturalización oxidativa de las proteínas tanto *in vivo* como *in vitro*, ya que durante dicho proceso se lleva a cabo la formación de enlaces disulfuro que es una reacción redox. *In vivo* se lleva a cabo mediante la oxidoreductina 1 (Ero1p) y la disulfuro isomerasa (PDI) en el retículo endoplásmico (RE) de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, mientras que en la bacteria *Escherichia coli* la familia Dsb de proteínas (DsbA-D) lleva a cabo dicho proceso en el periplasma. Al parecer, la Ero1p oxida la PDI que a su vez oxida la proteína expresada, aunque hay fuertes indicios de que la principal función de la PDI es la isomerización de los enlaces disulfuro que no es una reacción redox y por lo tanto gran parte de la oxidación de proteínas es llevada a cabo completamente por la Ero1p. Aún se desconoce el mecanismo mediante el cual esta proteína regresa a su estado oxidado (Fränd y Kaiser, 1999; Laboissière *et al.* 1995). Antes se pensaba que la oxidación de las proteínas se llevaba a cabo principalmente con el glutatión oxidado debido a que se importaba selectivamente al RE,

pero el hecho de que cepas de levadura que carecen de Ero1p funcional y que son incapaces de sintetizar glutatión puedan oxidar de forma normal, implicaba la existencia de otros oxidantes como la sulfhidril oxidasa que cataliza la oxidación de tioles mediante O_2 o la monooxigenasa que también cataliza la misma reacción pero es dependiente de NADPH (Hooper *et al.*, 1999; Suh *et al.*, 1999). Es posible que la Ero1p pueda tener un complejo Fe-S que acepta electrones de las cisteínas del sitio activo y los transfiere a la cadena respiratoria, lo que permite más ciclos de oxidación (Frand *et al.*, 1998; Pollard *et al.*, 1998). Mediante la medición de las concentraciones de glutatión reducido y oxidado se encontró un valor de PRC de -0.18 V en el RE. Este valor concuerda con el valor óptimo *in vitro*. El citosol de las bacterias no proporciona un medio adecuado para el plegamiento oxidativo de proteínas debido a que es suficientemente reductor ($E^{\circ'} = -0.27$ V), e incluso es más reductor que el citosol de las células eucariotes ($E^{\circ'} = -0.23$ V) (Hwang *et al.*, 1992). La oxidación de proteínas es llevada en el periplasma bacteriano por un conjunto de enzimas. La enzima DsbA oxida las proteínas que acaban de ser sintetizadas (Bardwell *et al.*, 1991; Akiyama *et al.*, 1992), pero a su vez los enlaces disulfuro de la DsbA son regenerados por la DsbB que es una proteína de la membrana citoplasmática y contiene cuatro cisteínas hacia el lado interno del periplasma (Bardwell *et al.*, 1993; Jander *et al.*, 1994). El factor DsbC es una proteína soluble que necesita estar en estado reducido ya que isomeriza los enlaces disulfuro de las proteínas sintetizadas. La DsbD es la proteína que utiliza el poder reductor del citosol para poder mantener reducida a la DsbC (Zapun *et al.*, 1995; Rietsch *et al.*, 1997). El poder oxidante de la DsbB para generar los enlaces disulfuro inestables de la DsbA proviene del oxígeno, el cual recibe los electrones a través de la cadena respiratoria (Kobayashi *et al.*, 1997).

Una estrategia para favorecer la renaturalización de proteínas recombinantes producidas en *E. coli* ha sido la de coexpresar la proteína de interés junto con la PDI y ambas proteínas se secretan al

periplasma, pero se han presentado problemas de especificidad como en el caso del activador de plasminógeno tisular (tPA) cuyo rendimiento no mejora cuando se usa la PDI de rata pero con su homólogo de levadura se incrementa 50%. El ambiente redox se tiene que tomar en cuenta al aplicar dicha estrategia, ya que el rendimiento de tPA activo obtenido por células que sobreprodujeron DsbC fue mayor que el obtenido por células que sobreprodujeron PDI. Esto se puede explicar con el hecho de que el sitio activo CXXC de la DsbC se mantiene en estado reducido y que muy probablemente el ambiente del periplasma es demasiado oxidante para la catálisis eficiente de la isomerización de enlaces disulfuro por la PDI, ya que dicha isomerasa tiene la capacidad para funcionar como agente oxidante en lugar de la DsbA en el proceso de renaturalización de la FA de *E. coli* (Qiu *et al.*, 1998; Zhan X *et al.*, 1999; Hwang *et al.*, 1992). Otra forma de favorecer la oxidación *in vivo* de proteínas es mediante la manipulación del ambiente redox del citosol. Una cepa *E. coli* que es incapaz de sintetizar glutatión y carece de la tiorredoxín reductasa, puede renaturalizar en su citosol proteínas con múltiples enlaces disulfuro más eficientemente que las bacterias nativas, lo cual se debe a que la tiorredoxina, que normalmente es un reductor, funciona como oxidante en dichas cepas. La renaturalización en el citosol de *E. coli* de la tPA truncada (vtPA), la cual tiene nueve enlaces disulfuro, tiene un rendimiento óptimo cuando se favorece un ambiente oxidante mediante la expresión de la tiorredoxina y la DsbC, ya que se renaturaliza hasta 200 veces más que en las cepas nativas (Bessette *et al.*, 1999).

Una mezcla de tioles oxidados y reducidos se ha utilizado para controlar el ambiente redox en la renaturalización oxidativa *in vitro*. En uno de los estudios realizados con la lisozima, se ha encontrado que una concentración total de glutatión entre 6 y 16 mM y una relación de glutatión oxidado a glutatión reducido ($[GSSG]/[GSH]$) igual a 0.5 son los óptimos para obtener la máxima renaturalización de dicha proteína (De Bernardez Clark *et al.*, 1998). Esto contrasta con otro trabajo

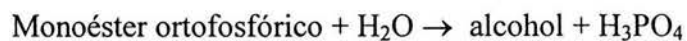
en el que se encontró que la renaturalización de la lisozima tiene un máximo cuando se usa una relación [GSSG]/[GSH] igual a uno (St. John *et al.*, 2002). Al comparar las cinéticas de recuperación de la estructura nativa de la β -lactamasa y de la FA, ambas de *E. coli*, se encontró que cuando la relación [GSSG]/[GSH] fue igual a 50 la lactamasa tuvo una recuperación máxima y después disminuyó, pero su velocidad inicial de renaturalización se mantuvo constante después de alcanzar el valor máximo; sin embargo, en el caso de la FA ocurre lo contrario, ya que la velocidad inicial de renaturalización alcanzó un máximo cuando la relación [GSSG]/[GSH] fue igual a 10, mientras que la recuperación se mantuvo constante una vez alcanzada dicha relación. Lo anterior nos muestra que las mismas condiciones redox pueden tener efectos muy diferentes en proteínas distintas. Al comparar la relación [GSSG]/[GSH] óptima para diferentes proteínas, es notable que el ambiente redox óptimo para proteínas eucariotes es más reductor que el óptimo para proteínas procariotes (Walker y Gilbert, 1994; Lyles y Gilbert, 1991; Fischer *et al.*, 1993). En los anteriores trabajos se ha relacionado el PR con el grado de renaturalización de forma indirecta, ya que no se adjudican valores específicos de PR. No obstante, en un trabajo realizado sobre la renaturalización de la RNasa se relacionaron tres variables: los valores de $\frac{1}{2} \log[-S-S-]/[-SH]^2$ (de la ecuación de Nernst), el porcentaje de tioles oxidados y el porcentaje de actividad recuperada. La primera variable representa una medida del PR, pero no le asignaron unidades, solo midieron la concentración de ME oxidado y reducido y aplicaron la ecuación de Nernst. Los autores argumentan que el PR y el porcentaje de actividad recuperada no tienen correlación porque ambas variables presentaron perfiles considerablemente diferentes con respecto al porcentaje de ME oxidado. El PR se mantuvo creciendo mientras que la actividad enzimática presentó un máximo de 67% cuando se usó 10% de ME oxidado para después decrecer lentamente hasta 0% al usar 100% de ME oxidado (Wetlaufer *et al.*, 1987). En dicho trabajo se discute muy poco sobre el concepto de potencial redox y no hace mención de que, como ya se había mencionado antes, el proceso de renaturalización de proteínas

con enlaces disulfuro se ve fuertemente afectado por la isomerización de enlaces disulfuro que no es una reacción redox (Laboissière *et al.* 1995).

2.3. FOSFATASA ALCALINA DE *Escherichia coli*

2.3.1 Estructura y función

La FA es una metalo-enzima homodimérica ampliamente distribuida en la naturaleza que cataliza la hidrólisis inespecífica de fosfatos de monoésteres:



Un total de 449 aminoácidos (figura 2.4) conforman cada subunidad que contiene dos enlaces disulfuro y un sitio activo el cual consiste de dos iones zinc y un ion magnesio (Bradshaw *et al.*, 1981; Kim y Wyckoff, 1991). Un enlace disulfuro (Cys-168-Cys-178) le confiere resistencia a proteólisis de la tripsina mientras que el otro (Cys-286-Cys-336) se requiere para que la enzima tenga actividad catalítica (Sone *et al.*, 1997).

2.3.2 Plegamiento

La subunidad de la FA es sintetizada *in vivo* como un precursor que contiene en su extremo N terminal una secuencia señal de 20 residuos, que no adquiere su estructura nativa resistente a proteasas y catalíticamente activa sino hasta que se exporta al periplasma donde se encuentra la DsbA, una de las primeras proteínas identificadas que cataliza la formación del enlace disulfuro (Boyd *et al.*, 1987; Akiyama e Ito, 1989).

10
 Thr-Pro-Glu-Met-Pro-Val- Leu-Glu-Asn-Arg-Ala-Ala-Gln-Gly-Asn-Ile-Thr-Ala-Pro-Gly-
 30
 Gly-Ala-Arg-Arg-Leu-Thr-Gly-Asp-Gln-Thr-Ala-Ala-Leu-Arg-Asn-Ser-Leu-Ser-Asp-Lys-
 50
 Pro -Ala-Lys -Asn- Ile- Ile -Leu-Leu- Ile- Gly- Asp- Gly- Met- Gly-Asp-Ser-Glu-Ile-Thr-Ala-
 70
 Ala-Arg-Asn-Tyr-Ala-Glu-Gly-Ala-Gly-Gly-Phe-Phe-Lys-Gly-Ile-Asp-Ala-Leu-Pro-Leu-
 90
 Thr-Gly-Gln-Tyr-Thr-His-Tyr-Ala-Leu-Asn-Lys-Lys-Thr-Gly-Lys-Pro-Asp-Tyr-Val-Thr-
 110
 Asp-Ser-Ala-Ala-Ser-Ala-Thr-Ala-Trp-Ser-Thr-Gly-Val-Lys-Thr-Tyr-Asn-Gly-Ala-Leu-
 130
 Gly-Val-Asp-Ile-His-Glu-Lys-Asp-His-Pro-Thr-Ile-Leu-Glu-Met-Ala-Lys-Ala-Ala-Gly-
 150
 Leu-Ala-Thr-Gly-Asn-Val-Ser-Thr-Ala-Glu-Leu-Gln-Asp-Ala-Thr-Pro-Ala-Ala-Leu-Val-
 168 170 178
 Ala-His-Val-Thr-Ser-Arg-Lys-Cys-Tyr-Gly-Pro-Ser-Ala-Thr-Ser-Gln-Lys-Cys-Pro-Gly-
 190
 Asn-Ala-Leu-Glu-Lys-Gly-Gly-Lys-Gly-Ser-Ile-Thr-Glu-Gln-Leu-Leu-Asn-Ala-Arg-Ala-
 210
 Asp-Val-Thr-Leu-Gly-Gly-Gly-Ala-Lys-Thr-Phe-Ala-Gly-Thr-Ala-Thr-Ala-Gly-Gly-Trp-
 230
 Gln-Gly-Lys-Thr-Leu-Arg-Glu-Gln-Ala-Gln-Ala-Arg-Gly-Tyr-Gln-Leu-Val-Ser-Asp-Ala-
 250
 Ala-Ser-Leu-Asn-Ser-Val-Thr- Glu- Ala-Asn-Gln-Gln-Lys-Pro-Leu-Leu-Gly-Leu-Phe-Ala-
 270
 Asp-Gly-Asn-Met-Pro-Val-Arg-Trp-Leu-Gly-Pro-Lys-Ala-Thr-Tyr-His-Gly-Asn-Ile-Asp-
 286 290
 Lys-Pro-Ala-Val-Thr-Cys-Thr - Pro-Asn-Pro-Gln-Arg-Asn-Asp-Ser-Val-Pro-Thr-Leu-Ala-
 310
 Gln-Met-Thr-Asp-Lys- Ala -Ile-Glu-Leu-Leu-Ser-Lys-Asn-Glu-Lys-Gly-Phe-Phe-Leu-Gln-
 330 336
 Val-Glu-Gly-Ala -Ser -Ile -Asp-Lys-Gln-Asp-His-Ala-Ala-Asn-Pro-Cys-Gly-Gln-Ile-Gly-
 350
 Glu-Thr-Val-Asp-Leu-Asp -Glu-Ala-Val-Gln-Arg-Ala-Leu-Glu-Phe-Ala-Lys-Lys-Glu-Gly-
 370
 Asn- Thr- Leu-Val- Ile-Val-Thr-Ala-Asp-His-Ala-His-Ala-Ser- Gln- Ile-Val-Ala-Pro-Asp-
 390
 Thr-Lys-Ala-Pro-Gly -Leu-Thr -Gln-Ala-Leu-Asn-Thr-Lys-Asp-Gly-Ala-Val-Met-Val-Met-
 410
 Ser-Tyr-Gly-Asn-Ser -Glu-Glu -Asp-Ser-Gln-Glu-His-Thr-Gly-Ser-Gln-Leu-Arg-Ile-Ala-
 430
 Ala- Tyr- Gly-Pro-His- Ala-Ala-Asn-Val-Val-Gly-Leu-Thr-Asp-Gln-Thr-Asp-Leu-Phe-Tyr-
 449
 Thr- Met- Lys-Ala-Ala-Leu-Gly-Leu-Lys

Figura 2.4. Secuencia de aminoácidos de la Fosfatasa Alcalina de *Escherichia coli* (Bradshaw et al., 1981).

En el proceso general de renaturalización, el primer evento es la formación de los enlaces disulfuro que desencadena la conformación del monómero para después dar lugar a la dimerización, que al parecer es el paso limitante (Akiyama e Ito, 1993). En ausencia de agentes reductores la FA se disocia *in vitro* sin romper sus enlaces disulfuro, en sus dos subunidades, ya sea mediante altas temperaturas o cloruro de guanidinio. La desnaturalización mediante ácido libera los átomos de zinc que son necesarios para la actividad y para la dimerización de la enzima, la cual ocurre espontáneamente (Schlesinger y Barrett, 1965). Hay efectores que pueden ayudar en la renaturalización del sitio activo de la FA bajo condiciones reductoras u oxidantes, así el Tritón X-100 y la chaperona α cristalino son capaces de devolverle la actividad a la enzima después de desnaturalizarla solamente con ácido. En cambio, efectores como el Zn^{+2} , ATP y GTP fueron capaces de reconstituir el sitio activo sólo bajo condiciones reductoras, lo que sugiere una vía de plegamiento es diferente a la que ocurre en el periplasma bacteriano donde primero ocurre la formación de los enlaces disulfuro. Al analizar los espectros de fluorescencia del triptofano y de dicroísmo circular, se concluye que después de desnaturalizarse a pH = 2.0 o con 6 M cloruro de guanidinio, la FA no regresa totalmente a su estructura nativa, aunque mantiene su actividad, lo que indica que el sitio activo se puede reconstituir independientemente de otros dominios estructurales (Sarkar y Ghosh, 1996). Los estudios realizados utilizando soluciones amortiguadoras de PR con diferentes relaciones de glutatión oxidado a reducido sugieren que la catálisis intermolecular del reacomodo de los enlaces disulfuro no es esencial para la renaturalización oxidativa de la FA, debido a que no se requiere altas concentraciones de GSH y existe tolerancia a las altas concentraciones de GSSG (Walker y Gilbert, 1994).

3.- OBJETIVOS

GENERAL

Evaluar el efecto del control del PR mediante diferentes valores de OD, en la renaturalización de la fosfatasa alcalina de *Escherichia coli*.

ESPECÍFICOS

- Renaturalizar la fosfatasa alcalina de *Escherichia coli* usando sulfato cúprico a una concentración 10 μM y manteniendo el valor del OD a 20%, 45% y 65%.
- Renaturalizar la fosfatasa alcalina de *Escherichia coli* usando sulfato cúprico a una concentración de 5 μM y manteniendo el valor del OD a 20%, 45%, 65% y 150%.
- Renaturalizar la fosfatasa alcalina de *Escherichia coli* manteniendo el PR constante en valores de -370 mV, -350 mV y -330 mV.

4.- MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 FOSFATASA ALCALINA DE *Escherichia coli* (EC 3.1.3.1)

Se compró FA de *Escherichia coli* (Sigma-Aldrich, P-5931) en la presentación de polvo liofilizado con una actividad específica de 47 U/mg. Para preparar la solución madre se disolvió 500 unidades de enzima en 500 μL de una solución 30 mM de Tris, 60 mM MgCl_2 y 50% v/v de glicerol, y se guardó a -20°C (Walker y Gilbert, 1994). Se escogió esta proteína pura como modelo debido a que su actividad es fácil de medir y está relacionada con uno de sus enlaces disulfuro. Si se hubiera utilizado una proteína recombinante como modelo se hubiera complicado considerablemente la metodología debido a los contaminantes presentes en los cuerpos de inclusión.

4.2 REACTOR

El reactor consistió de una jarra de vidrio de 13 cm de altura, 6.4 cm de diámetro (420 mL volumen total), una tapa de acero inoxidable con orificios, una base de plástico y cuatro barras con rosca en los extremos (Figura 4.1). La jarra tenía dos bocas laterales con sus respectivas tapas de rosca. Las barras se atornillaban en la base de plástico y en la tapa para mantener a ésta unida a la jarra. En los orificios de las tapas se colocaron conectores con sus respectivas tuercas para colocar los siguientes accesorios:

Puertos grandes: un electrodo de OD, un electrodo de pH.

Puertos chicos: un tubo para entrada de gases, una resistencia para mantener la temperatura a 37°C , una barra de vidrio para el agitador magnético.

En la tapa de una de las bocas laterales se colocó el tubo ciego para el termopar que sensaba la temperatura de la solución amortiguadora donde se llevó a cabo la renaturalización de la enzima. La otra boca se usó para la toma de muestras. La aireación fue de tipo sumergido y el volumen de trabajo fue de 250 mL. El agitador magnético estaba separado un centímetro del fondo de la jarra.

4.3 SISTEMA DE CONTROL Y DE ADQUISICIÓN DE DATOS

Para adquirir los datos de pH, OD y PR, así como la composición porcentual de oxígeno, nitrógeno y dióxido de carbono en la corriente gaseosa de entrada, se usó un programa de control retroalimentado tipo proporcional escrito en Microsoft QuickBasic. Este programa fue desarrollado por Aguilar-Aguila *et al.* (1993) para controlar el pH y el OD en valores determinados y fue modificado por Meneses (2001) para monitorear y controlar el PR mediante la manipulación del OD y el pH. En el presente estudio, el control se llevó a cabo manualmente y el programa sólo se utilizó para la adquisición de datos. Los flujos individuales de O₂ y N₂ se midieron y controlaron a través de controladores de flujo másico individuales (Brooks Inst. Co. Hatfield, PA), los que a su vez estaban controlados por una computadora LC Macintosh conectada a una interface D/A y A/D MacAdios 411 (GW Instruments, Cambridge., MA). Las mediciones del OD, pH, PR y flujo de gases se adquirieron en línea, mostrándose gráficamente en la pantalla y archivadas en el disco duro de la computadora (Figura 4.1). La tensión de oxígeno disuelto (OD) se midió en línea por medio de un electrodo de vidrio esterilizable (Ingold, Wilmington, MA). El pH se midió por medio de un electrodo de vidrio esterilizable (Ingold). El PR se midió mediante un electrodo combinado de platino esterilizable (Ingold).

4.4 CALIBRACIÓN DEL ELECTRODO DE POTENCIAL REDOX

El electrodo de redox fue limpiado para cada cinética como lo reportan Hwang y Sinskey (1991). Debido a que los valores absolutos del PR dependen fuertemente del electrodo utilizado se usó un mismo electrodo en todas las cinéticas. Después de dejarse encendido toda la noche para que se cargara, el electrodo se calibró mediante una solución estándar con valor de +275 mV.

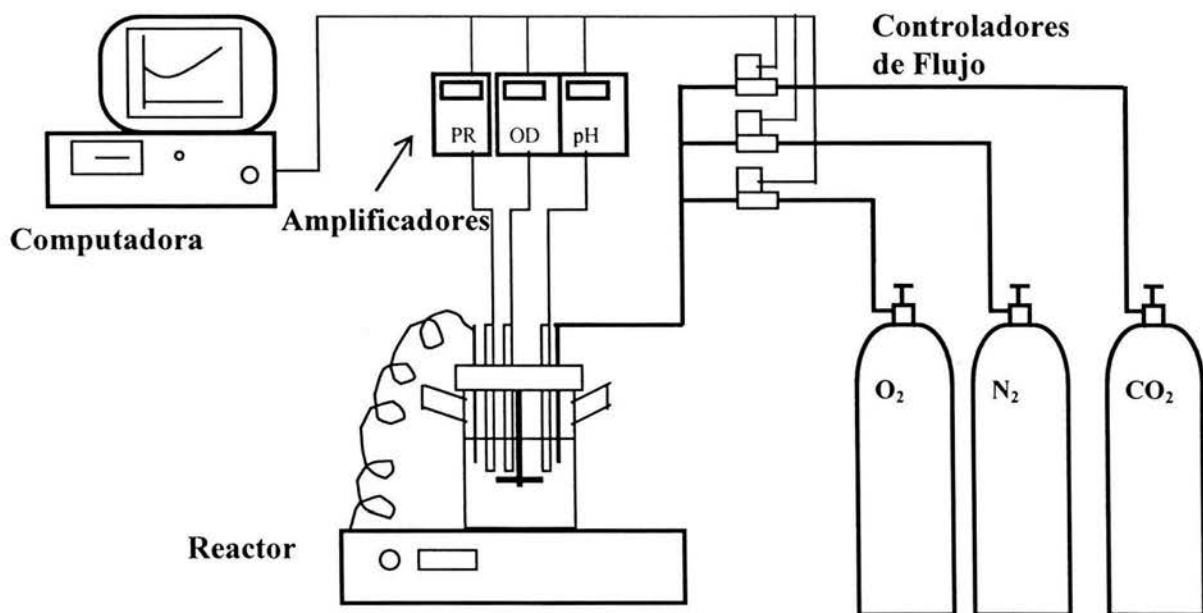


Figura 4.1. Diagrama del sistema de adquisición de datos

4.5 CINÉTICA DE RENATURALIZACIÓN

La solución amortiguadora donde se llevó a cabo la desnaturalización y renaturalización de la FA consistió de 100 mM de Glicina, 1.0 mM de ZnCl₂ y 1.0 mM de MgCl₂, 5 ó 10 μ M de CuSO₄, pH = 10.4 y una temperatura de 37°C. Antes de iniciar las cinéticas de desnaturalización y renaturalización en el reactor, se adicionó 25 mL de una solución de los anteriores ingredientes, pero concentrada diez veces, y después se diluía hasta 250 mL. Después se calibraron los electrodos de pH y PR afuera del reactor con sus respectivas soluciones estándar, mientras que el electrodo de OD se calibró en el reactor mediante burbujeo sumergido de aire en la solución de renaturalización, a

una temperatura de 37°C y se fijó el valor de 100% de OD cuando se estabilizó la lectura. Una vez calibrados los electrodos, se introdujeron en la solución de renaturalización que se encontraba en continua agitación en el reactor y se esperó a que se estabilizara la lectura de PR, después se inició el programa de adquisición de datos y se diluyeron 7.5 μL (7.5 unidades = 0.161 mg) de solución madre de enzima en la solución de renaturalización y se midió la actividad, la cual se tomó como 100%. A continuación se burbujeó N_2 puro, y una vez que el OD disminuyó hasta 1% se agregó 440 μL de β -mercaptoetanol (ME) y la actividad cayó hasta un 20% de la actividad original. Para oxidar la enzima se comenzó a burbujear O_2 hasta fijar un valor predeterminado de PR o de OD manteniendo el pH a 10.4. El flujo total de gases (oxígeno y nitrógeno) se mantuvo constante a 300 mL / min.

4.6 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Para medir la actividad enzimática, se tomaron muestras de 530 μL de solución de enzima del reactor y se agregaron en celdas de poliestireno de 3 mL (volumen total) que contenían 70 μL de una solución 51.4 mM de fosfato de *p*-nitrofenilo y se registró la aparición del color amarillo ($\lambda = 405$ nm) cada 5 segundos durante un tiempo total de 2 min, en un espectrofotómetro marca Beckman DU 650. La temperatura de la celda de medición se mantuvo a 37°C mediante recirculación de agua en el porta-celda. Una unidad de actividad enzimática hidrolizará 1.0 mol de fosfato de *p*-nitrofenilo en un minuto a pH=10.4 y 37°C.

4.7 ESPECTROFLUORÍMETRO

Las mediciones de los cambios de fluorescencia durante la desnaturalización de la FA se llevaron a cabo mediante el espectrómetro de luminiscencia Perkin Elmer LS 55. El material de la celda de medición fue cuarzo y tenía un volumen total de 4 mL.

4.8 MEDICIÓN DE TIOLES

Se midió la concentración de ME mediante el color amarillo que se genera cuando el grupo tiol reacciona con el 5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB), también conocido como reactivo de Ellman (Ellman, 1959). A partir de una solución madre de fosfatos de 200 mM de KH_2PO_4 , 10 mM de EDTA y $\text{pH} = 8.0$ se prepararon una solución 100 μM de cisteína y una solución de DTNB 10 mM. Para preparar la curva estándar (apéndice B) se tomaron 0, 120, 240 y 360 μL de la solución de cisteína y se diluyó hasta un volumen total de 580 μL en cada celda, se agregó 24.5 μL de solución de DTNB, se dejó reaccionar durante 5 minutos y se leyó en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 412 nm (Goeghegan, 1996). Para detectar la oxidación de tioles durante la renaturalización del reactor se tomaron 90 μL de solución de enzima y se mezclaron con 10 μL de una solución 2 N de HCl para detener la oxidación y se almacenaron a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ (Hwang y Sinskey, 1991). De las muestras almacenadas a $-20\text{ }^\circ\text{C}$, se tomó una muestra de 10 μL , se diluyeron hasta 580 μL con la solución de fosfatos ($\text{pH} = 8.0$) y se agregó 24.5 μL de solución de DNTB y se leyó la absorbancia (Abs) en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 412 nm. La concentración total de tioles (CT) se obtuvo extrapolando el valor de Abs con la curva estándar. Las muestras para la medición de tioles fueron independientes de las muestras para la medición de la actividad enzimática.

5.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Caracterización del sistema

5.1.1 Dependencia del Potencial Redox sobre el pH

Como ya se había mencionado antes, el potencial redox depende del OD de forma logarítmica y del pH de forma lineal, lo que se corroboró para nuestro sistema como se muestra en las figuras 5.1 y 5.2. Para observar el efecto del pH en el potencial redox, se puso la solución amortiguadora a 37 °C y se fue agregando lentamente solución 10 M de NaOH y se registraron los valores de pH y de potencial redox.

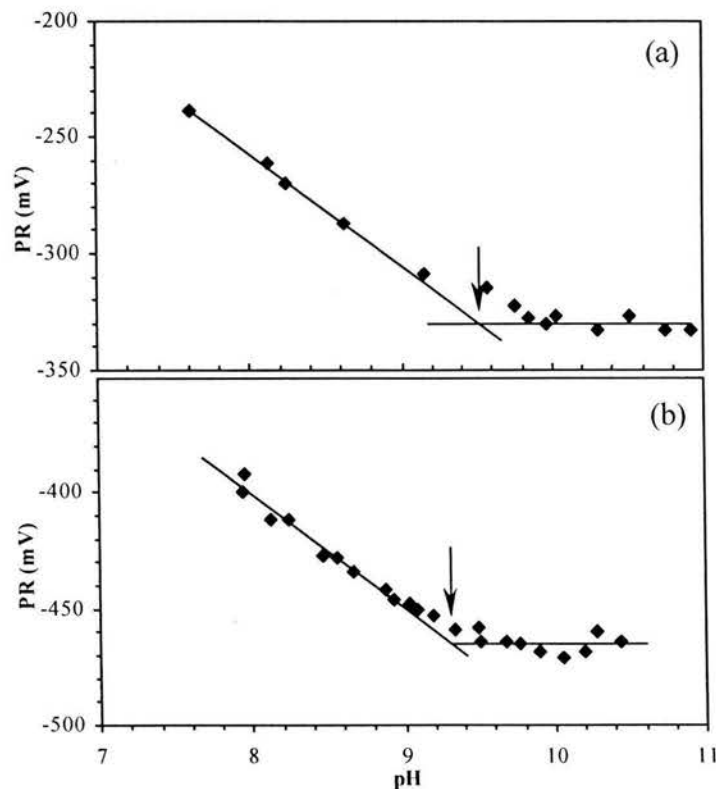


Figura 5.1. Dependencia del potencial redox sobre el pH. Se fue agregando una solución 10 N de NaOH a la solución de renaturalización sin enzima, con 25 mM (teórico) de ME y con (a) 95% % de Oxígeno Disuelto (b) 1% Oxígeno Disuelto.

El potencial redox sigue una trayectoria lineal pero después se mantiene en un valor constante a partir de $\text{pH}=9.5$, lo que nos indica el valor de pK_a de la glicina como se indica con las flechas que señalan el cruce de las líneas de tendencia en las gráficas de la figura 5.1 (Schaffer y Buettner, 2001). Para la relación entre potencial redox y pH se obtuvieron dos ecuaciones que se ajustaron a la parte lineal ((a), $\text{PR} = -37.77\text{pH} + 43.311$, $R^2 = 0.987$; (b) $\text{PR} = -33.46\text{pH} - 141.77$, $R^2 = 0.957$). En la literatura se han reportado valores de pK_a de 9.78 (Voet y Voet, 1995) y 9.60 (Nelson y Cox, 2000) para la glicina, lo cual concuerda con lo que obtuvimos al medir el potencial redox.

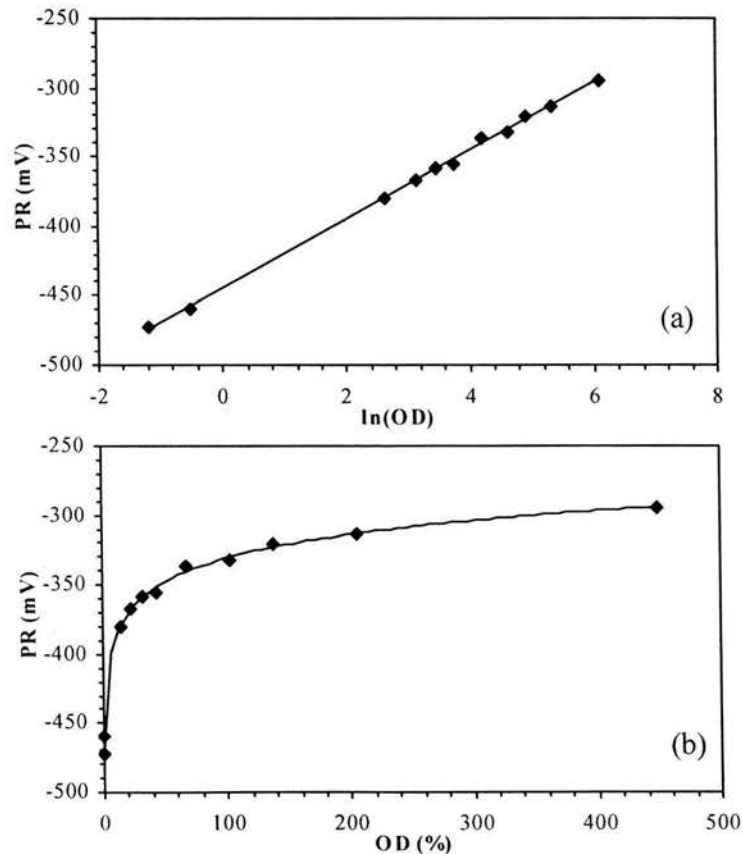


Figura 5.2. Dependencia del PR sobre el OD con 25 mM (teórico) de ME. En la solución de renaturalización se desplazó completamente el O_2 con N_2 y después se elevó el OD a diferentes valores y se registró el valor de PR. (a) PR vs $\ln(\text{OD})$, (b) PR vs OD

Según la ecuación de Henderson-Hasselbach, el pKa se iguala al pH en el momento en que se igualan las concentraciones del ácido protonado y del desprotonado, y es cuando hay un mayor amortiguamiento del pH y del potencial redox respecto al NaOH agregado. Como lo indica la ecuación 2.7 (pag. 17), el potencial redox se mantiene en un valor constante después de que el pH iguala al pKa cuando la concentración de iones H^+ es muy baja con respecto a la constante de equilibrio Ka y por lo tanto el PR queda en función de una constante (Wardman, 1989).

5.1.2 Dependencia del potencial redox sobre el oxígeno disuelto

Para demostrar la dependencia entre el OD y el PR, se usó la solución amortiguadora de pH de glicina descrita en Materiales y Métodos, se disminuyó el OD hasta 0.3% mediante el burbujeo de N_2 y se esperó hasta que se estabilizara la lectura. Después, se fijó el OD a diferentes valores y se registró el valor de PR. La ecuación que correlacionó la curva que describe la relación entre PR y OD (figura 5.2) fue logarítmica ($PR = 24.697\ln(OD) - 444.75$, $R^2 = 0.998$). Estos experimentos ayudaron a diagnosticar el estado del electrodo ya que concuerdan con lo reportado previamente respecto al efecto del OD y el pH en el potencial redox (Schafer y Buettner, 2001; Wardman, 1989; Kjaergaard, 1977).

5.1.3 Dependencia del potencial redox sobre la concentración de β -mercaptoetanol

Para reducir a la enzima, se agregó ME, el cual tuvo un efecto en el potencial redox que se evaluó incrementando la concentración de ME en el reactor y registrando el PR. El potencial redox de la solución de glicina sin ME fue de -11 mV con 100% de OD y -61 mV con 1% de OD. Primero se agregaron dos alícuotas de 17.6 y 70.4 μ L, y después nueve de 88 μ L hasta sumar un total de 880 μ L de ME. Se realizaron dos experimentos: uno con 100% (figura 5.3a) y otro con 1% de OD (figura 5.3b). En el primer experimento, el OD fue disminuyendo de 100% a 67% después de comenzar a

agregar el ME (Apéndice C, figura C-2), debido a que éste último consumió el oxígeno y el PR se estabilizó a un valor de -400 mV. En el segundo experimento, se disminuyó el OD hasta 1% antes de agregar el ME y el PR se estabilizó en un valor de -60 mV. Cuando se agregó la primera alícuota de ME, el PR disminuyó drásticamente y después lentamente lo que significa que la mayor sensibilidad en la medición fue después de agregar $176 \mu\text{L}$ (Apéndice C, figura C-1). Se observa que existe un desplazamiento negativo aproximadamente de 60 mV del experimento realizado a 1% de OD con respecto al realizado a 100% de OD (figura 5.3).

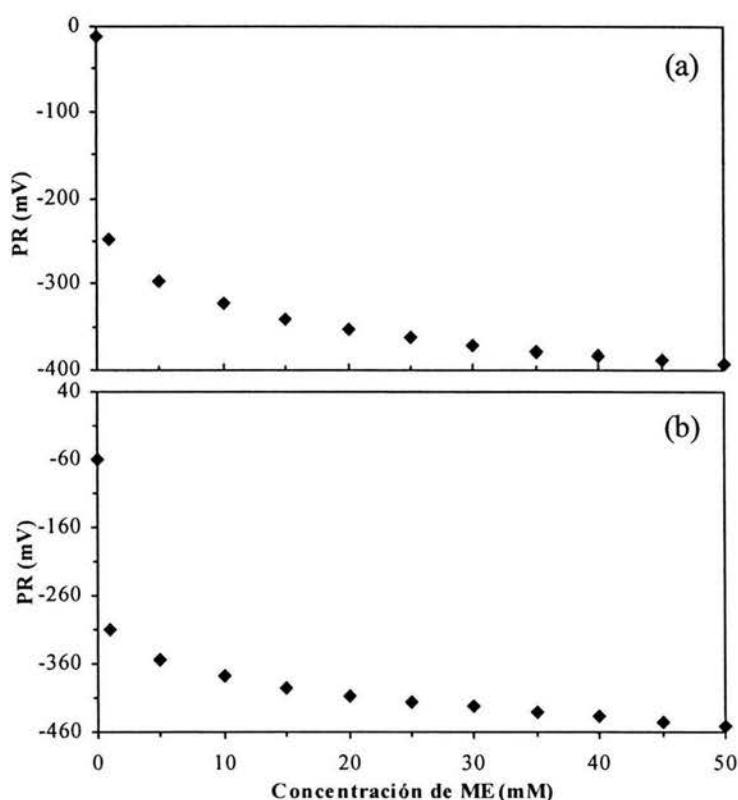


Figura 5.3. Dependencia del PR sobre la concentración de ME. (a) 100 - 67% de OD y (b) 1 % de OD.

5.1.4 Dependencia de la actividad enzimática sobre la concentración de β -mercaptoetanol

También se observó el comportamiento de la actividad enzimática al agregar ME y se registró el PR de la misma forma como se hizo en el experimento anterior (figura 5.4). Cada vez que se

agregaba una cantidad de ME, inmediatamente la actividad caía una fracción del total. La actividad enzimática se redujo hasta 1.6 % del valor inicial cuando se llegó a una concentración de 40 mM, lo que nos indicó que la actividad enzimática casi se elimina con sólo agregar ME. Tanto la actividad enzimática como el OD descendieron al aumentar la concentración de ME, sin embargo al caer casi por completo la actividad enzimática, el OD comienza a elevarse ligeramente (Apéndice C, figura C-2). Por su parte, el PR se estabilizó a un valor de -375 mV, situación diferente a lo que pasó en los experimentos sin enzima (figura 5.3) en los cuales el PR se mantuvo disminuyendo (Apéndice C, figura C-1). Como se había mencionado, al agregar las dos primeras alícuotas de ME hubo un cambio notable en el potencial redox, sin embargo la actividad enzimática sólo disminuyó un 10%.

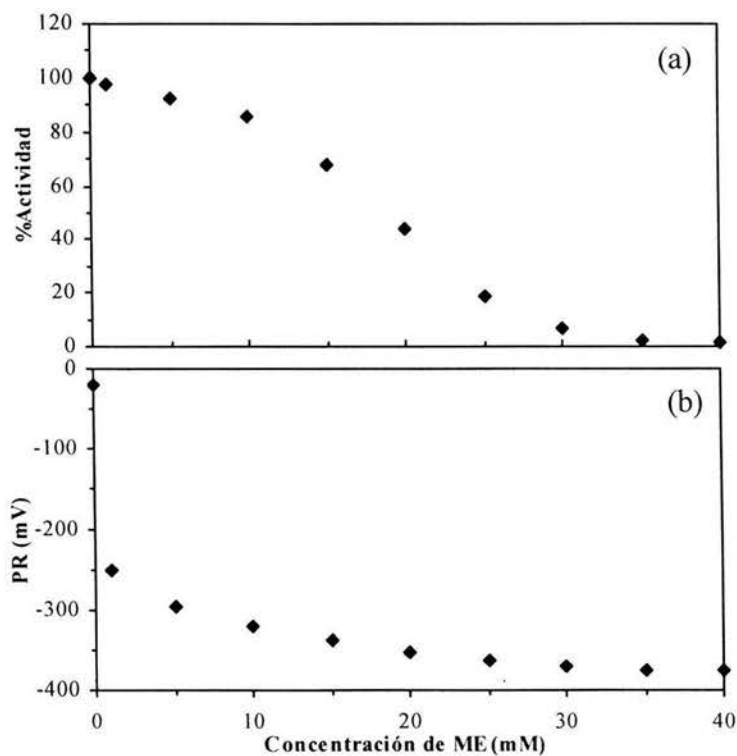


Figura 5.4. Dependencia de la actividad enzimática respecto a la concentración de ME en una solución inicialmente a 100% de OD (a) perfil de la actividad (b) perfil del PR.

Otro aspecto por recalcar es que si comparamos los perfiles del PR de las figuras 5.3 y 5.4 se puede observar que la enzima no fue un agente oxidante detectable con el electrodo ya que el principal par redox en nuestro sistema fue el agua (agente oxidante) y el ME (agente reductor).

5.2 CINÉTICAS DE RENATURALIZACIÓN

En nuestro sistema, las variables independientes fueron el potencial redox, el oxígeno disuelto y la concentración de CuSO_4 , mientras que el pH se mantuvo constante ya que sólo se buscó el efecto del potencial redox en la renaturalización de la FA usando diferentes valores de oxígeno disuelto. Se usaron 5 y 10 μM de CuSO_4 para regular el flujo de electrones desde los tioles hacia el oxígeno. En todas las cinéticas se redujo el OD hasta 1% antes de agregar el ME para favorecer a un ambiente lo más reductor posible y la actividad enzimática cayó hasta 20% del valor inicial al usar 25 mM de ME. No obstante, el experimento de la figura 5.4 se llevó a cabo en presencia de OD y la actividad enzimática también disminuyó al mismo valor. Como ya se había mencionado la agregación de una proteína depende proporcionalmente de la concentración de la misma (Goldberg *et al.*, 1991) por lo cual se usó una concentración de 0.03 U/mL de enzima (0.64 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en el reactor, que es una concentración muy baja ya que en otros trabajos se ha usado por arriba de 0.1 mg/mL de proteína (De Bernardez Clark *et al.*, 1998). También de esta forma quedó una concentración adecuada para medir la actividad en el espectrofotómetro como se indicó en Materiales y Métodos.

5.2.1 Cinéticas de Blanco

Se realizaron dos cinéticas blanco, una sin alterar variables del sistema y sin agregar ME (Figura 5.5) y otra en la que después de agregar ME se dejó que la actividad enzimática disminuyera hasta un mínimo para después burbujear oxígeno a la solución de glicina con 10 μM de CuSO_4 (Figura 5.6). El primer experimento nos mostró que la FA es bastante estable durante 9 horas en las

condiciones indicadas en Materiales y Métodos, o sea, no hubo otros factores adicionales que afectaran la actividad. El segundo experimento mostró que la pérdida de actividad se puede llevar a cabo mediante dos procesos: el primero es instantáneo (al agregar ME) y el segundo es lento (después de agregar ME).

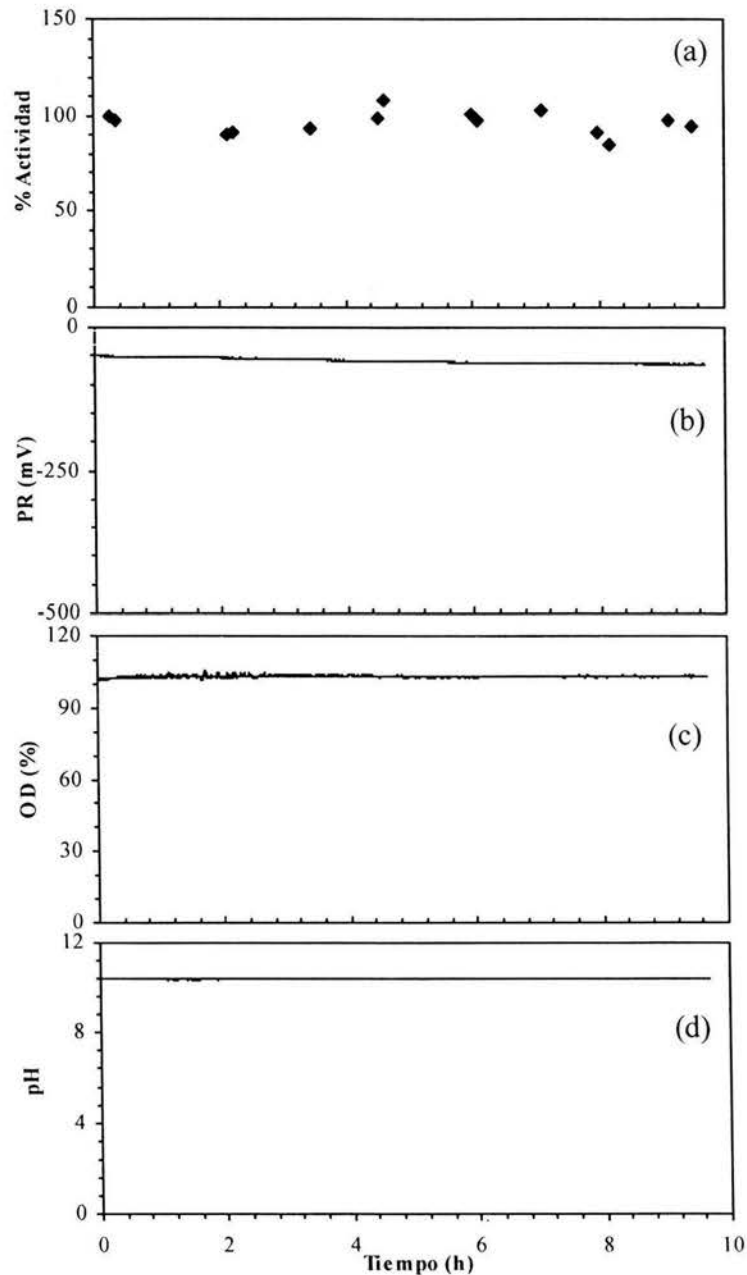


Figura 5.5. Cinética blanco. Se mantuvo la enzima en el reactor con agitación constante sin agregar ME y sin modificar el pH, el OD ni el PR. (a) % Actividad enzimática (b) Potencial de óxido-reducción (c) Oxígeno disuelto (d) pH.

En la figura 5.6 la flecha 1 indica el momento en que el PR comienza a disminuir debido al decremento del OD, mientras la flecha 2 indica el instante en que dicha variable cae drásticamente debido a que se agregó ME. Como ya se había mencionado, uno de los enlaces disulfuro mantiene catalíticamente activa a la FA lo cual explica el primer proceso de pérdida de actividad.

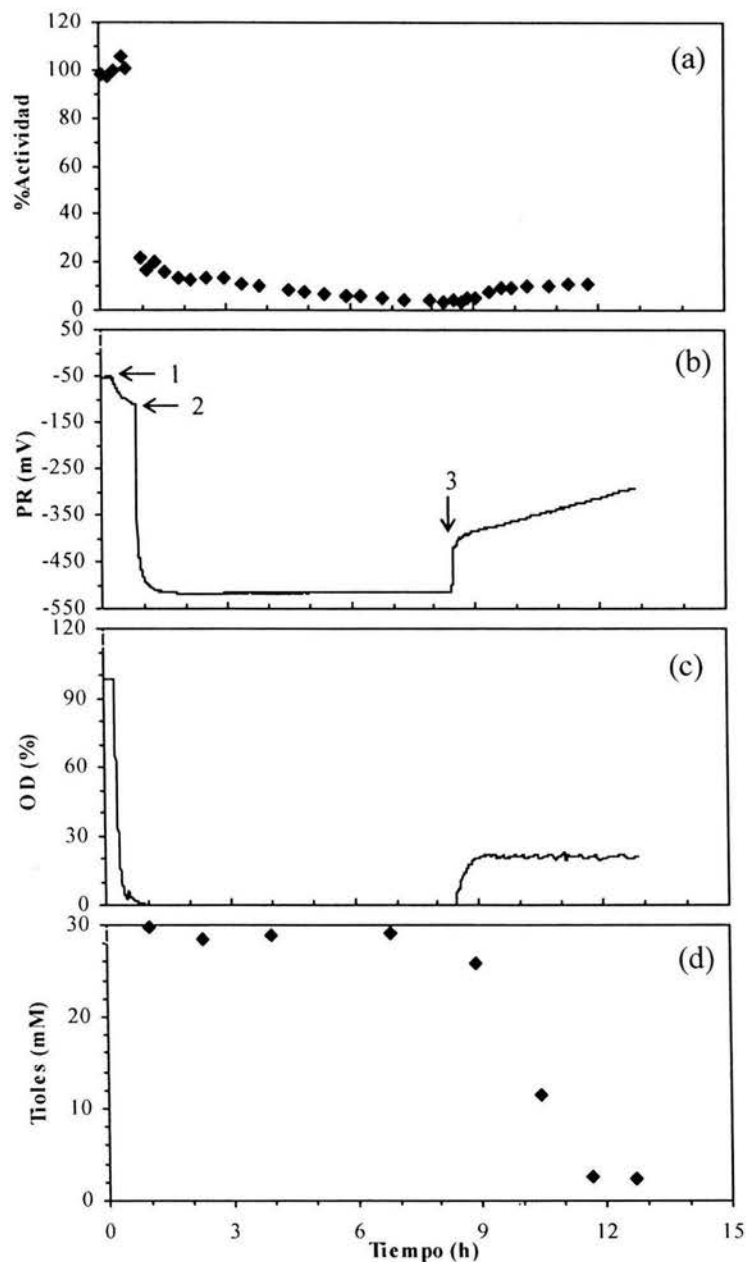


Figura 5.6. Cinética blanco. (a) %Actividad enzimática (b) Potencial redox (c) Oxígeno disuelto (d) Concentración de ME. El PR disminuye (flecha 1) al burbujear N_2 para disminuir el OD hasta cero. El PR disminuye al agregar ME (flecha 2). Se burbujeo O_2 una vez que la actividad enzimática detuvo su decremento (flecha 3).

Sin embargo, el segundo proceso puede tener varias causas una de las cuales es la ruptura del enlace disulfuro que le confiere resistencia a proteólisis (Sone *et al.*, 1997). En general, una proteína es un ente dinámico y la ruptura de uno de sus enlaces disulfuro puede desestabilizar en gran medida toda su estructura dando lugar a un mayor grado de libertad en los movimientos de la misma, y como consecuencia su desplegamiento. Lo anterior puede ser una explicación a la cinética mostrada en la figura 5.6, en la que actividad enzimática disminuyó hasta casi 0%, para después recuperó apenas un 5% de la actividad original. Por otro lado, la actividad enzimática se recuperó de 20% a 60% del valor original (Figura 5.7). Esto indica que el segundo proceso es un cambio estructural irreversible mediante oxidación con O₂ y de mayor grado que el primer proceso de pérdida de actividad. Otra causa de la lenta pérdida de actividad podría ser la agregación pero en nuestro caso se descartó dicha opción, ya que, como se explicará más adelante, los espectros de fluorescencia nos muestran una exposición gradual de los triptofanos durante dicho proceso.

5.2.2 Cinéticas de renaturalización con 10 μM de CuSO₄ y oxígeno disuelto constante

Se realizaron las cinéticas de renaturalización de la FA a partir de un 20% de actividad enzimática, es decir se disminuyó el OD hasta 0% (figura 5.7, flecha 1), se agregaron 440 μL de ME y la actividad enzimática cayó hasta un 20% de la actividad original, se tomaron dos muestras e inmediatamente después se comenzó a oxidar fijando el valor de OD a 20% (figura 5.7, flecha 3). De esta forma, al reducir parcialmente a la FA se pudo observar si la actividad se recuperaba, disminuía más o se mantenía en dicho valor. Se define al Porcentaje de Actividad Recuperada en una cinética como la diferencia entre el máximo porcentaje de la actividad alcanzado y el porcentaje de la actividad inicial, por ejemplo en la figura 5.7 el porcentaje de actividad recuperado es: 60% - 20% = 40%. La recuperación de actividad de la FA cesó después de 1.5 horas de haber agregado el ME y

el máximo porcentaje de la actividad recuperada promedio en todas las cinéticas fue de 50%. Un detalle notable es que al final de la cinética, cuando se consume totalmente el ME, el potencial redox sufre un aumento en su tasa de cambio después de haber mantenido un incremento lineal (figura 5.7, flecha 5).

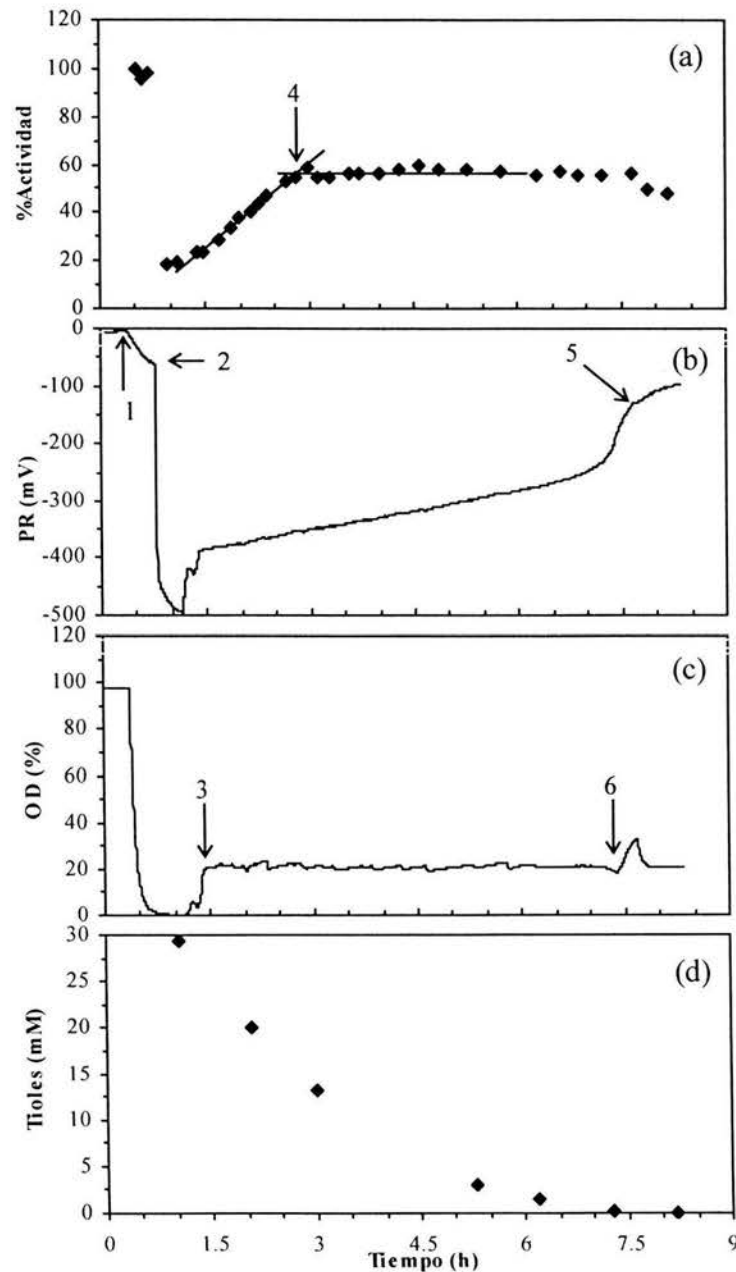


Figura 5.7. Cinética de renaturalización de la FA con $10 \mu\text{M}$ de CuSO_4 y 20% de OD. (a) %Actividad enzimática (b) Potencial redox (c) Oxígeno disuelto (d) Concentración de ME. El PR disminuye (flecha 1) al burbujear N_2 para disminuir el OD hasta cero. El PR disminuye al agregar ME (flecha 2). El OD sube hasta 20% al burbujear O_2 (flecha 3). La recuperación de actividad enzimática se detiene (flecha 4).

Se realizaron cinéticas en las que se fijó el OD a 20, 45 y 65% por triplicado para cada valor (Apéndice D), y cuyos resultados mostraron un alto grado de reproducibilidad ya que como se aprecia en las barras de error de la figura 5.8, su desviación estándar no es considerable. La actividad enzimática dejó de incrementarse después de una hora de haber agregado el ME, lo cual fue más rápido que las cinéticas con $5 \mu\text{M}$ de Cu^{+2} . En la figura 5.8a se muestra la relación entre el OD y la velocidad de recuperación, que en términos matemáticos es la pendiente de la línea de la cinética de recuperación de actividad mostrada en la figura 5.7. Al comparar la figura 5.8a y la figura 5.8b se observa que la velocidad de recuperación aumenta proporcionalmente al OD de 24 %/min a 76 %/min, mientras que el porcentaje de actividad recuperada aumentó de 30% a 45%.

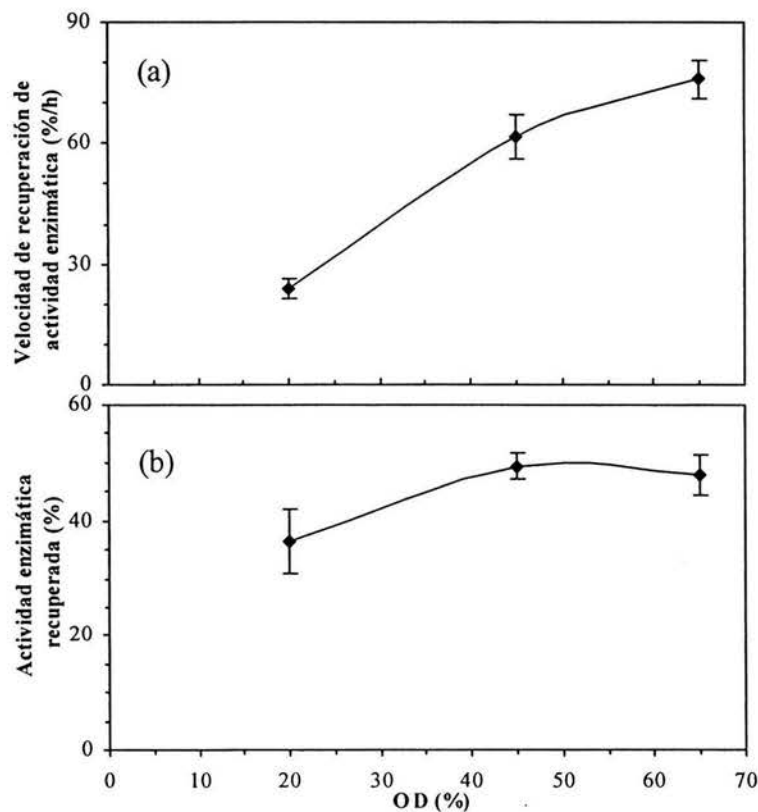


Figura 5.8. Perfiles de renaturalización de la FA a OD constante y $10 \mu\text{M}$ de CuSO_4
 (a) Velocidad de recuperación de actividad enzimática de la FA vs %OD
 (b) %Actividad total recuperada vs %OD

Como es evidente, hay un efecto más pronunciado del OD en la velocidad de recuperación de actividad ya que el porcentaje de actividad recuperada se mantiene constante cuando se oxidó a 45 y 65% de OD, lo que significa que la fuerza oxidante a la cual está expuesta la FA cuando se utilizó 10 μM de CuSO_4 es lo suficientemente alta para que en el proceso de renaturalización se obtengan los mismos rendimientos de recuperación de actividad. En nuestro caso el proceso es prácticamente la formación de por lo menos un enlace disulfuro y si observamos a la estructura de la FA (Apéndice A) es notable que los dos enlaces disulfuro están igualmente expuestos con lo cual se pudiera suponer que al agregar el ME se rompen ambos y por lo tanto al oxidar se regeneran. En trabajos anteriores se ha mencionado que el proceso de renaturalización de la FA a partir de un estado completamente desplegado es iniciado por la formación de los enlaces disulfuro y también que durante dicho proceso, el reacomodo de los enlaces disulfuro no juega un papel importante, lo que nos invita a suponer que aunque no se haya usado agente caotrópico los resultados nos pueden ser representativos de un proceso de plegamiento total, aunque no se tienen resultados suficientes para afirmarlo (Akiyama e Ito, 1992; Walker y Gilbert, 1994).

5.2.3 Cinéticas de renaturalización con 5 μM de CuSO_4 y oxígeno disuelto constante

Como se habían hecho pruebas sin CuSO_4 en las cuales no se obtuvo recuperación enzimática aunque el OD se haya elevado a 30% (Apéndice I), se infirió que en los experimentos realizados, el Cu^{+2} en su carácter de catalizador, estaba regulando el flujo de electrones de los tioles hacia el oxígeno. En estudios realizados por Ahmed *et al* (1975) sobre la reactivación de la ribonucleasa pancreática bovina usando diferentes concentraciones de Cu^{+2} y de Co^{+2} , se muestra que por debajo de 1 μM del primer catalizador, la velocidad de reactivación de dicha enzima comienza a inhibirse.

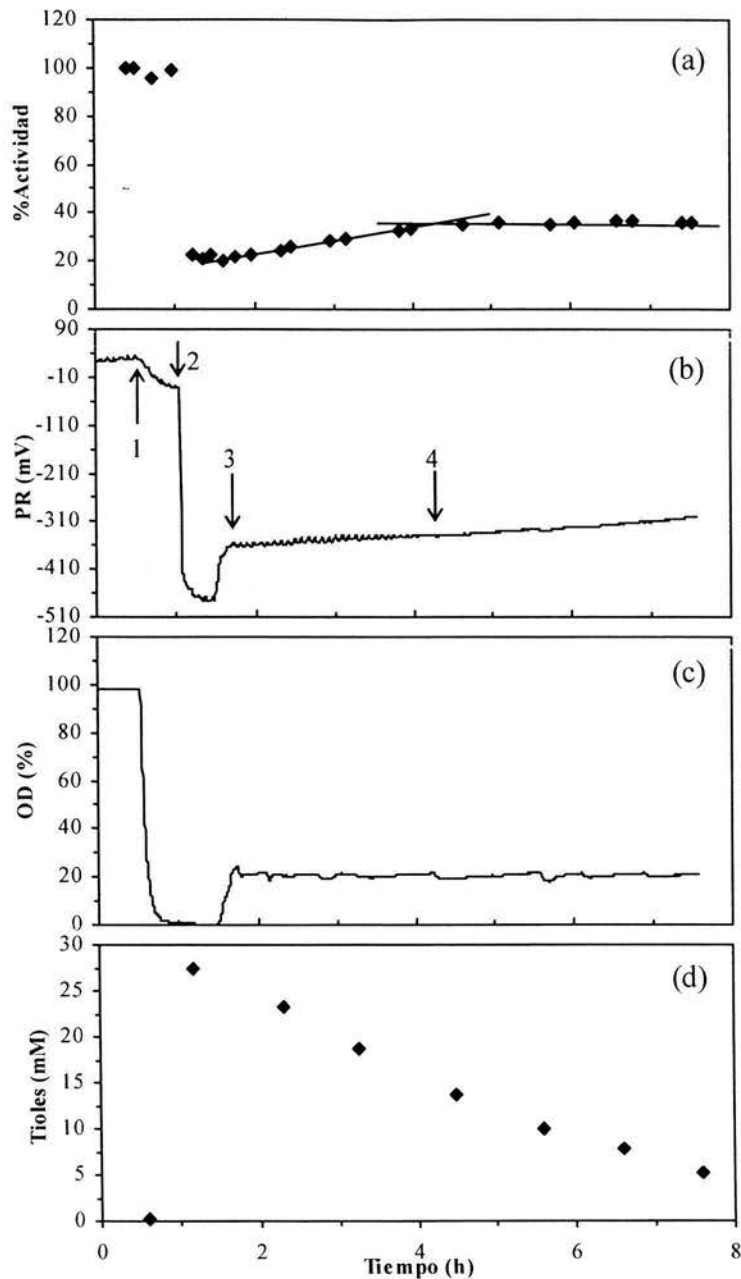


Figura 5.9. Cinética de renaturalización de la FA a 20% OD y 5 μM de CuSO_4 . (a) % Actividad enzimática (b) Potencial Redox (c) Oxígeno disuelto (d) Concentración de ME. Se burbujó N_2 (flecha 1). Se agregó ME (flecha 2). Se burbujó O_2 (flecha 3). Momento en que se detuvo la recuperación de la actividad enzimática (flecha 4).

En el presente trabajo se realizaron cinéticas de renaturalización usando 5 μM de CuSO_4 con lo cual se disminuiría el flujo de electrones y como consecuencia la velocidad de renaturalización de la FA. Así, al oxidar la FA a 20% de OD (figura 5.9) se puede observar que el grado de recuperación

de actividad alcanzado sólo fue de 20%, la mitad del que se llegó cuando se usó 10 μM de CuSO_4 (figura 5.7), pero la velocidad de recuperación de actividad enzimática se vió aún más afectada ya que disminuyó casi cuatro veces, lo cual significa que la fuerza oxidante a la cual estaba expuesta la FA se redujo considerablemente (figura 5.10). En los estudios realizados sobre la autooxidación de las cisteínas catalizada por cobre se demuestra que puede haber condiciones en las cuales el Cu^{+2} y la cisteína son limitantes y, por lo tanto controlan dicho proceso. También se describe el mecanismo de catálisis el cual se divide en dos etapas: en la primera se caracteriza por un consumo acelerado de O_2 y poca producción de ion hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), mientras que en la segunda etapa aumenta la producción de iones hidroxilo y el consumo de O_2 se estabiliza (Kachur *et al.*, 1999). Lo anterior puede explicar el fenómeno observado al oxidarse por completo el ME, el cual consistió de un aumento considerable en el consumo de oxígeno seguido de un leve decremento en la actividad enzimática, que posiblemente fue causado por la producción de iones hidroxilo producidos por la oxidación del ME y que pudieron haber afectado ya sea a un sitio de unión a nucleótido, al Zn^{+2} esencial para la catálisis, o a algún residuo fácilmente oxidable en el sitio activo como la histidina (Mordente *et al.*, 1987). La flecha 6 de la figura 5.7 indica el momento en que comienza a acelerarse el consumo de O_2 , lo cual se caracterizó por un descenso en el OD que tuvo que elevarse para mantenerlo en un valor constante durante toda la cinética. Al comparar las figuras 5.7 y 5.9, se puede observar que al disminuir la concentración de Cu^{+2} de 10 a 5 μM también disminuyeron la velocidad de oxidación de los tioles, el grado y la velocidad de recuperación de actividad. El proceso de oxidación se vio afectado, como algunas reacciones homogéneas catalizadas, por la concentración de sus reactivos y la del catalizador, sólo que en este caso se mantuvo fija la concentración de enzima en todos los experimentos mientras que la variable independiente fue el OD (Kachur *et al.*, 1999).

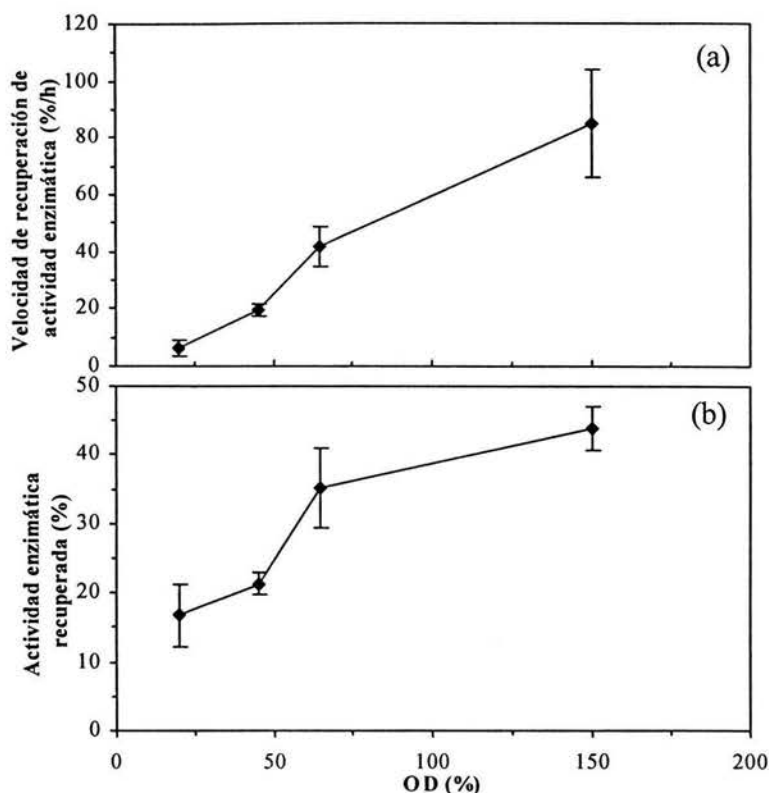


Figura 5.10. Perfiles de renaturalización de la FA a OD constante y $5 \mu\text{M}$ de CuSO_4
 (a) Velocidad de recuperación de actividad enzimática de la FA vs. %OD
 (b) %Actividad total recuperada vs. %OD

Como el cobre es el que cataliza la reacción, entonces el número de reacciones por unidad de tiempo por unidad de volumen es proporcional a la concentración de éste, lo cual explica los diferentes perfiles entre las figuras 5.8 y 5.10. En la figura 5.8 se muestra que al fijarse el OD a 65%, el porcentaje de actividad recuperada y la velocidad de recuperación de la actividad alcanzan sus valores máximos, 45% y 75%/hr, respectivamente, los cuales sólo se alcanzaron cuando se mantuvo un valor de 150% de OD cuando se oxidó con $5 \mu\text{M}$ de catalizador (figura 5.10). Esto significa que para compensar la disminución en la velocidad de oxidación debida al Cu^{+2} , se tuvo que aumentar la concentración de O_2 para aumentar la fuerza oxidante del medio.

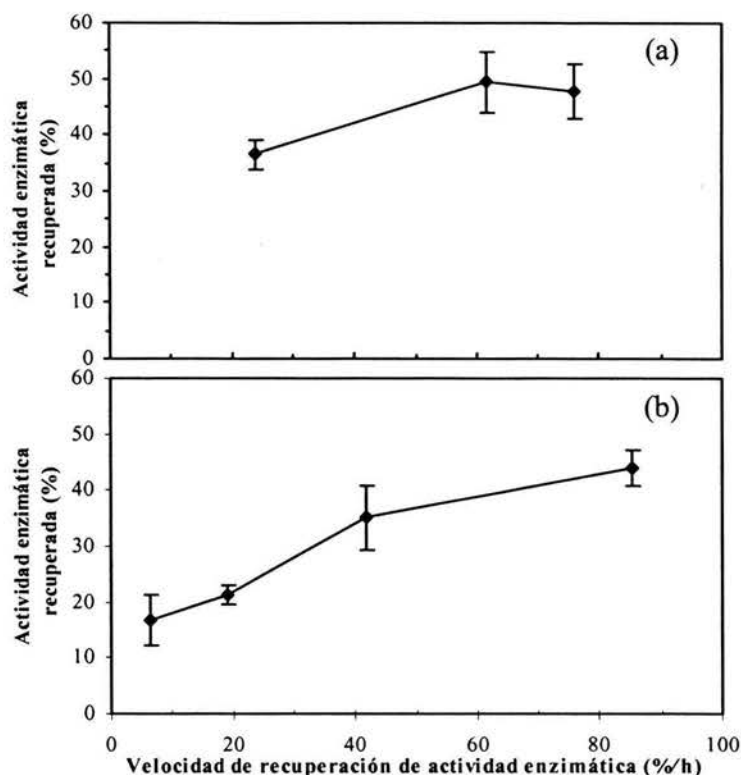


Figura 5.11. Dependencia del grado de renaturalización de la FA sobre la velocidad de renaturalización de la FA. Comparación de los perfiles de velocidad de recuperación de actividad enzimática cuando se usó (a) 10 μM de CuSO_4 y (b) 5 μM de CuSO_4 .

El grado de recuperación de la actividad enzimática dependió proporcionalmente de la velocidad de recuperación de actividad de la FA, ya que como se había mencionado, existen dos procesos de pérdida de actividad de los cuales el segundo (lento) puede estar compitiendo con el proceso de renaturalización. Entonces, entre más lenta es la renaturalización, más mermará el proceso lento al grado de recuperación de actividad. En la figura 5.11 se puede apreciar que, conforme se fue disminuyendo la velocidad de recuperación de actividad de la FA, el grado de recuperación de la misma también lo hizo. De las figuras 5.6 y 5.7 se puede inferir un esquema en el cual se muestra los posibles estados en los cuales la enzima estuvo en cada una de las cinéticas realizadas.

En la figura 5.12, la enzima desnaturalizada 1 representa el estado que la enzima adquirió inmediatamente después de agregar el ME mientras la enzima desnaturalizada 2 es el estado al cual llega la FA al final de la cinética lenta mostrada en la figura 5.6. La enzima activa es el estado renaturalizado mediante oxidación con O_2 , al cual sólo se pudo llegar cuando se partió de la enzima desnaturalizada 1 ya que la enzima desnaturalizada 2 es un estado que ha sufrido un cambio estructural irreversible en el cual la recuperación del enlace disulfuro responsable de la actividad ya no es posible mediante el método usado. No se puede afirmar que el enlace disulfuro relacionado con la estabilidad de la proteína no se haya roto desde un principio ya que sólo se registró la pérdida de actividad.

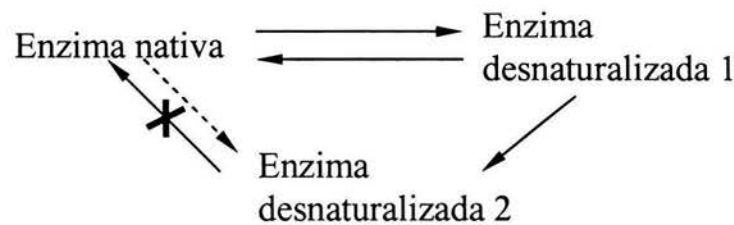


Figura 5.12. Esquema de renaturalización de la fosfatasa alcalina de Escherichia coli

5.2.4 Cinéticas de renaturalización con $5 \mu M$ de $CuSO_4$ y PR constante

Como muestran los resultados, se pudo aumentar el grado y velocidad de renaturalización mediante la manipulación de la concentración de O_2 en el medio (figura 5.10), la cual representa un valor de la demanda de electrones en el sistema. Sin embargo, es importante recalcar que la velocidad de intercambio de electrones entre el electrodo y el medio fue favorecida por el platino, de forma similar, la transferencia de electrones entre el O_2 y la proteína reducida necesitó la presencia de Cu^{+2} para que ésta se llevara a cabo a una velocidad suficientemente rápida para registrar recuperación de actividad enzimática, entonces la disponibilidad de los electrones para ser transferidos de la enzima

al oxígeno se pudo relacionar con el OD y el PR sólo cuando se disminuyó la concentración de catalizador.

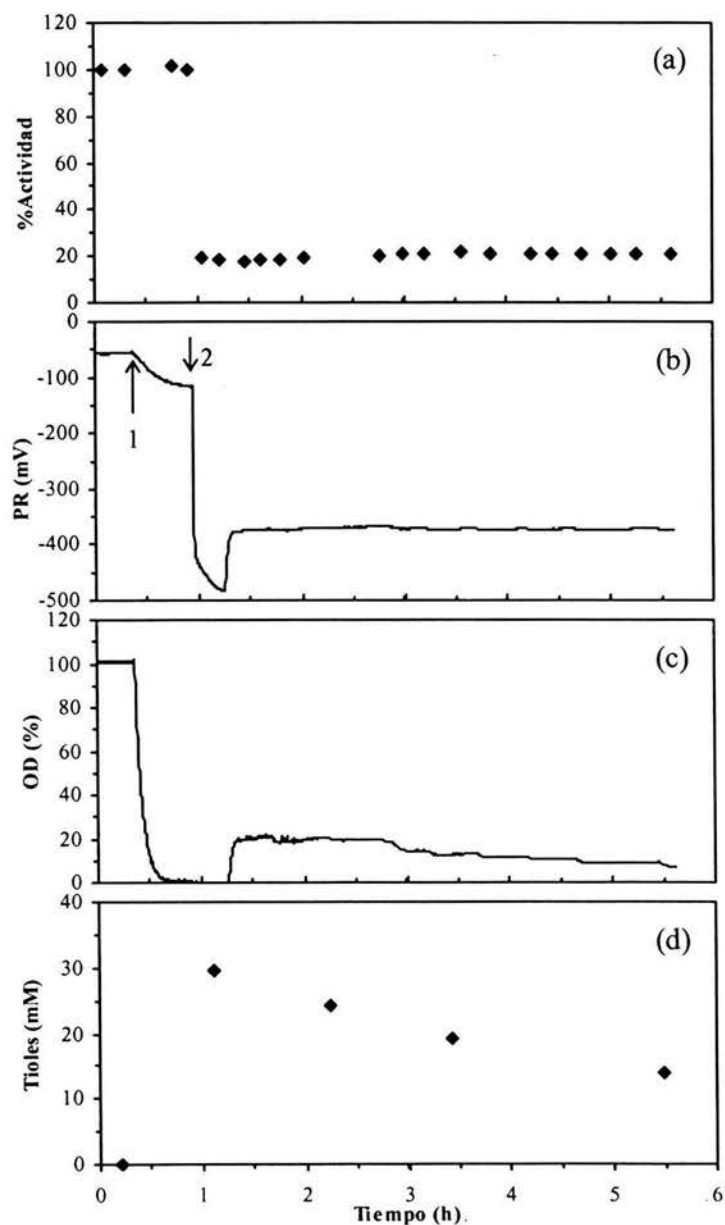


Figura 5.13. Cinética de renaturalización de la FA a -370 mV y $5 \mu\text{M}$ de CuSO_4 . (a) % Actividad enzimática (b) Potencial Redox (c) Oxígeno disuelto (d) Concentración de ME. Se burbujó N_2 (flecha 1). Se agregó ME (flecha 2). Se controló el PR mediante la disminución del OD a partir de un valor inicial de 20%.

El concepto de potencial implica la capacidad de realizar un trabajo, sin embargo, no determina la velocidad a la cual se lleva a cabo dicho trabajo. Así, la señal del electrodo una medida del potencial redox del medio si se considera que existe una alta velocidad de intercambio electrónico entre el electrodo y el medio, pero el flujo de electrones entre la FA y el medio puede llevarse a cabo a diversas velocidades independientemente del potencial redox medido con el electrodo.

Para controlar el valor de PR medido con el electrodo a un valor constante fue necesario disminuir el OD gradualmente (figura 5.13) y así mantener una relación entre el O_2 y el ME (principal par redox) igual o cercano a un valor constante. No obstante, como se muestra en el apéndice K, dicha relación tiende ligeramente a disminuir conforme pasa el tiempo.

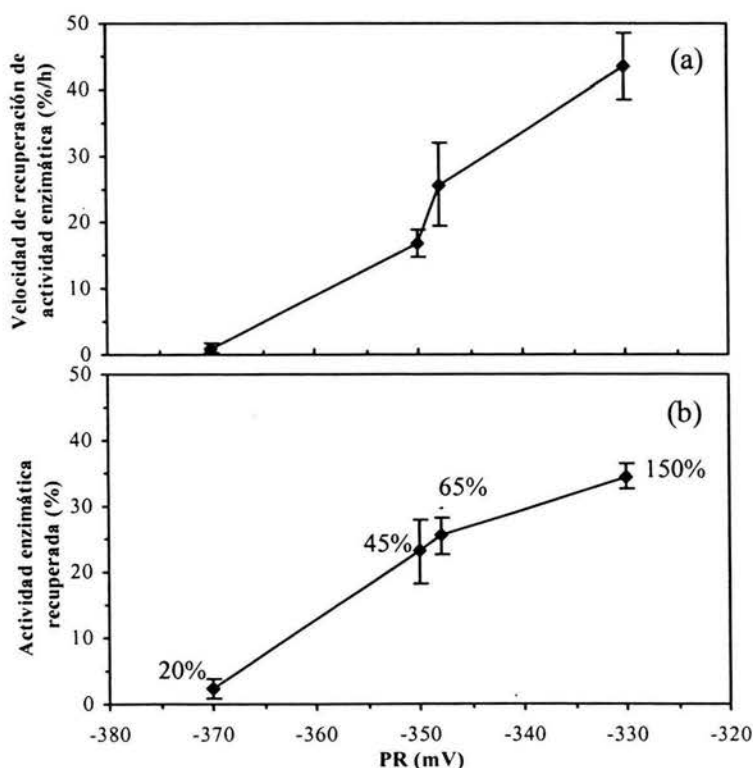


Figura 5.14. Perfiles de renaturalización a PR constante y $5 \mu\text{M}$ de CuSO_4 . Se controló el PR a -370 mV , -350 mV , -355 mV y -330 mV que son que se obtuvieron inmediatamente después de que el OD se elevó a 20%, 45%, 65% y 150% respectivamente. (a) Velocidad de renaturalización de la FA vs. PR (b) %Actividad total recuperada vs. PR.

Para verificar si había un efecto al controlar el PR se elevó el OD hasta 20%, 45%, 65% y 150%, y a partir de ahí se mantuvo un valor constante de PR (Apéndice G). Como se puede notar en la figura 5.14, existen dos puntos que están muy cercanos debido a que cuando se elevó a 45% y 65% se obtuvieron -350 mV y -355 mV respectivamente, y por lo tanto el grado de recuperación de la FA prácticamente fue el mismo en ambos valores de PR. Sin embargo, cuando se controló a -370 mV, la recuperación de la FA casi fue nula. La figura 5.13 muestra que la actividad enzimática se mantuvo constante durante toda la cinética. Si lo analizamos mediante el esquema de la figura 5.12, se puede inferir que la velocidad del proceso lento de desnaturalización de la FA se iguala a la velocidad de recuperación de tal forma que por cada molécula que se oxida (Enzima activa) existe otra que se desnaturaliza irreversiblemente (Enzima desnaturalizada 2).

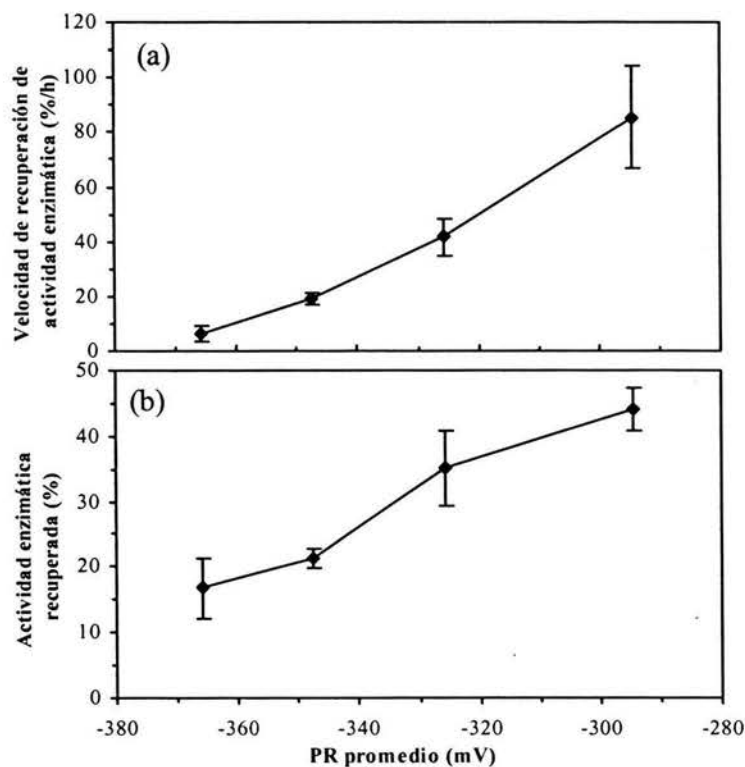


Figura 5.15. Perfiles de renaturalización a OD constante y $5 \mu\text{M}$ de CuSO_4 . Se obtuvo el promedio del PR durante el proceso de recuperación de actividad enzimática a OD constante. (a) Velocidad de recuperación de actividad vs. PR promedio. (b) %Actividad total recuperada vs. PR promedio.

Como se esperaba, al aumentar el valor de PR aumentó el grado de recuperación de la FA. Durante el proceso de renaturalización a OD constante, la FA recuperó su actividad en un lapso de tiempo mientras que el PR se mantuvo elevándose durante toda la cinética por lo que se obtuvo el promedio del PR cuando la enzima se mantuvo elevando su actividad en dichas cinéticas. De esta forma se pudo evaluar el PR cuando se controló el OD con 5 μM de CuSO_4 . En la figura 5.9 se promedió el valor de PR indicado por la flecha 3 y el valor indicado por la flecha 4, justo cuando la enzima detuvo su renaturalización. El punto en el cual las líneas trazadas se cruzan en la figura 5.9a es considerado como el momento en el que la renaturalización de la enzima se detiene. El comportamiento de la recuperación que se observa en la figura 5.14 es muy parecido al de la figura 5.15, excepto por el punto en el que no hubo recuperación de la actividad, cuando se controló a -370 mV. Podría inferirse que dicho valor es el límite a partir del cual se puede obtener recuperación de actividad, ya que cuando el PR promedio fue de -350 mV se obtuvo un valor de 23% de recuperación (Figura 5.15) que es similar al resultado obtenido cuando se controló el PR a -350 mV (figura 5.14). Entonces, al elevar el valor del OD se aumentó la fuerza oxidante en el medio de tal forma que a valores de PR mayores se obtuvo un mayor grado de recuperación de la actividad enzimática.

Cabe mencionar que las primeras cinéticas realizadas en las que se obtuvo recuperación de actividad fue debido a que el termopozo (tubo ciego para meter el sensor de temperatura) tenía adherido un pedazo de soldadura, la cual, catalizó la reacción de renaturalización de la FA y la oxidación del ME. Dentro de los diversos metales de los que se compone la soldadura, se encuentra el cobre, que es el metal más usado para aumentar el grado de renaturalización de varias proteínas (Archarya y Taniuchi, 1976; Menzella *et al.*, 2002). En el apéndice H se muestran las cinéticas que se obtuvieron, y en especial la figura H-5 muestra la prueba en la cual se usó un termopozo sin

soldaduras, y la flecha 3 indica el momento en el cual se introdujo el termopozo que tenía la soldadura con lo cual la recuperación de la actividad enzimática comienza. Originalmente se pensaba que el Zn^{+2} era el metal que catalizaba la oxidación de los tioles pero en algunos experimentos no se registraba recuperación de actividad (Ahmed *et al.*, 1975). Otro fenómeno observado fue el de la pérdida de actividad enzimática debido a que la resistencia eléctrica tenía un corto circuito por el cual se hacían descargas eléctricas al medio de renaturalización y algunas veces causaba ruido en la medición de OD.

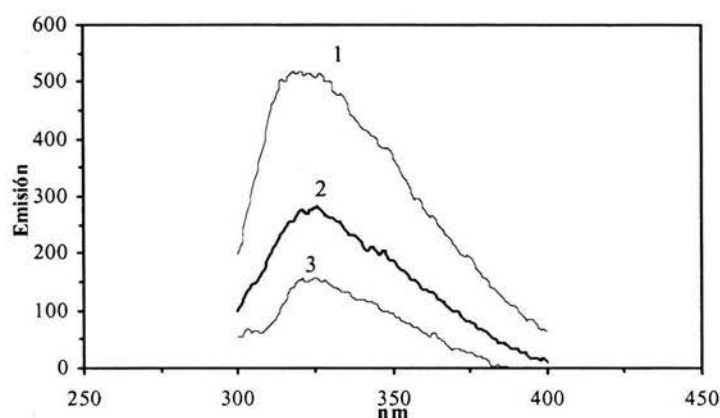


Figura 5.16. Primera cinética de desnaturalización de la FA en el espectro de fluorescencia. Espectros de emisión de fluorescencia de la FA a después de (2) 127 y (3) 146 minutos de agregar el ME (25 mM). Espectro 1 es de la FA nativa. La longitud de onda de excitación fue de 280 nm.

5.3 Espectro de fluorescencia

Para analizar el cambio estructural que la enzima sufrió durante el proceso lento de pérdida de actividad (figura 5.6), se realizaron dos cinéticas en el espectrómetro de fluorescencia en el cual se midió el espectro de emisión en el intervalo de 300 a 400 nm, con una longitud de onda de excitación de 280 nm. La fluorescencia es el fenómeno de la emisión de radiación de algunas sustancias después de absorber una radiación de menor longitud de onda. Por lo general, las sustancias que presentan fluorescencia considerable tienen electrones deslocalizados de sus enlaces

dobles conjugados como los de los anillos aromáticos de la quinina o del antraceno. De todos los aminoácidos en una proteína, los triptofanos representan el 90% de la fluorescencia que ésta emite, lo cual ha sido de utilidad en el estudio del plegamiento de diversas proteínas debido a que su máximo de emisión refleja el grado de exposición de sus triptofanos al agua. Entonces, cuando una proteína que tiene localizados internamente a sus triptofanos, sufre una desnaturalización, el valor de su máximo de emisión va a disminuir y desplazarse hacia el color rojo durante dicho proceso. En la figura 5.16 la curva 1 representa el espectro de emisión de la enzima nativa cuando se excitó a 280 nanómetros, las curvas 2 y 3 después de 127 y 146 minutos de que se agregó el mercaptoetanol. La pérdida de emisión nos puede indicar que se está desnaturalizando la enzima.

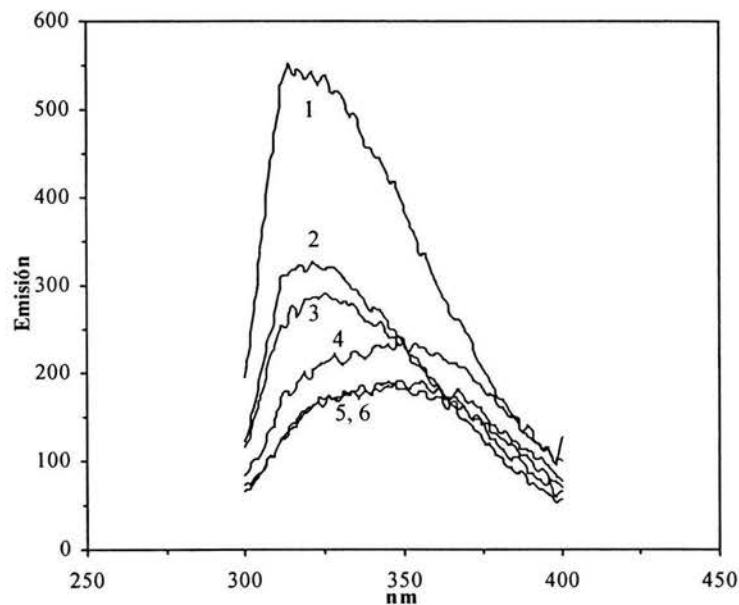


Figura 5.17. Segunda cinética de desnaturalización de la FA en el espectro de fluorescencia. Espectros de emisión de fluorescencia de la FA a después de (1) 0, (2) 19, (3) 35, (4) 87, (5) 111 y (6) 142 minutos de agregar el ME (25mM). La longitud de onda de excitación fue de 280 nm.

Se realizó otra cinética que se muestra en la figura 5.17. en la cual la curva 1 muestra el espectro de la enzima nativa; la curva 2 muestra la enzima después de 19 minutos de haberse mezclado con

mercaptoetanol y así las curvas 3, 4, 5 y 6 muestran el espectro después de 35, 87, 111 y 142 minutos, respectivamente. La proteína nativa muestra un máximo a 325 nm lo que nos indica que los triptofanos están en un ambiente hidrofóbico.

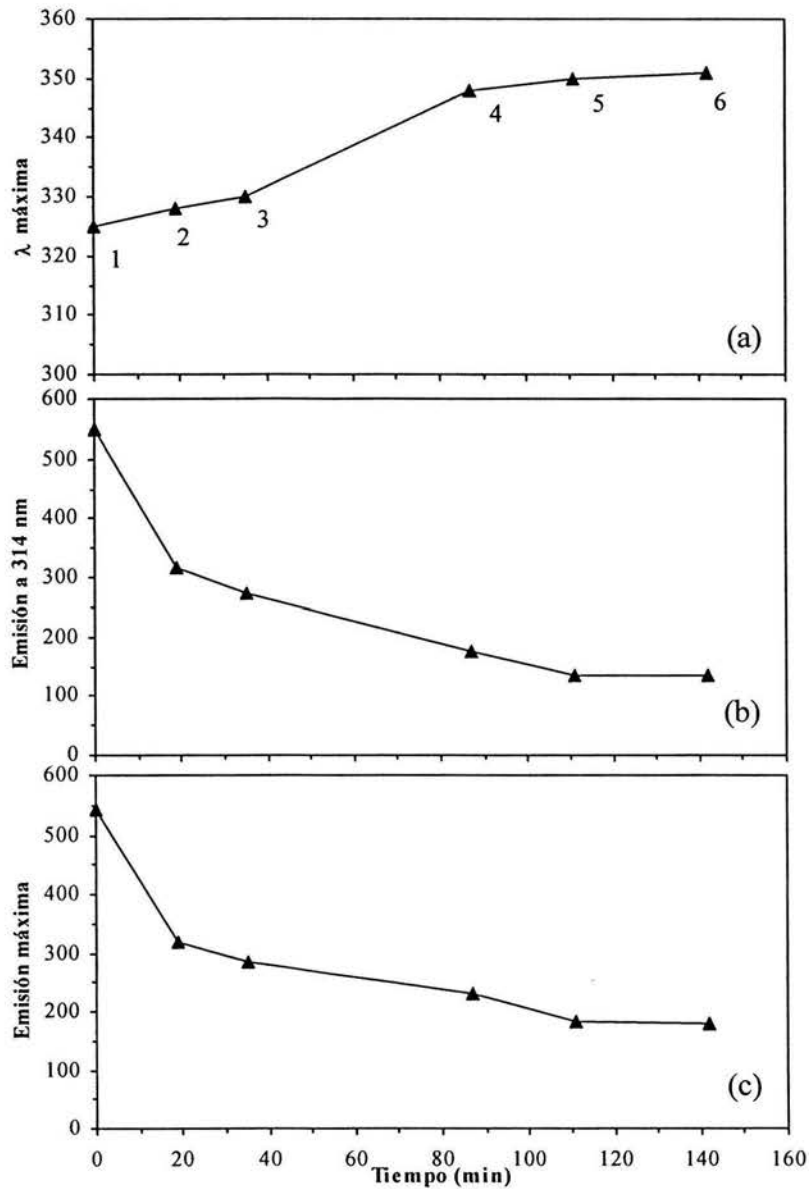


Figura 5.18. Cambio de (a) la longitud de onda, (b) la emisión a 314 nm y (c) los máximos de emisión de cada espectro, después de (1) 0, (2) 19, (3) 35, (4) 87, (5) 111 y (6) 142 minutos de agregar el ME.

Durante la exposición al ME (curvas 2, 3, 4 y 5), el máximo se desplaza hacia 350 nm, lo que nos da una evidencia típica de que es un proceso de desnaturalización ya que en los estudios de desnaturalización de la FA de *E. coli* con cloruro de guanidinio también se muestra un desplazamiento del máximo de emisión de fluorescencia (Sarkar y Ghosh *et al.*, 1996).

En la figura 5.18 se puede apreciar la cinética de la disminución de fluorescencia y del cambio de longitud de onda del máximo de cada uno de los espectros de la figura 5.17. La longitud de onda en la cual se llevó a cabo la mayor disminución de la fluorescencia fue de 314 nm. En general el apagamiento de la emisión ocurrió inmediatamente después de agregar el ME y después se hizo lento lo cual representa un carácter cinético parecido al de la Figura 5.6, es decir la pérdida de actividad es inmediata al agregar el tiol y después se hace lenta. En cambio, la longitud de onda del máximo de emisión se desplaza hacia el rojo de forma más notable entre los 35 y 87 minutos.

Todas las cinéticas se llevaron a cabo en una celda de cuarzo y a las mismas condiciones en las que se llevaron a cabo las cinéticas de renaturalización, excepto que se usó una concentración de enzima de 3.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para que la emisión de fluorescencia fuera significativa. Trabajos que se han enfocado al proceso de agregación, han utilizado concentraciones de proteína que van desde 0.1 hasta 1 mg/mL , y se ha sugerido que las concentraciones óptimas para el proceso de renaturalización está en el intervalo de 10 – 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (De Bernardez Clark *et al.*, 1998, Rudolph y Lilie, 1996). La concentración de proteína que se usó en el presente trabajo fue de 0.64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ lo cual está muy por debajo de los valores mencionados procurando así evitar la agregación de nuestra proteína modelo.

6.-CONCLUSIONES

- En nuestro sistema, el PR fue una función lineal del pH hasta que se alcanzó el valor del pKa de la glicina.
- El pKa de la glicina se pudo estimar mediante la medición del PR con electrodo en la solución de glicina con y sin ME.
- El PR fue una función logarítmica del OD en nuestro sistema.
- La fosfatasa alcalina de *Escherichia coli* fue estable en la solución de glicina durante 9 horas.
- En nuestro sistema, el proceso de desnaturalización de la fosfatasa alcalina de *Escherichia coli* aparentemente se llevó a cabo mediante dos procesos: uno instantáneo y otro lento.
- Los espectros de fluorescencia muestran que los triptofanos se exponen a un ambiente más acuoso durante la desnaturalización de la FA.
- El proceso de renaturalización de la FA requirió del catalizador Cu^{+2} para llevarse a cabo.
- Al usar una concentración de $5\mu\text{M}$ de CuSO_4 , se pudo obtener diferentes rendimientos en la renaturalización de la FA al controlar a diferentes valores de OD. Conforme se oxidó a mayores valores de OD se obtuvieron mayores rendimientos.
- La renaturalización y la desnaturalización lenta fueron procesos que aparentemente compitieron durante las cinéticas.
- El PR medido con un electrodo fue una medida del ambiente redox al cual la FA fue expuesta sólo cuando se usó $5\mu\text{M}$ de CuSO_4 .
- Al controlar el OD se controló implícitamente el PR y ambas variables tuvieron una relación proporcional con el grado de renaturalización de la FA de *Escherichia coli*.

7.-PERSPECTIVAS

En el presente trabajo se manipularon el OD y el PR, mientras que el pH se mantuvo constante, lo cual deja como perspectiva inmediata el comparar el grado de recuperación de la actividad enzimática de la FA a diferentes valores de pH, lo cual implicaría cambiar la sustancia amortiguadora de pH. También podrían repetirse los mismos experimentos realizados en el presente trabajo, pero usando cobalto como catalizador que, según los experimentos realizados por Ahmed *et al* (1975), se esperaría una disminución en la velocidad de renaturalización, lo cual se podría compensar con un aumento en la concentración de cobalto y/o un aumento en el OD para mantener el flujo de electrones de la FA hacia el O₂. Por otro lado, se podrían realizar los mismos experimentos a partir de la FA completamente desnaturalizada por agente caotrópico y ME, lo cual implicaría un incremento en la concentración de la enzima para alcanzar a detectar recuperación de actividad. En este último caso se podría disminuir el volumen de trabajo porque para medir la actividad enzimática se tomaría un volumen pequeño y se diluiría en la celda del espectrofotómetro sin peligro a una reoxidación instantánea en la dilución. En el presente trabajo se controló el PR mediante la disminución del OD conforme se oxidaba el ME pero otra estrategia sería mantener el OD constante mientras se adiciona ME para mantener el PR a un valor constante. Dicha estrategia de control del PR podría incrementar los rendimientos (Fischer *et al.*, 1992).

8.- BIBLIOGRAFÍA

- Acharya A.S., Taniuchi H. (1976). A study of renaturation of reduced hen egg white lysozyme. *The Journal of Biological Chemistry*, 251: 6934-6946.
- Ahmed A.K., Schafer S.W., Wetlaufer D.B. (1975). Nonezymic reactivation of reduced bovine pancreatic ribonuclease by air oxidation and by glutathione. *The Journal of Biological Chemistry*, 250: 8477-8442.
- Akiyama Y., Ito K. (1989). Export of *Escherichia coli* alkaline phosphatase attached to an integral membrane protein, SecY. *The Journal of Biological Chemistry*, 264: 437-442.
- Akiyama Y., Ito K. (1993). Folding and assembly of bacterial alkaline phosphatase *in vitro* and *in vivo*. *The Journal of Biological Chemistry*, 268: 8146-8150.
- Akiyama Y., Kamitani S., Kusukawa K., Ito K. (1992). *In vitro* catalysis of oxidative folding of disulfide-bonded proteins by the *Escherichia coli* dsbA(ppfA) gene product. *The Journal of Biological Chemistry*, 267: 22440-22445.
- Anfinsen C.B. (1973). Principles that govern the folding of protein chains. *Science*, 181: 223-230.
- Bardwell J.C.A., Lee J.O., Jander G., Martin N., Belin D., Beckwith J. (1993). A pathway for disulphide formation *in vivo*. *Proceedings of the National Academic of Sciences USA*, 90: 1038-1042.
- Bardwell J.C.A., McGovern K., Beckwith J. (1991). Identification of a protein required for bond formation *in vivo*. *Cell*, 67: 581-589.
- Berdichevsky Y., Lamed R., Frenkel D., Gphna U., Bayer E.A., Yaron S., Shohan Y., Benhar I. (1999). Matrix-assisted folding of single-chain Fv cellulose binding domain fusion poteins. *Protein Expression and Renaturation*, 17: 249-259.
- Bessette P.H., Aslund F., Beckwith J., Georgiu G. (1999). Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in *Escherichia coli* cytoplasm. *Proceedings of the National Academic of Sciences USA*, 96: 13703-13708.
- Boyd D., Willard S., Guan C.D., Wright W., Beckwith J. (1987). in *Phosphatase Metabolism and celluar regulation in microorganism* (Torriani-Gorini A., Rothman F.G., Silvers., Wright A., and Yagil E., eds) pp. 89-93. American Society of Microbiology Press, Washington, D.C.
- Bradshaw R.A., Cancedda F., Ericsson H.L., Neumann P.A., Piccoli S.P., Schelesinger M.J., Shriefer K., Walsh K.A. (1981). Amino acid sequence of *Escherichia coli* alkaline phosphatase. *Proceedings of the National Academic of Sciences USA*, 78: 3473-3477.

- Bremer H., Dennis P.P. (1996). Modulation of chemical composition and other parameters of the cell by growth rate. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology*, (2nd edn). Neidhardt, F.C. (ed.). ASDM Press, Washington, DC, p. 1553.
- Bühler H., Bucher R. (1982). Redox measurement. Principles and Problems. GIT Fachz. Lab, 26: 839. Catálogo Ingold.
- Buswell A.M., Ebtinger M., Vertés A.A., Middelberg A.P.J. (2002). Effect of operating variables on the yield of recombinant trypsinogen for a pulse-fed dilution-refolding reactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 77: 435-444.
- Creighton T.E. (ed) (1992). Protein folding. Freeman, San Francisco, p. 172.
- De Bernardez Clark E. (2001). Protein refolding for industrial processes. *Current Opinion in Biotechnology*, 12: 202-207.
- De Bernardez Clark E., Hevehan D., Szela S., Maachupalli-Reddy J. (1998). Oxidative renaturation of hen egg-white lysozyme. Folding vs aggregation. *Biotechnology Progress*, 14: 47-54.
- De Bernardez Clark E., Schwarz E., Rudolph R. (1999). Inhibition of aggregation side reactions during *in vitro* protein folding. *Methods in Enzymology*, 309: 217-236.
- De León A., Mayani H., and Ramírez OT (1998). Design, characterization, and application of a minibioreactor for the culture of human hematopoietic cells under controlled conditions. *Cytotechnology*, 28 (1-3): 127-138.
- Dobson C.M., Sali A., Karplus M. (1998). Protein folding: a perspective from theory and experiment. *Angew Chem Int Ed Eng*, 37: 868-893.
- Duda C.T., Light A. (1982). Refolding of bovine threonine-neochymotrypsinogen. *The Journal of Biological Chemistry*, 257: 9866-9871.
- Eisenberg D., Crothers D. (1979). *Physical Chemistry, with Applications to the Life Science*. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. pp 367-392.
- Ellis R.J., Hartl F.U. (1999). Principles of folding in cellular environment. *Current Opinion in Structural Biology*, 9: 102-110.
- Ellman G.L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82: 70-77
- Fersht A.R. (1999). *Structure and mechanism in protein science: guide to enzyme catalysis and protein folding*. Freeman, New York
- Fischer B., Summer I., Goodenough P. (1993). Isolation, renaturation and formation of disulfide bonds of eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli* as inclusion bodies, 41: 3-13.

- Fogler H.S. (1999). Elements of Chemical Reaction Engineering. Prentice Hall International Series in the Physical and Chemical Engineering Sciences, 3rd ed. New Jersey: Upper Saddle River. pp. 582.
- Frand A.R., Kaiser C.A. (1998). The ERO1 gene of yeast is required for oxidation of protein dithiols in the endoplasmic reticulum. *Molecular Cell*, 1: 161-170.
- Frand A.R., Kaiser C.A. (1999). Ero1p oxidizes protein disulfide isomerase in a pathway for disulfide bond formation in the endoplasmic reticulum. *Molecular Cell*, 4: 469-477.
- Gavit P., Better M. (2000). Production of antifungal recombinant peptides in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 79: 127-136.
- Georgiu G., Valax P. (1999). Isolating inclusion bodies from bacteria . *Methods in Enzymology*, 309: 48-58.
- Goeghegan, K. F. 1996 Chemical Modification of Proteins *Current Protocols in Protein Science*: (15.1.13).
- Goldberg M.E., Rudolph R., Jaenicke R. (1991). A kinetic study of the competition between renaturation and aggregation during the refolding of denatured-reduced egg white lysozyme. *Biochemistry*, 30: 2790-2797.
- Harrison S.C., Durbin R. (1985). Is there a single pathway for the folding of a polypeptide chain? *Proceedings of the National Academic of Sciences USA*, 82: 4028-4030.
- Higareda A.E., Possani L.D., Ramírez O.T. (1997). The use of culture redox potential and oxygen uptake rate for assessing glucose and glutamine depletion in hybridoma cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 56: 555-563.
- Hooper K.L., Sheasley S.L., Gilbert H.F., Thorpe C. (1999). Sulfhydryl oxidase from egg white: a facile catalyst for disulfide formation in proteins and peptides. *The Journal of Biological Chemistry*, 274: 22147-22150.
- Hwang C., Sinskey A.J., Lodish H.F. (1992). Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science*, 257: 1496-11502.
- Hwang Ch., Sinskey A.J. (1991). The role of oxidation-reduction potential in monitoring growth of cultured mammalian cells. In Spier, R.E., Griffiths, J.B. and Meigner, (eds.), *Production of biologicals from animal cells in culture*. B. Halley Court, Oxford, pp 548-567.
- Jaenicke R. (1998). Protein self-organization *in vitro* and *in vivo*: partitioning between physical biochemistry and cell biology. *Biological Chemistry*, 397: 237-243.
- Jander G., Martin N.L., Beckwith J.(1994). Two cysteines in each periplasmic domain of the membrane protein DsbB are required for its function in protein disulfide bond formation. *EMBO Journal*, 13: 5121-5127.

- Kaake R.H., Roberts D.J., Stevens T.O., Crowford R.L., Crowford D.L. (1992). Bioremediation of soils contaminated with herbicide 2-sec-Butyl-4,6-Dinitrophenol (Dinoseb). *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 1683-1689.
- Kachur A.V., Koch C.J., Bioglow J.E. (1999). Mechanism of copper-catalyzed autoxidation of cysteine. *Free Radical Research*, 31: 23-34.
- Kato S., Kato Y. (2000). Continuous refolding of lysozyme with fed-batch addition of denatured protein solution. *Process Biochemistry*, 35: 1119-1124.
- Khan R.H., Rao K.B.C.A., Eshari A.N.S., Totey S.M., Panda A.K. (1998). Solubilization of recombinant ovine growth hormone with retention of native-like secondary structure and its refolding from the inclusion bodies of *Escherichia coli*. *Biotechnology Progress*, 14: 722-728.
- Kim C.S., Lee E.K. (2000). Effects of operating parameters in *in vitro* renaturation of a fusion protein of human growth hormone and glutathione S-transferase from inclusion body. *Process Biochemistry*, 36: 111-117.
- Kim E.E., Wyckoff H.W. (1991). Reaction mechanism of alkaline phosphatase based on crystal structures. Two-metal ion catalysis. *Journal of Molecular Biology*, 218: 449-464.
- Kjaergaard L. (1977). The redox potential: its use and control in biotechnology. *Advances in Biochemical Engineering*, 7: 131-150.
- Kobayashi T., Kishigami S., Sone M., Inokuchi H., Mogi T., Ito K. (1997). Respiratory chain is required to maintain oxidized states of the DsbA-DsbB disulfide bond formation system in aerobically growing *Escherichia coli* cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 94: 11857-11862.
- Kwong C.W., Rao G. (1991). Utility of culture redox potential for identifying metabolic state changes in amino acid fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 38: 1034-1040.
- Laboissière M.C.A., Sturley S.L., Reines R.T. (1995). The essential function of protein-disulfide isomerase is to unscramble non-native disulfide bonds. *The Journal of Biological Chemistry*, 270: 28006-28009.
- Lazaridis T. (2001). Solvent size vs. cohesive energy as the origin of hydrophobicity. *Accounts of Chemical Research*, 34: 931-937.
- Lyles M.M., Gilbert H.F. (1991). Catalysis of the oxidative folding of ribonuclease A by protein disulfide isomerase: dependence of the rate on the composition of the redox buffer. *Biochemistry*, 30: 613-619.
- Maachupalli-Reddy J., Kelley B.D., De Bernardes Clark E. (1997). Effect of inclusion body contaminants on oxidative renaturation of hen egg white lysozyme. *Biotechnology Progress*, 13: 144-150.

- Meneses A., Gómez A., Ramírez O.T. (1999). Feedback control of redox potential in hybridoma cell cultures. In: Bernard A, Griffiths B, Noé W, Wurm F, (eds). *Animal Cell Technology: Products from Cells, Cells as Products*. Kluwer Academic Publishers, Dodrecht, The Netherlands, pp. 23-27.
- Meneses, A. (2001). El potencial de óxido-reducción: implicaciones y efectos en el cultivo de células de eucariotes superiores. Tesis de Doctorado en Ciencias Bioquímicas. IBT-UNAM, pp. 31.
- Menzella H.G., Gramajo H.C., Ceccarelli E.A. (2002). High recovery of prochymosin from inclusion bodies using controlled air oxidation. *Protein Expression and Purification*, 25: 248-255.
- Mordente A., Miggiano G.A.D., Martorana G.E., Meucci E., Santini S.A., Castelli A. (1987). Alkaline phosphatase inactivation by mixed function oxidation systems. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 258:176-185.
- Muller C., Rinas U. (1999) Renaturation of heterodimeric platelet-derived growth factor from inclusion bodies of recombinant *Escherichia coli* using size-exclusion chromatography. *Journal of Chromatography A*, 855: 203-213.
- Nelson D.L., Cox M. M. (2000). *Lehninger Principles of Biochemistry*. Worth Publishers 3rd ed. New York. pp 117-120.
- Patra A.K., Mukhopadhyay R., Muhhija R., Krishnan A., Garg L.C., Panda A.K. (2000). Optimization of inclusion body solubilization and renaturation of recombinant human growth hormone from *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 18: 182-192.
- Pollard M.G., Travers K.J., Weissman J.S. (1998). Ero1p: a novel and ubiquitous protein with an essential role in oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Molecular Cell*, 1: 171-182.
- Qiu J., Swartz J.R., Georgiou G. (1998). Expression of human tissue-type plasminogen activator in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 4891-4896.
- Rietsch A., Bessette P., Georgiou G., Beckwith J. (1997). Reduction of the periplasmic disulfide bond isomerase, DsbC, occurs by passage of electrons from cytoplasmic thioredoxin. *Journal of Bacteriology*, 179: 6602-6608.
- Rudolph R, Lilie H. (1996). *In vitro* folding of inclusion body proteins. *FASEB*, 10: 49-56
- Sarkar S.N., Ghosh N. (1996). Reversible unfolding of *Escherichia coli* alkaline phosphatase: active site can be reconstituted by a number of pathways. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 330: 174-180.
- Schlesinger M.J., Barrett K. (1965). The reversible dissociation of the alkaline phosphatase of *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 240: 4284-4292.
- Schiene C., Fischer G. (2000). Enzymes that catalyse the restructuring of proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, 10: 40-45.

- Sone M., Kshigami S., Yoshiihisa T., Ito K. (1997). Roles of disulfide bonds in bacterial alkaline phosphatase. *The Journal of Biological Chemistry*, 272: 6174-6178.
- St. John R.J., Carpenter J.F., Randolph T.W. (2002). High pressure refolding of disulfide-cross-linked lysozyme aggregates: thermodynamics and optimization. *Biotechnology Progress*, 18: 565-571.
- Suh J-K, Poulsen L.L., Ziegler D.M., Robertus J.B. (1999). Yeast flavin-containing monooxygenase generates oxidizing equivalents that control protein folding in the endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academic of Sciences USA*, 96: 2687-2691.
- Tippens P.E. (1996). Física. Conceptos y aplicaciones. McGraw-Hill. Interamericana Editores, S.A. de C. V. México D. F., pp. 672-688.
- Tsumoto K, Ometsu M, Yamada H, Ito T, Misawa S, Kumagai I. (2003). Immobilized oxidoreductase as an additive for refolding inclusion bodies: application to antibody fragments. *Protein Engineering*, 16: 535-541.
- Vernerin J.P., Smith T., Rosenblum C.I., Vongs A., Murphy B.A., Nunes C., Mellin T.N., King J.J., Burgess B.W., Junker B., Chou M., Hey P., Frazier E., MacIntyre D.E., Van der Ploeg L.H.T., Tota M.R.(1998). Production of leptin in *Escherichia coli*: a comparison of methods. *Protein Expression and Purification*, 14: 335-342.
- Voet D., Voet J. (1995). Biochemistry. John Wiley & Sons, Inc. 2nd ed. pp. 1995.
- Walker K.W., Gilbert H.F. (1994). Effect of redox environment of the *in vitro* and *in vivo* folding of RTEM-1 β -Lactamase and *Escherichia coli* alkaline phosphatase. *The Journal of Biological Chemistry*, 269: 28487-28493.
- Wardman P. (1989). Reduction potentials of one-electron couples involving free radicals in aqueous solution. *Journal of Physical Chemistry Reference Data*, 18: 1637-1755.
- Wetlaufer D.B., Branca P.A., Chen G.X.(1987). The oxidative folding of proteins by disulfide plus thiol does not correlate with redox potential. *Protein Engineering*, 1:141-146.
- Winter J., Lilie H., Rudolph R. (2002). Renaturation of human proinsulin—a study on refolding and conversion to insulin. *Analytical Biochemistry*, 310: 148-155.
- Wunderlich M., Glockshuber R. (1993). *In vivo* control of redox potential during protein folding catalyzed by bacterial protein disulfide-isomerase (DsbA). *The Journal of Biological Chemistry*, 268: 24547-24440.
- Zapun A., Missiakas D., Raina S., Creighton T.E. (1995). Structural and functional characterization of DsbC, a protein involved in disulfide bond formation in *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 34: 5075-5089.

-Zhan X., Schwaller M., Gilbert H.F., Georgiou G. (1999). Facilitating the formation of disulfide bonds in *Escherichia coli* periplasm via coexpression of yeast protein disulfide isomerase. *Biotechnology Progress*, 15: 1033-1038.

-Zimmerman S.B., Minton A.P.(1993). Macromolecular crowding: biochemical, biophysical and physiological consequences. *Annual Rev Biophys Biomol Struct*, 22: 27-29.

9.- APÉNDICES

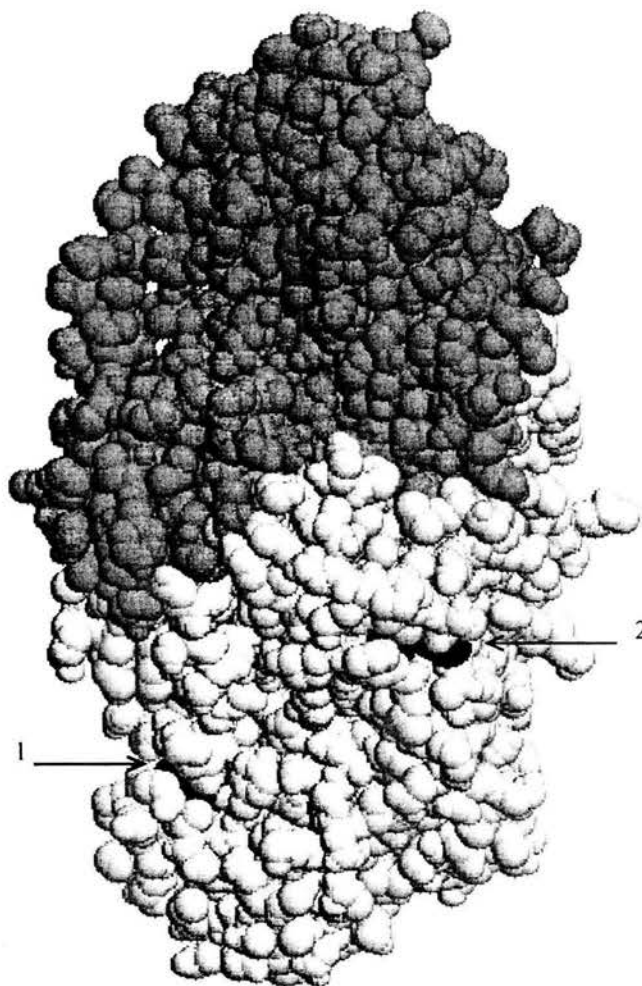
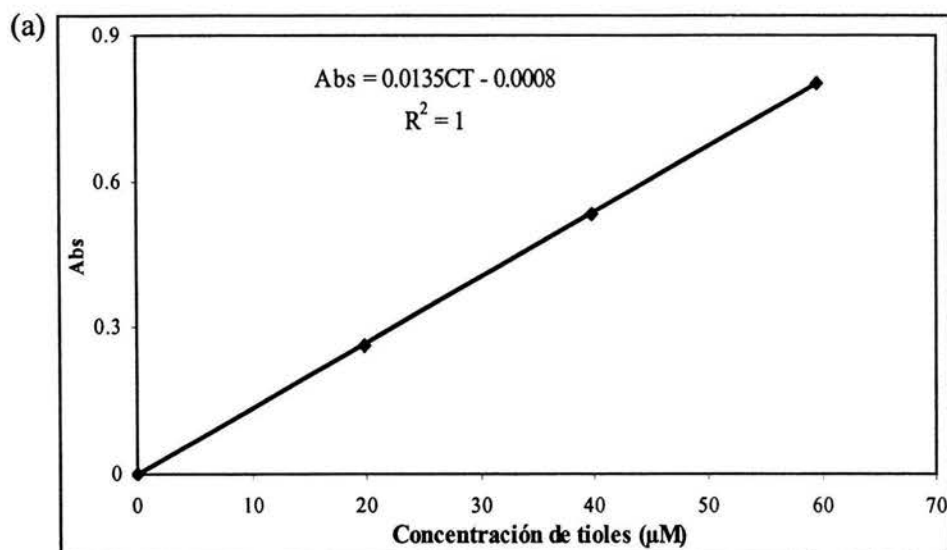
APÉNDICE A. ESTRUCTURA DE LA FOSFATASA ALCALINA DE *Escherichia coli*.

Figura A-1. Estructura de la Fosfatasa Alcalina de *Escherichia coli*. Se muestra de color negro los enlaces disulfuro responsables de la resistencia a proteólisis (flecha 1) y de la actividad enzimática (flecha 2) de uno de los monómeros de la FA que se muestran en color gris y blanco(Protein Data Bank, www.rcsb.org/pdb/).

APÉNDICE B. CURVAS ESTÁNDAR DE ABSORBANCIA (Abs) VS. CONCENTRACIÓN DE TIOLES (CT).



(b)

ECUACIÓN	R ²
Abs=0.01264CT+0.0008	1
Abs=0.01346CT-0.0008	1
Abs=0.0105CT-0.0064	1
Abs=0.01324CT-0.0057	0.9996
Abs=0.01264CT-0.0003	0.9999
Abs=0.01247CT-0.006	0.9996
Abs=0.01221CT-0.0083	0.9986
Abs=0.01214CT-0.0014	1
Abs=0.01225CT-0.0021	0.9999

Figura B-1. (a) Gráfica de la curva estándar de cisteínas en una solución de KH_2PO_4 , 10 mM de EDTA a pH = 8.0 (b) Ecuaciones de las curvas de cisteínas usadas en algunas cinéticas.

APÉNDICE C. EFECTO DEL MERCAPTOETANOL EN EL POTENCIAL REDOX Y EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.

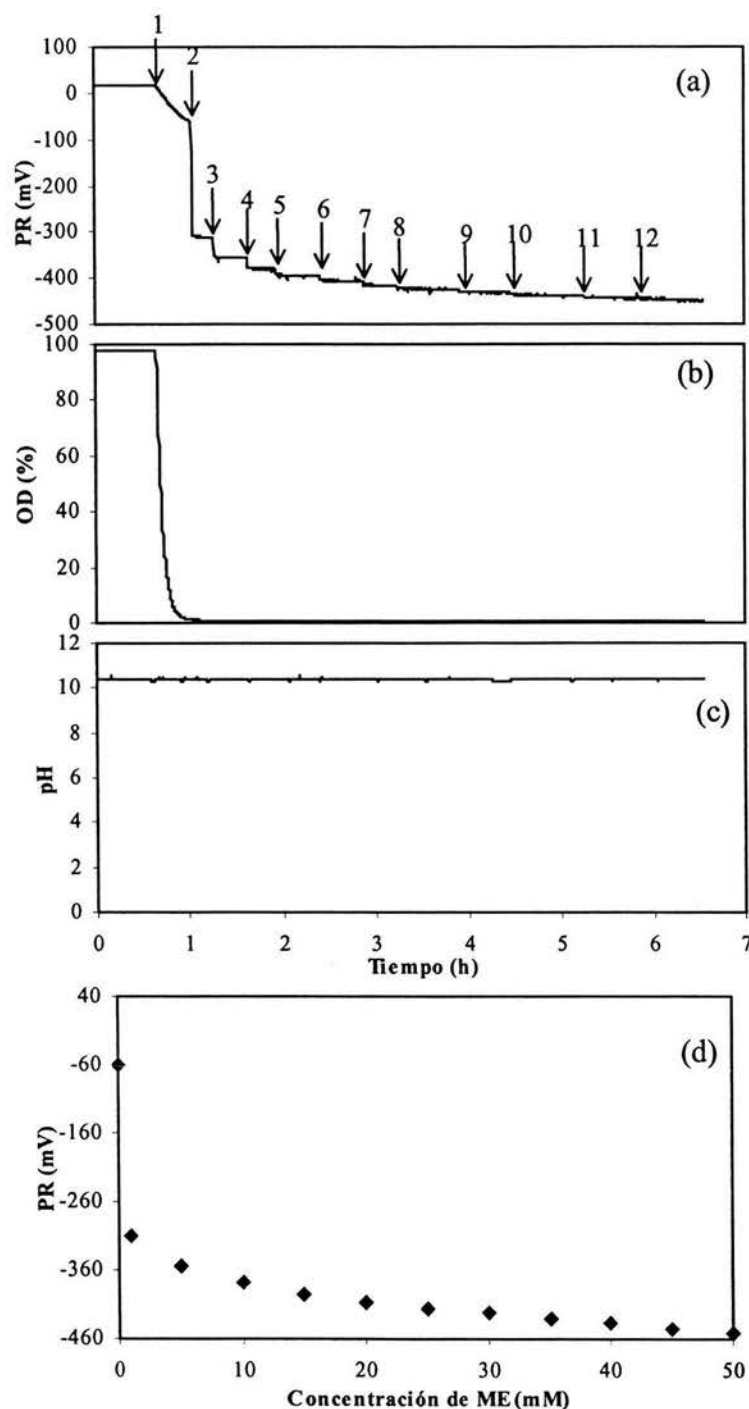


Figura C-1. Efecto del ME en el PR. (a) Perfil del PR, (b) Perfil del OD, (c) Perfil de pH (d) Dependencia del PR sobre la concentración de ME. Primero se redujo el OD hasta 1% (flecha 1), se agregó dos alícuotas de ME de 17.6 (flecha 2) y 70.4 μ L (flecha 3) y después nueve de 88 μ L a la solución de renaturalización y se registró el valor de PR (flechas 4-12).

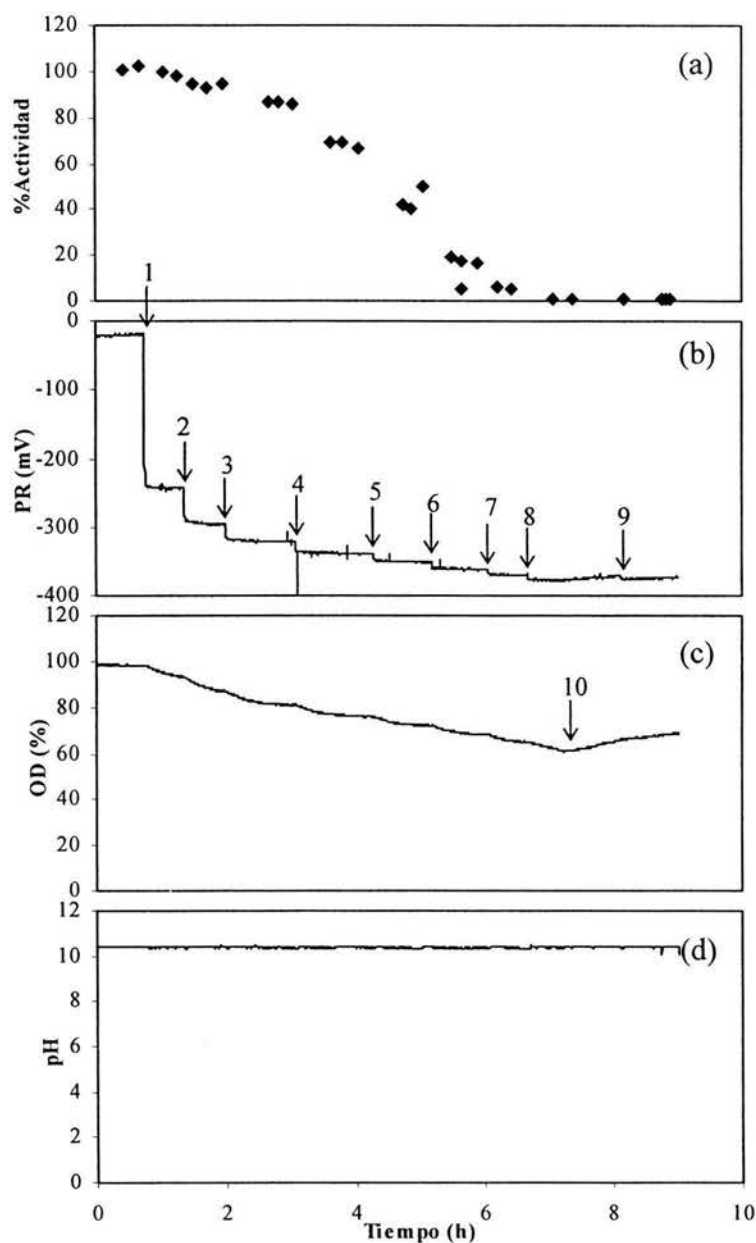


Figura C-2. Efecto del ME en la Actividad Enzimática de la FA. (a) Perfil de Actividad Enzimática, (b) Perfil del PR, (c) Perfil del OD (d). Se agregó dos alícuotas de ME de 17.6 (flecha 1) y 70.4 μL (flecha 2) y después siete de 88 μL a la solución de renaturalización con la FA y se registró el valor de PR (flechas 3-9). La actividad enzimática disminuyó totalmente cuando se agregó 616 μL de ME (flecha 8). La flecha 10 indica el momento en que el OD comienza a elevarse.

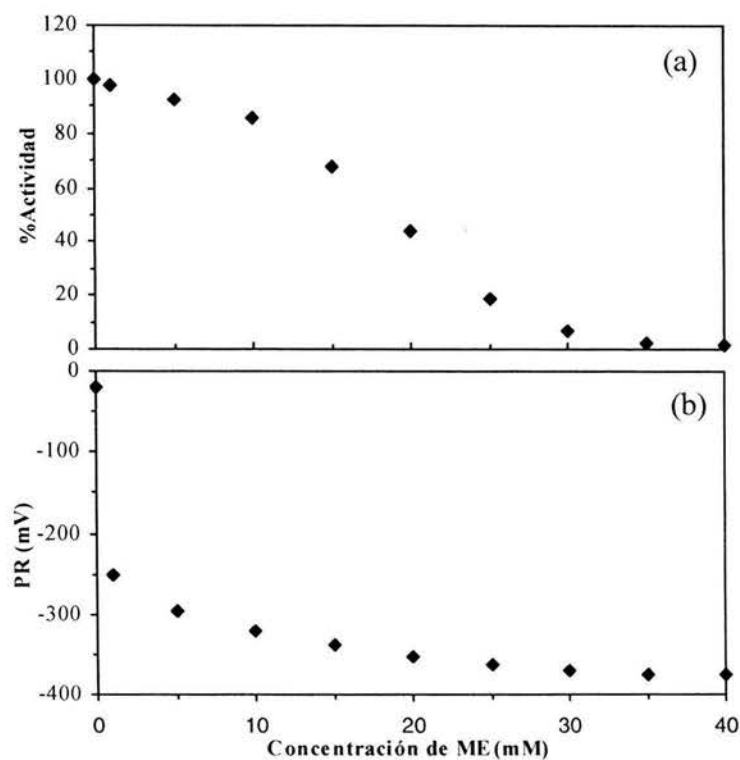


Figura C-3. Efecto del ME en (a) la Actividad Enzimática de la FA y en (b) el PR. Primero se agregó dos alícuotas de ME de 17.6 y 70.4 μL (1 y 5 mM respectivamente) y después siete de 88 μL a la solución de renaturalización y se registró el valor de PR con 100 – 67% de OD.

**APÉNDICE D. CINÉTICAS DE RENATURALIZACIÓN A OXÍGENO DISUELTO
CONSTANTE Y 10 μM DE CuSO_4 .**

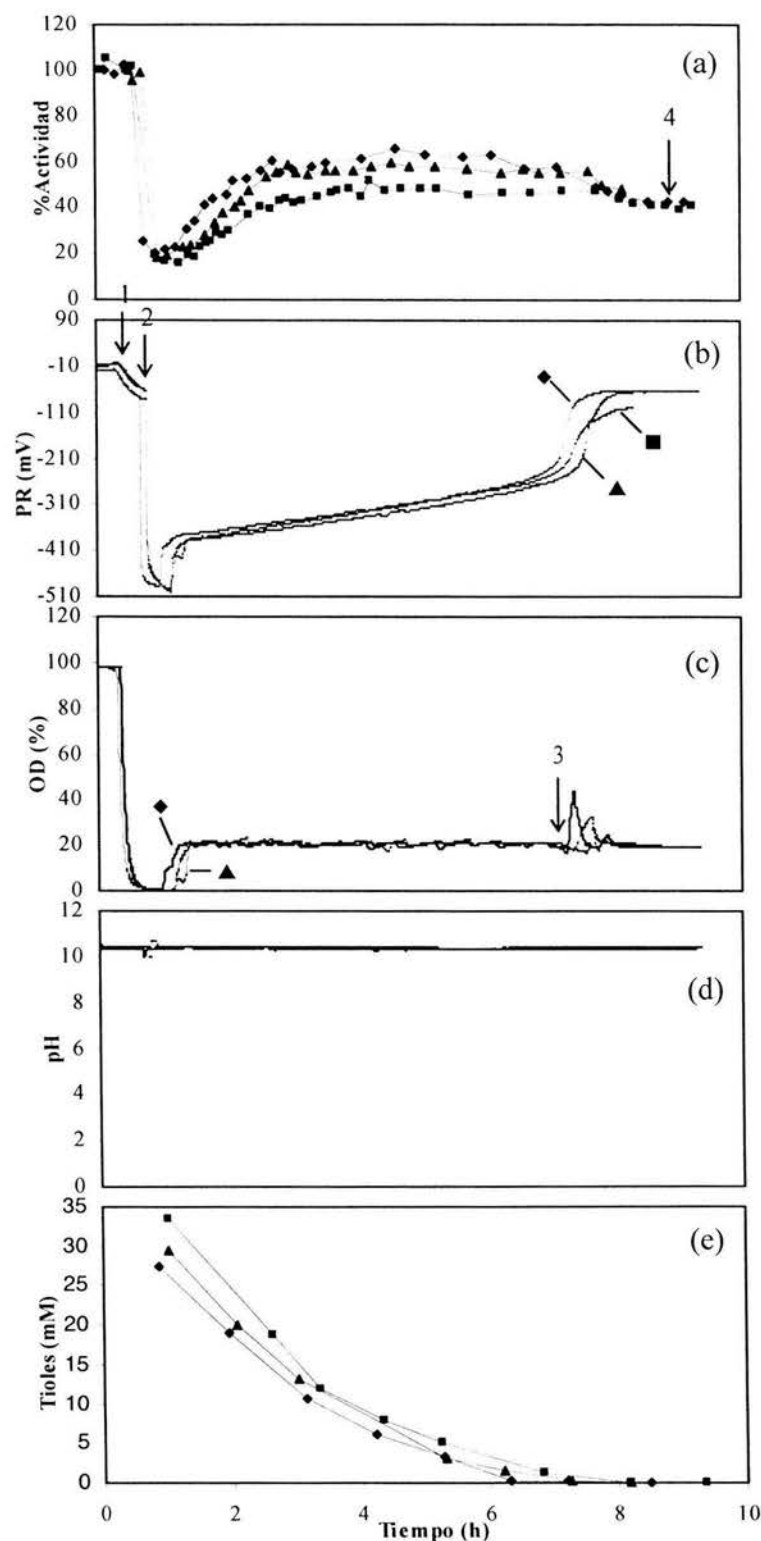


Figura D-1. Cinéticas de renaturalización de la FA en el reactor a 20% de OD con $10 \mu\text{M}$ de CuSO_4 . Primera (\blacktriangle) Segunda (\blacksquare) Tercera (\blacklozenge). Perfiles de (a) Actividad Enzimática, (b) PR (c) OD (d) pH (e) Concentración de Tioles. El PR disminuyó al desplazar el O_2 del medio (flecha 1). Se agregó una alícuota de $440 \mu\text{L}$ de ME a la solución de renaturalización con la FA (flecha 2). El consumo de oxígeno se incrementó (flecha 3) a su vez que la actividad enzimática disminuyó levemente (flecha 4) cuando el ME se oxidó totalmente.

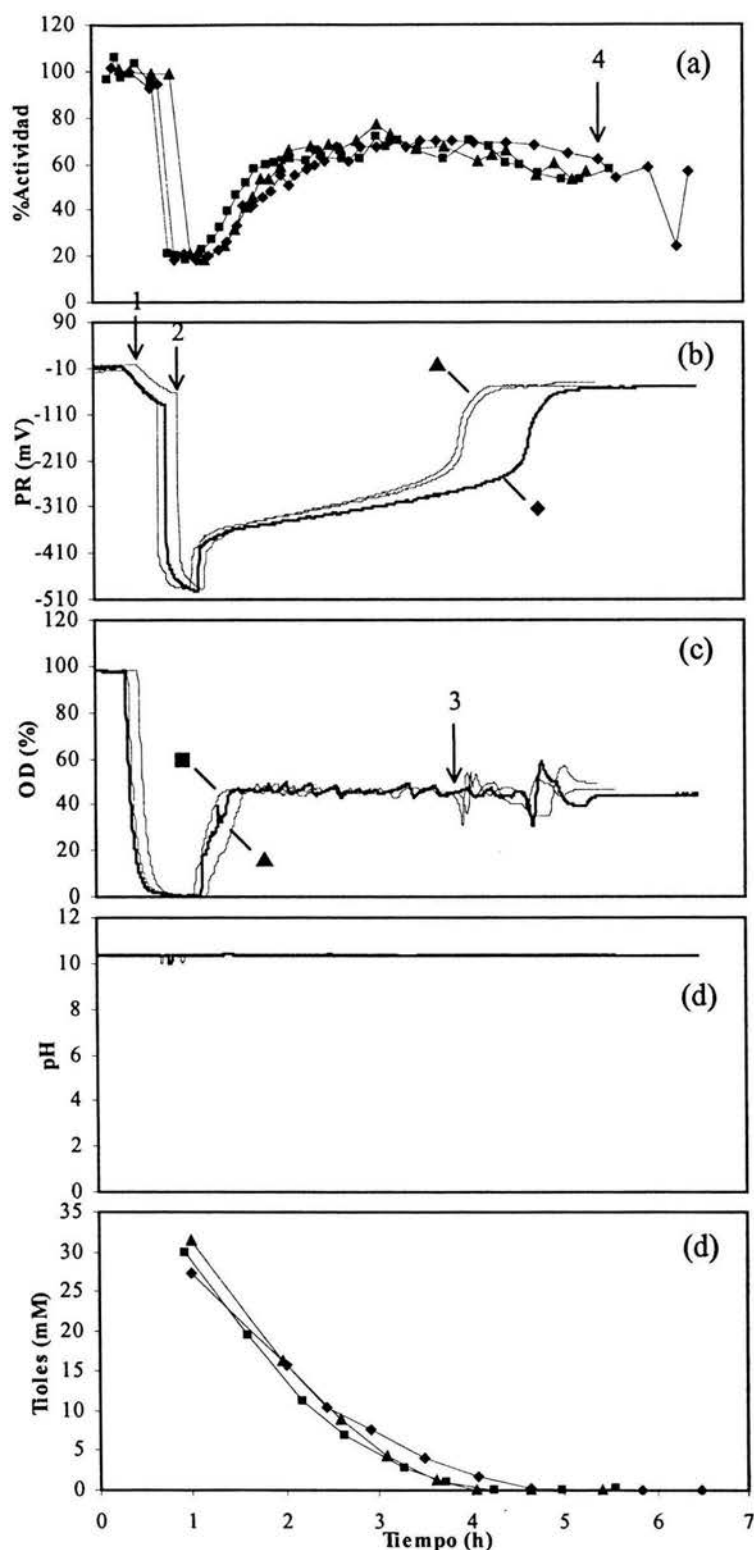


Figura D-2. Cinéticas de renaturalización de la FA en el reactor a 45% de OD con $10 \mu\text{M}$ de CuSO_4 . Primera (\blacktriangle) Segunda (\blacksquare) Tercera (\blacklozenge). Perfiles de (a) Actividad Enzimática, (b) PR (c) OD (d) pH (e) Concentración de Tioles. El PR disminuyó al desplazar el O_2 del medio (flecha 1). Se agregó una alícuota de $440 \mu\text{L}$ de ME a la solución de renaturalización con la FA (flecha 2). El consumo de oxígeno se incrementó (flecha 3) a su vez que la actividad enzimática disminuyó lentamente (flecha 4) cuando el ME se oxidó totalmente.

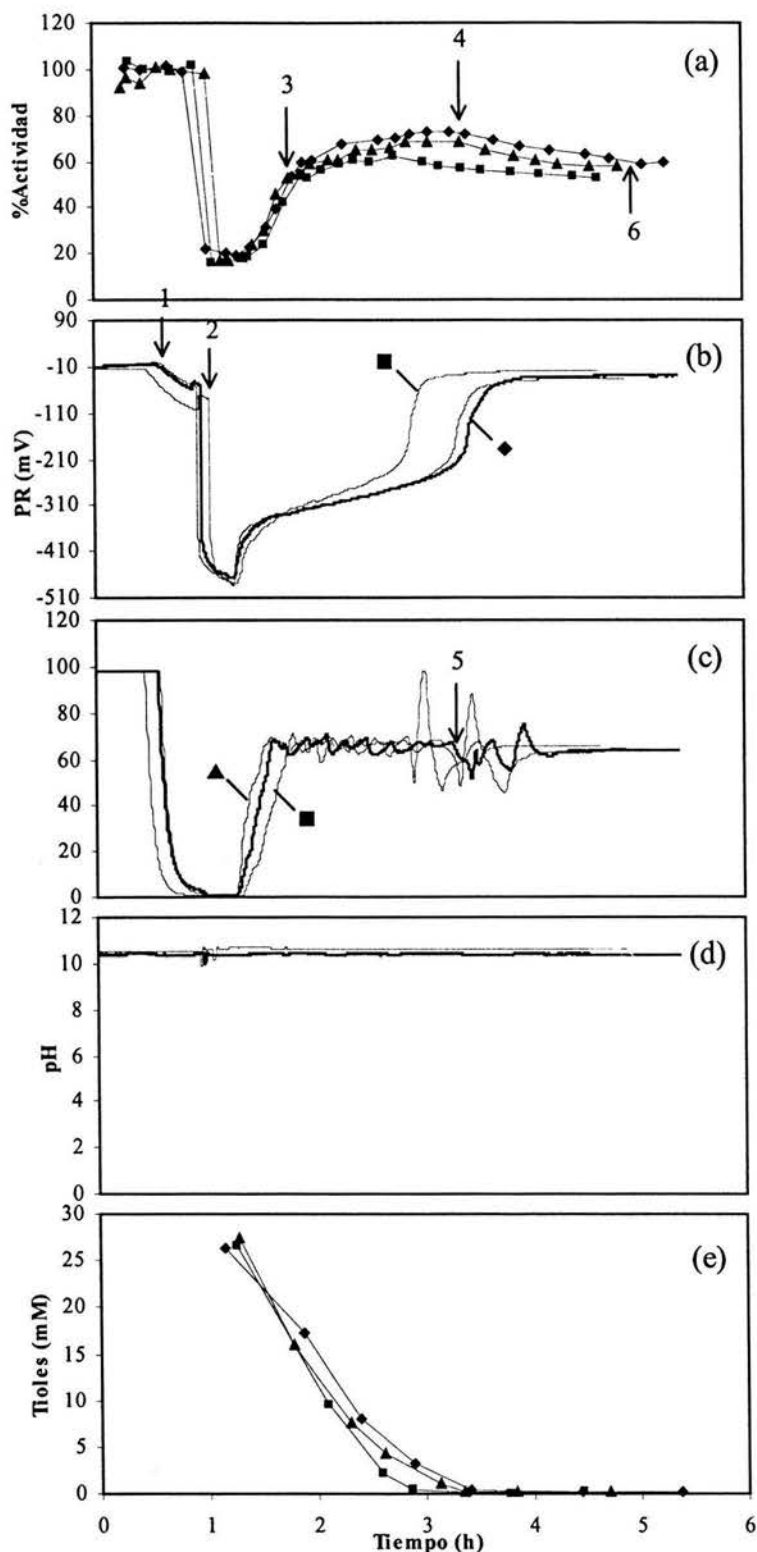


Figura D-3. Cinéticas de renaturalización de la FA en el reactor a 65% de OD con $10 \mu\text{M}$ de CuSO_4 . Primera (\blacktriangle) Segunda (\blacksquare) Tercera (\blacklozenge). Perfiles de (a) Actividad Enzimática, (b) PR (c) OD (d) pH (e) Concentración de Tioles. El PR disminuyó al desplazar el O_2 del medio (flecha 1). Se agregó una alícuota de $440 \mu\text{L}$ de ME a la solución de renaturalización con la FA (flecha 2). La FA cambió de velocidad de renaturalización (flecha 3), llegó a un máximo (flecha 4), el consumo de oxígeno se incrementó (flecha 5) a su vez que la actividad enzimática disminuyó lentamente (flecha 6) cuando el MF se oxidó totalmente

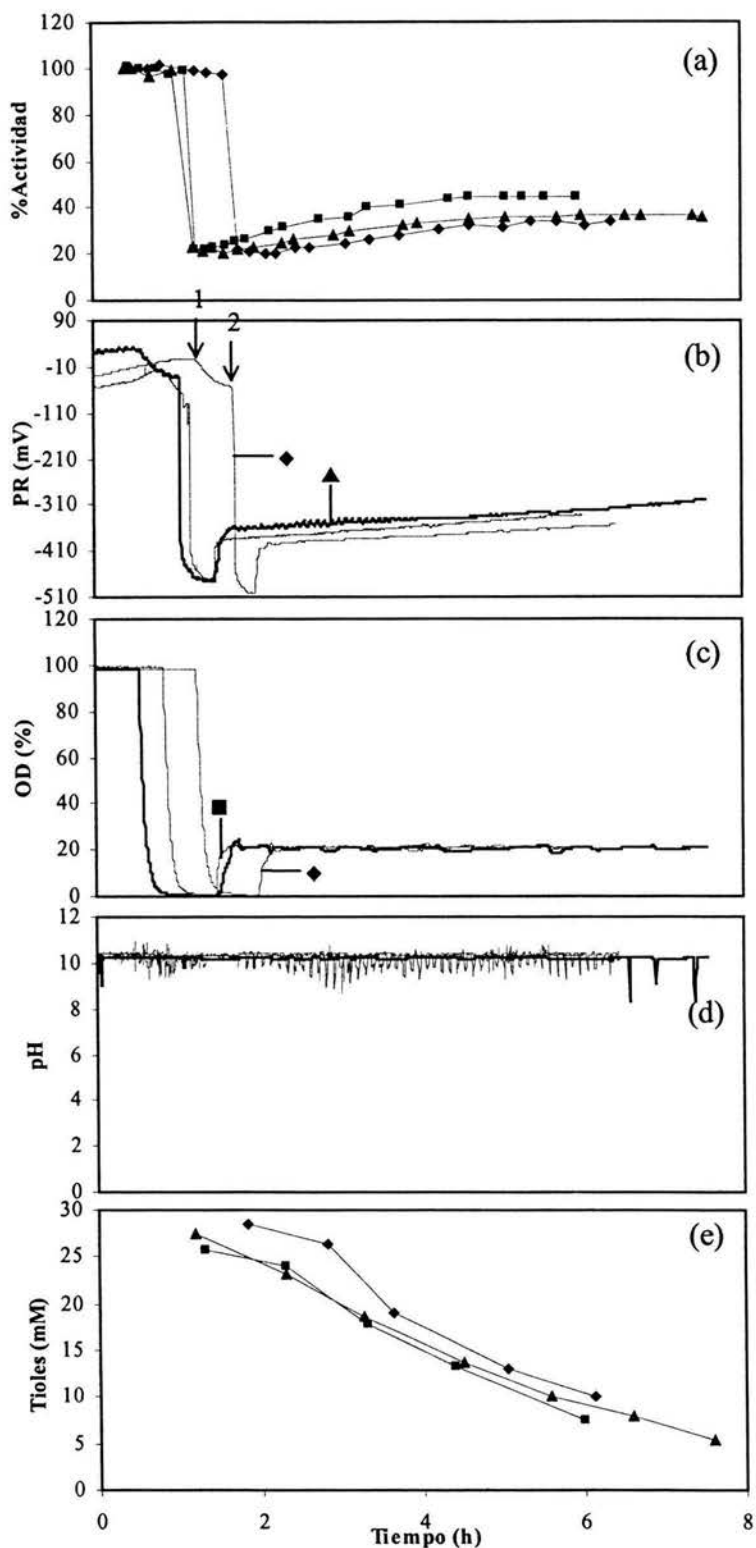
APÉNDICE E. CINÉTICAS OD CONSTANTE Y 5 μM DE CuSO_4 

Figura E-1. Cinéticas de renaturalización de la FA en el reactor a 20% de OD con 5 μM de CuSO_4 . Primera (▲) Segunda (■) Tercera (◆). Perfiles de (a) Actividad Enzimática, (b) PR (c) OD (d) pH (e) Concentración de Tioles. El PR disminuyó al desplazar el O_2 del medio (flecha 1). Se agregó una alícuota de 440 μL de ME a la solución de renaturalización con la FA (flecha 2).

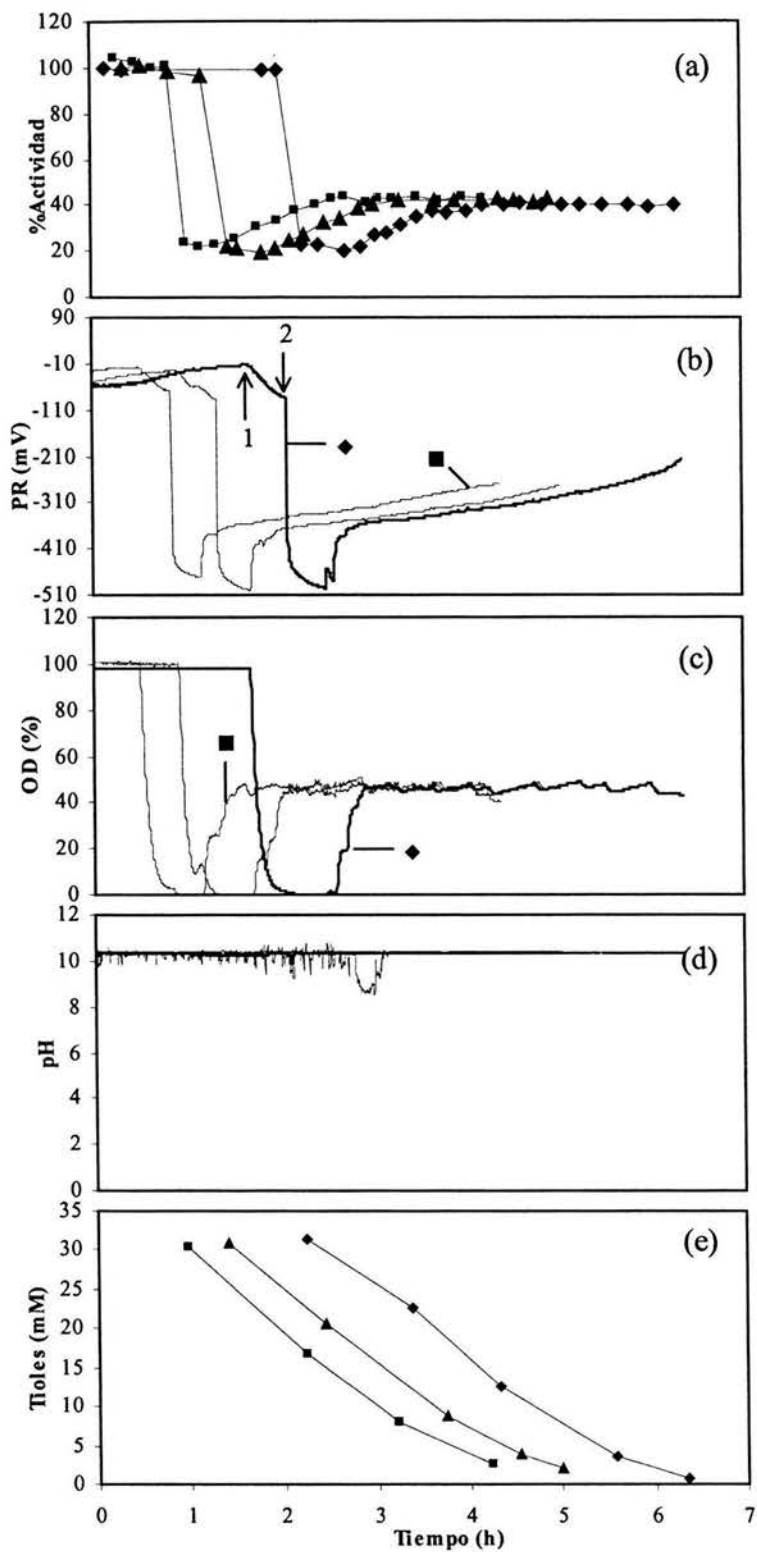


Figura E-2. Cinéticas de renaturalización de la FA en el reactor a 45% de OD con $5 \mu\text{M}$ de CuSO_4 . Primera (\blacktriangle) Segunda (\blacksquare) Tercera (\blacklozenge). Perfiles de (a) Actividad Enzimática, (b) PR (c) OD (d) pH (e) Concentración de Tioles. El PR disminuyó al desplazar el O_2 del medio (flecha 1). Se agregó una alícuota de $440 \mu\text{L}$ de ME a la solución de renaturalización con la FA (flecha 2).

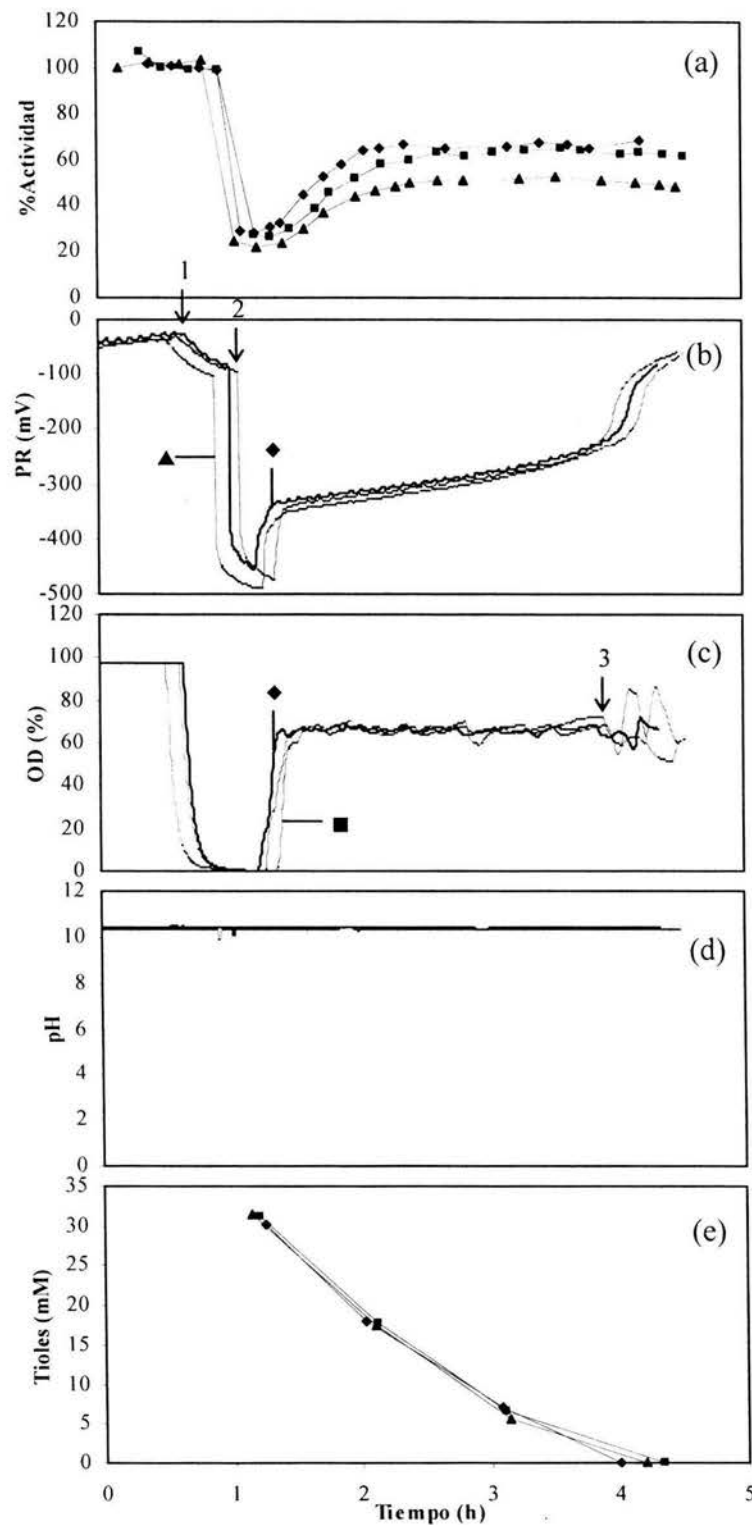
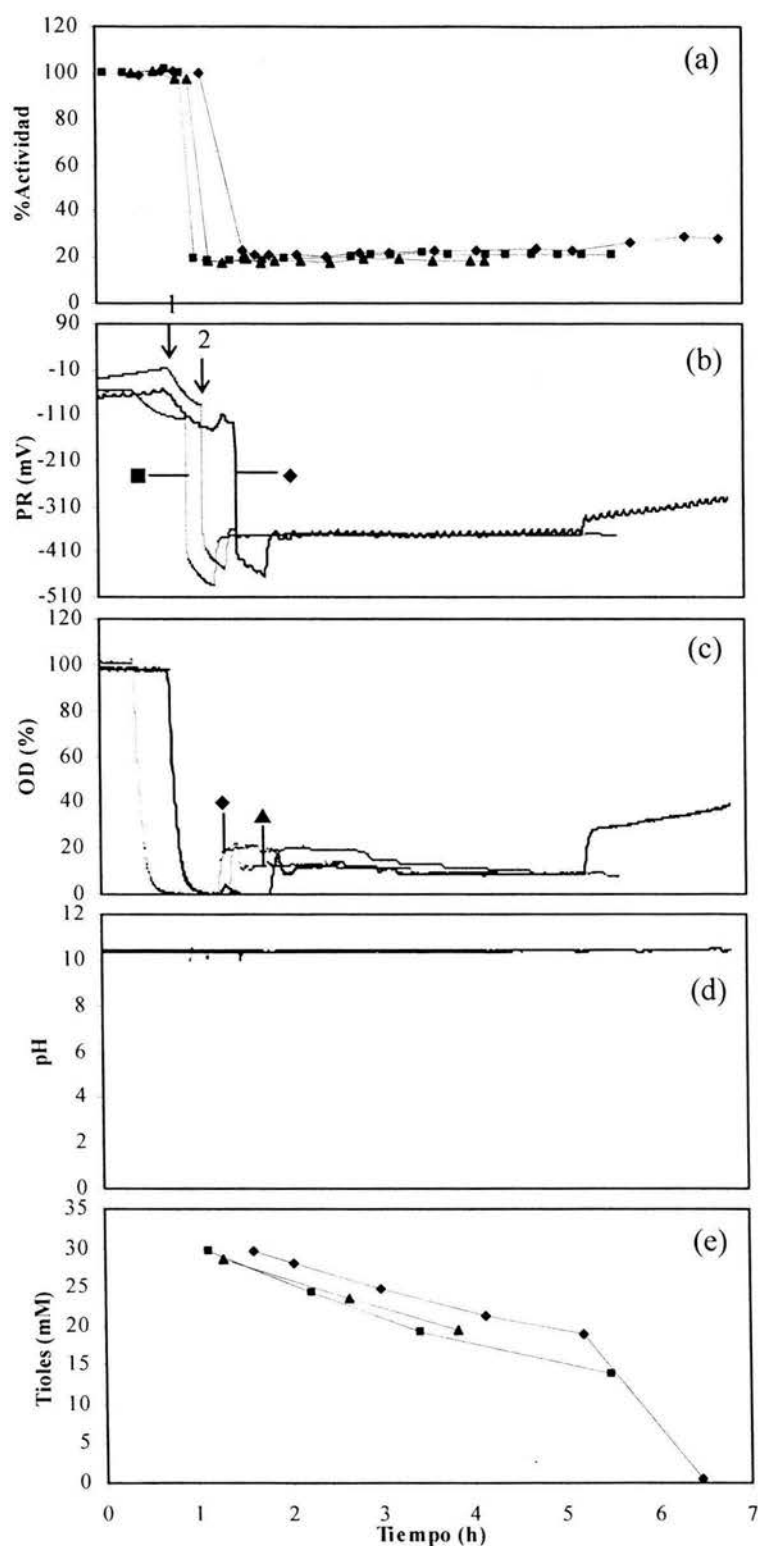


Figura E-3. Cinéticas de renaturalización de la FA en el reactor a 65% de OD con $5 \mu\text{M}$ de CuSO_4 . Primera (\blacktriangle) Segunda (\blacksquare) Tercera (\blacklozenge). Perfiles de (a) Actividad Enzimática, (b) PR (c) OD (d) pH (e) Concentración de Tioles. El PR disminuyó al desplazar el O_2 del medio (flecha 1). Se agregó una alícuota de $440 \mu\text{L}$ de ME a la solución de renaturalización con la FA (flecha 2).

APÉNDICE G. CINÉTICAS DE RENATURALIZACIÓN A POTENCIAL REDOX CONSTANTE Y 5 μM DE CuSO_4 .



ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Figura G-1. Cinéticas de renaturalización de la FA en el reactor a -370 mV con $5\ \mu\text{M}$ de CuSO_4 . Primera (\blacktriangle) Segunda (\blacksquare) Tercera (\blacklozenge). Perfiles de (a) Actividad Enzimática, (b) PR (c) OD (d) pH (e) Concentración de Tioles. El PR disminuyó al desplazar el O_2 del medio (flecha 1). Se agregó una alícuota de $440\ \mu\text{L}$ de ME a la solución de renaturalización con la FA (flecha 2).

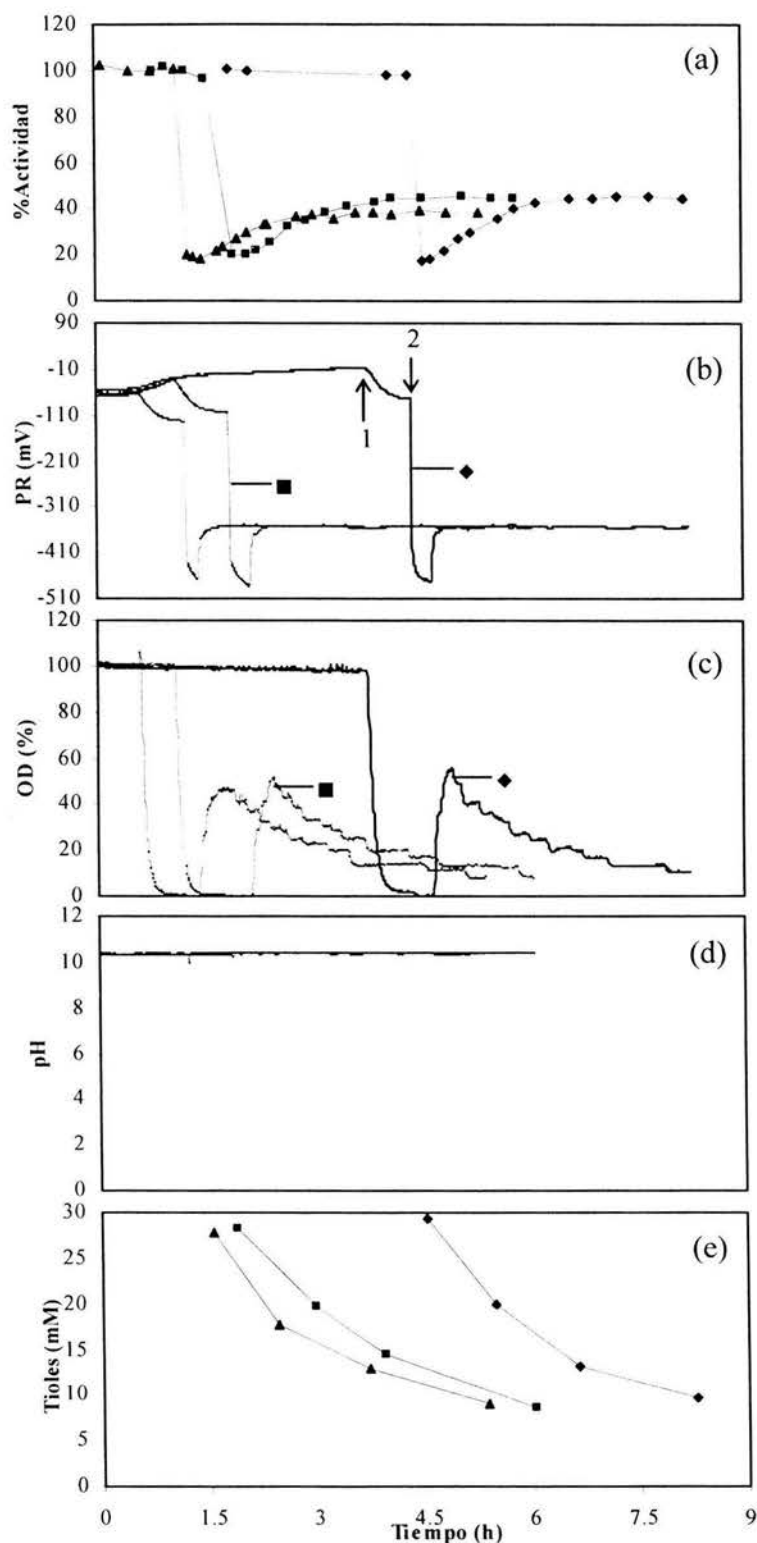


Figura G-2. Cinéticas de renaturalización de la FA en el reactor a -355 mV con $5\ \mu\text{M}$ de CuSO_4 . Primera (\blacktriangle) Segunda (\blacksquare) Tercera (\blacklozenge). Perfiles de (a) Actividad Enzimática, (b) PR (c) OD (d) pH (e) Concentración de Tioles. El PR disminuyó al desplazar el O_2 del medio (flecha 1). Se agregó una alícuota de $440\ \mu\text{L}$ de ME a la solución de renaturalización con la FA (flecha 2).

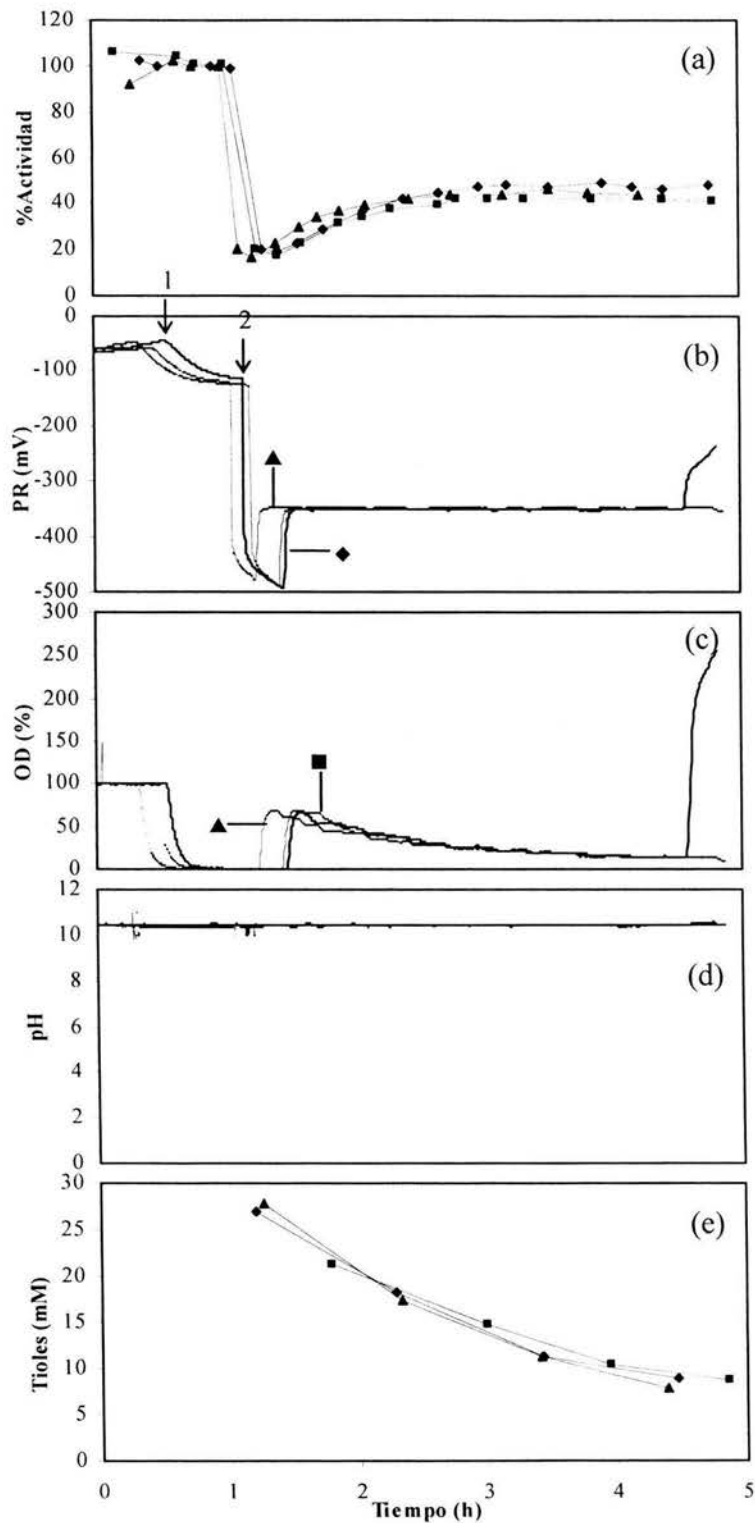


Figura G-3. Cinéticas de renaturalización de la FA en el reactor a -350 mV con $5\ \mu\text{M}$ de CuSO_4 . Primera (▲) Segunda (■) Tercera (◆). Perfiles de (a) Actividad Enzimática, (b) PR (c) OD (d) pH (e) Concentración de Tioles. El PR disminuyó al desplazar el O_2 del medio (flecha 1). Se agregó una alícuota de $440\ \mu\text{L}$ de ME a la solución de renaturalización con la FA (flecha 2).

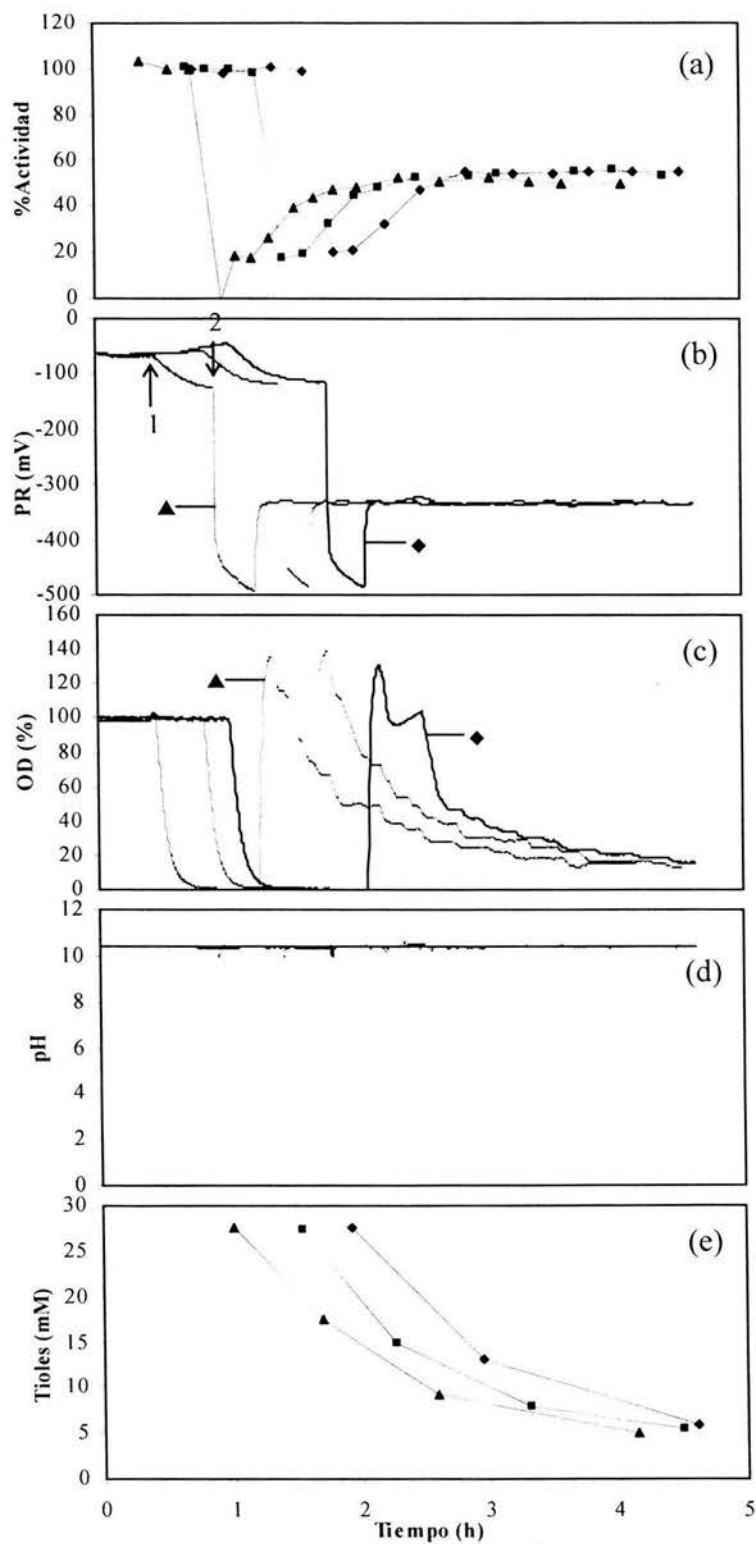


Figura G-4. Cinéticas de renaturalización de la FA en el reactor a -330 mV con $5\ \mu\text{M}$ de CuSO_4 . Primera (▲) Segunda (■) Tercera (◆). Perfiles de (a) Actividad Enzimática, (b) PR (c) OD (d) pH (e) Concentración de Tioles. El PR disminuyó al desplazar el O_2 del medio (flecha 1). Se agregó una alícuota de $440\ \mu\text{L}$ de ME a la solución de renaturalización con la FA (flecha 2).

APÉNDICE H. EFECTO DE LA SOLDADURA.

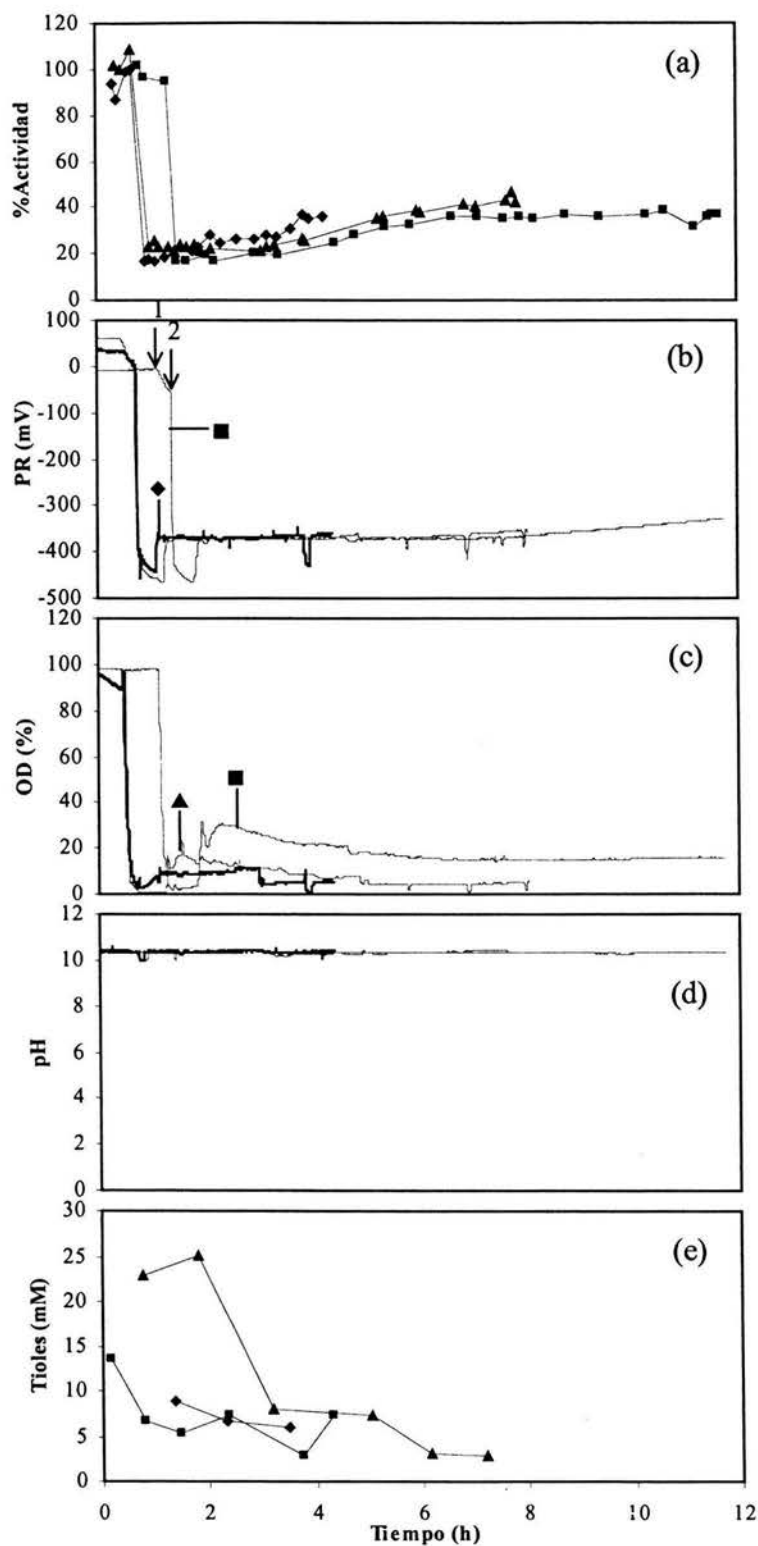


Figura H-1. Cinéticas de renaturalización de la FA en el reactor a -370 mV con soldadura. Primera (▲) Segunda (■) Tercera (◆). Perfiles de (a) Actividad Enzimática, (b) PR (c) OD (d) pH (e) Concentración de Tioles. El PR disminuyó al desplazar el O_2 del medio (flecha 1). Se agregó una alícuota de $440 \mu\text{L}$ de ME a la solución de renaturalización con la FA (flecha 2).

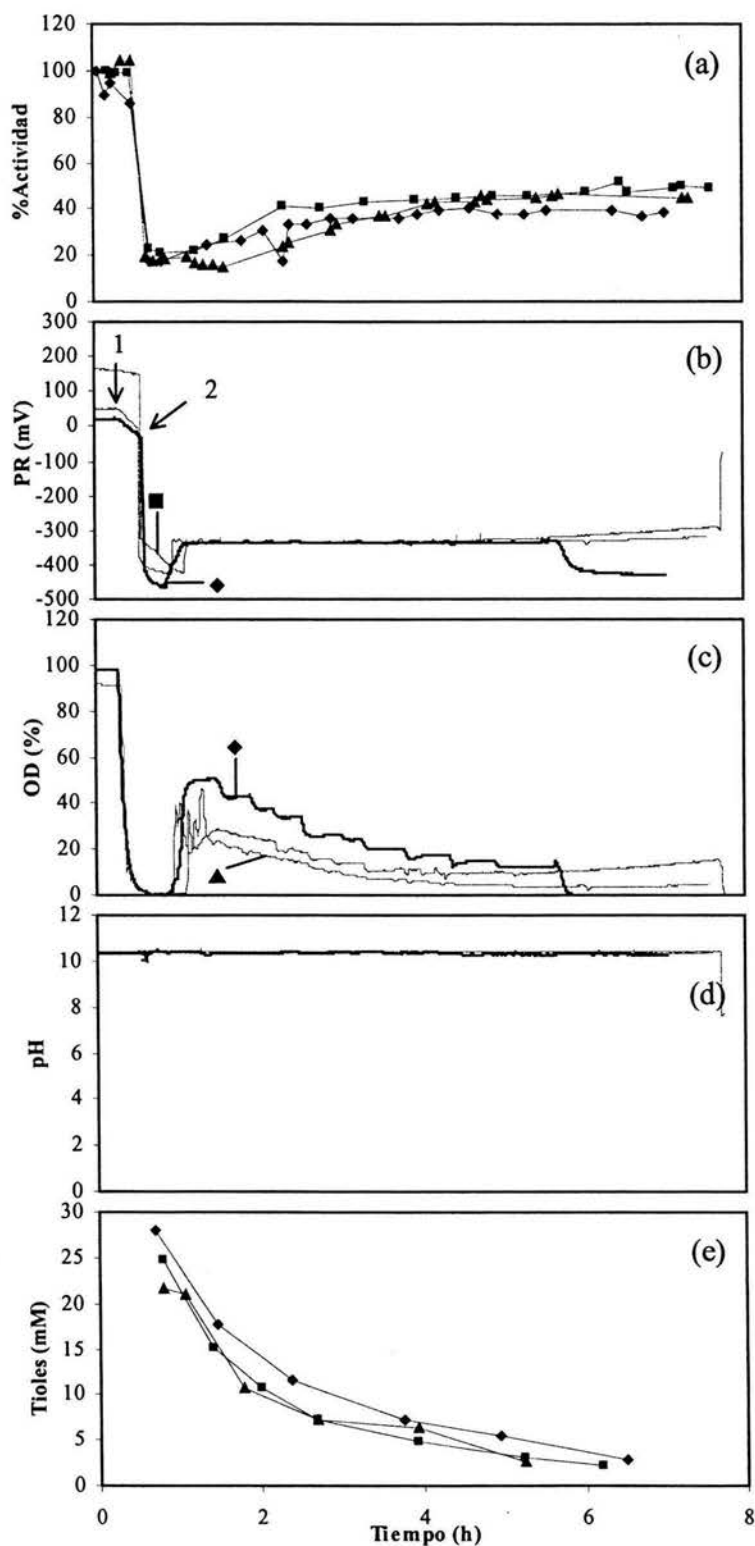


Figura H-2. Cinéticas de renaturalización de la FA en el reactor a -370 mV con soldadura. Primera (▲) Segunda (■) Tercera (◆). Perfiles de (a) Actividad Enzimática, (b) PR (c) OD (d) pH (e) Concentración de Tioles. El PR disminuyó al desplazar el O_2 del medio (flecha 1). Se agregó una alícuota de $440 \mu\text{L}$ de ME a la solución de renaturalización con la FA (flecha 2).

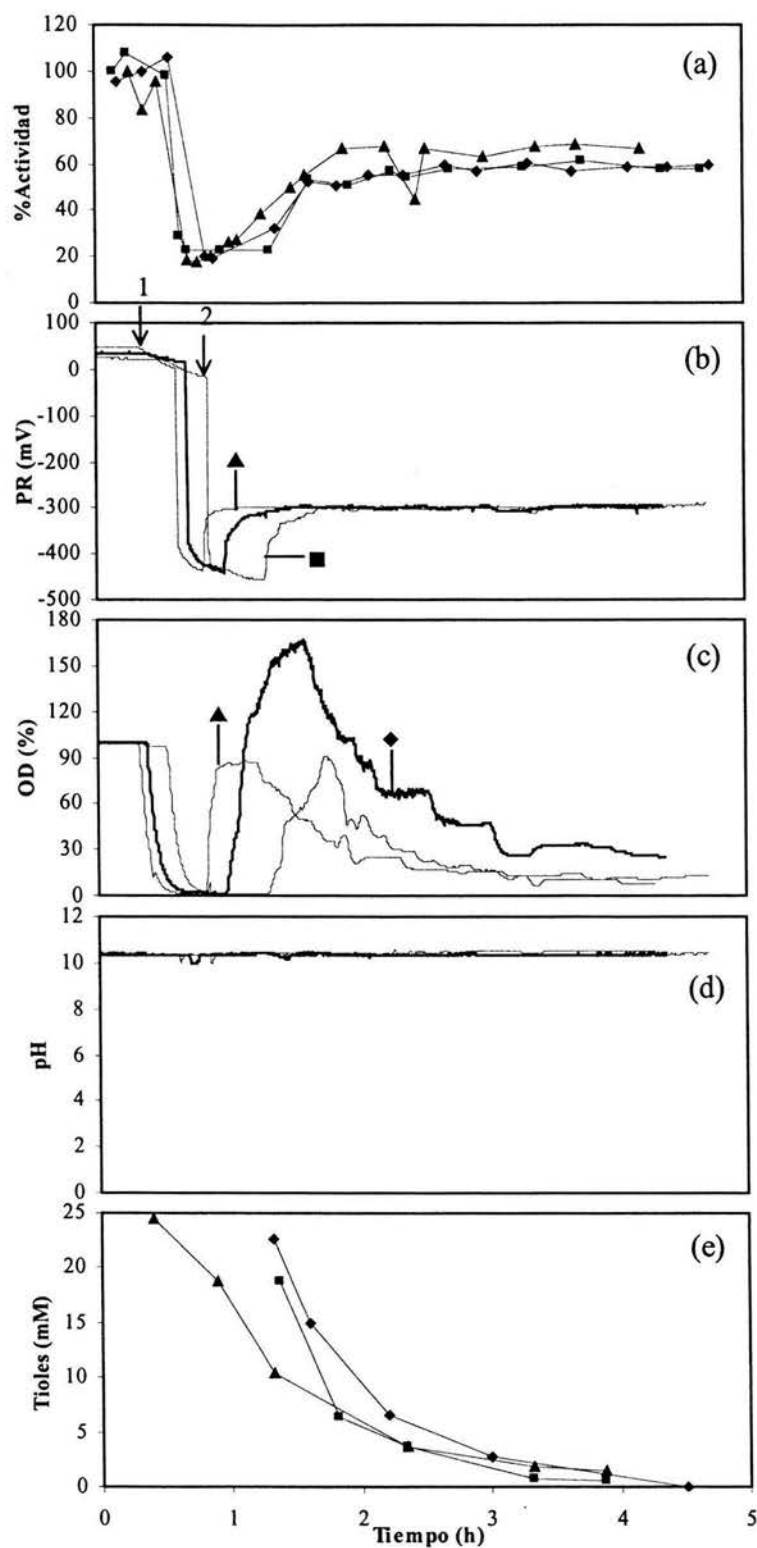


Figura H-3. Cinéticas de renaturalización de la FA en el reactor a -300 mV con soldadura. Primera (▲) Segunda (■) Tercera (◆). Perfiles de (a) Actividad Enzimática, (b) PR (c) OD (d) pH (e) Concentración de Tioles. El PR disminuyó al desplazar el O_2 del medio (flecha 1). Se agregó una alícuota de $440 \mu\text{L}$ de ME a la solución de renaturalización con la FA (flecha 2).

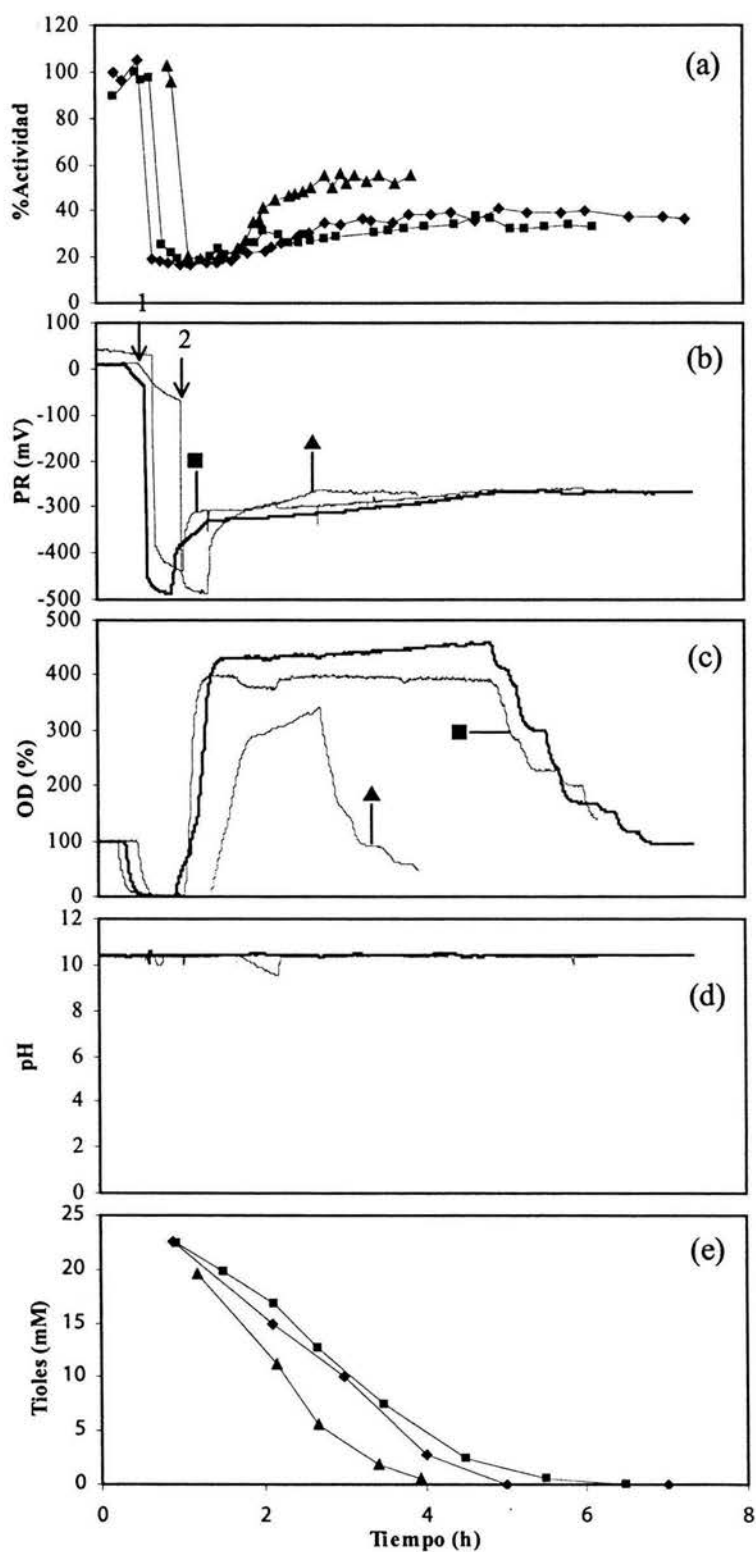


Figura H-4. Cinéticas de renaturalización de la FA en el reactor a -300 mV con soldadura. Primera (▲) Segunda (■) Tercera (◆). Perfiles de (a) Actividad Enzimática, (b) PR (c) OD (d) pH (e) Concentración de Tioles. El PR disminuyó al desplazar el O_2 del medio (flecha 1). Se agregó una alícuota de $440\ \mu\text{L}$ de ME a la solución de renaturalización con la FA (flecha 2).

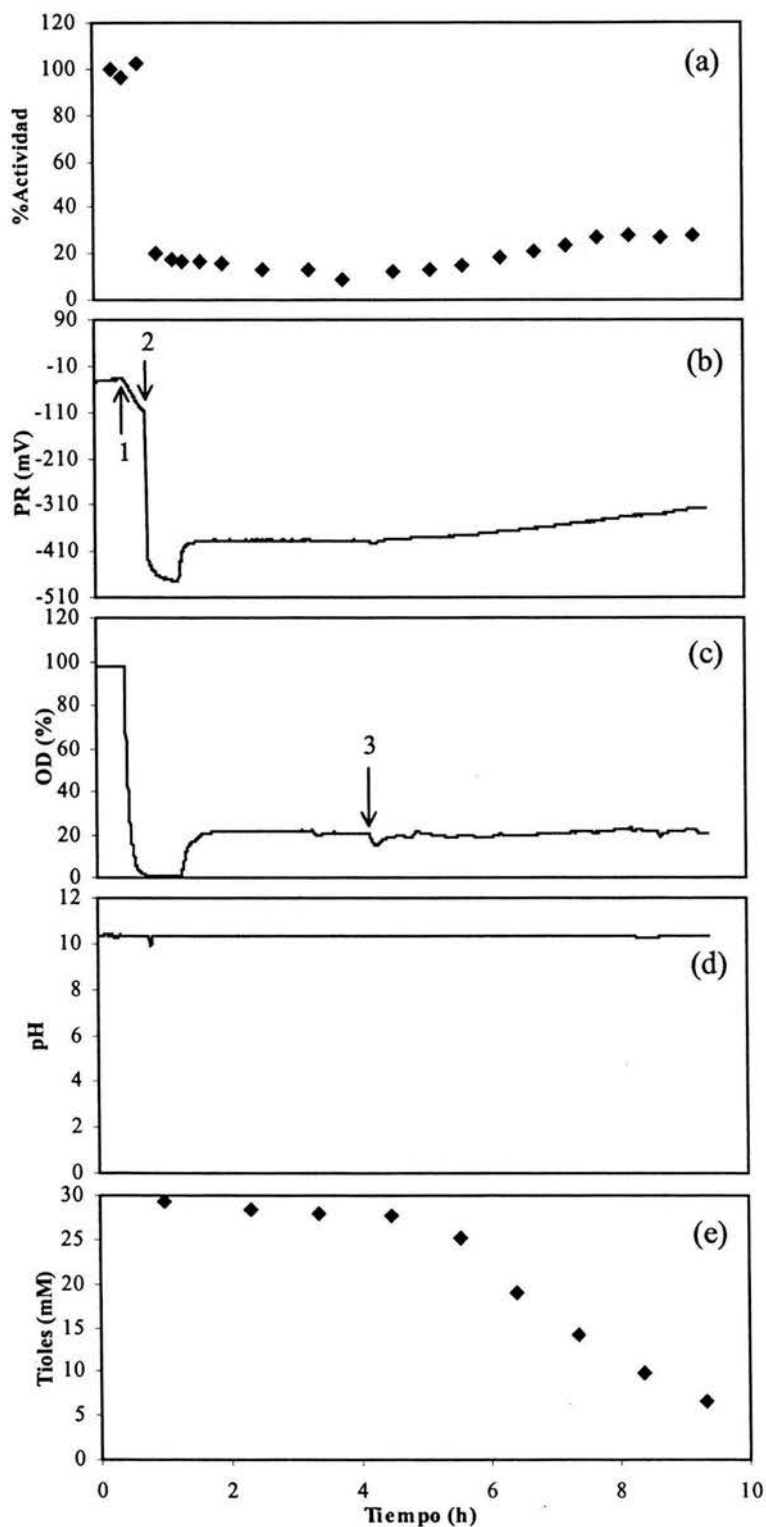


Figura H-5. Cinética de renaturalización de la FA en el reactor a 20% de OD. Perfiles de (a) Actividad Enzimática, (b) PR (c) OD (d) pH (e) Concentración de Tioles. El PR disminuyó al desplazar el O₂ del medio (flecha 1). Se agregó una alícuota de 440 μ L de ME a la solución de renaturalización con la FA (flecha 2). Se introdujo el termopozo que tenía la soldadura (flecha 3).

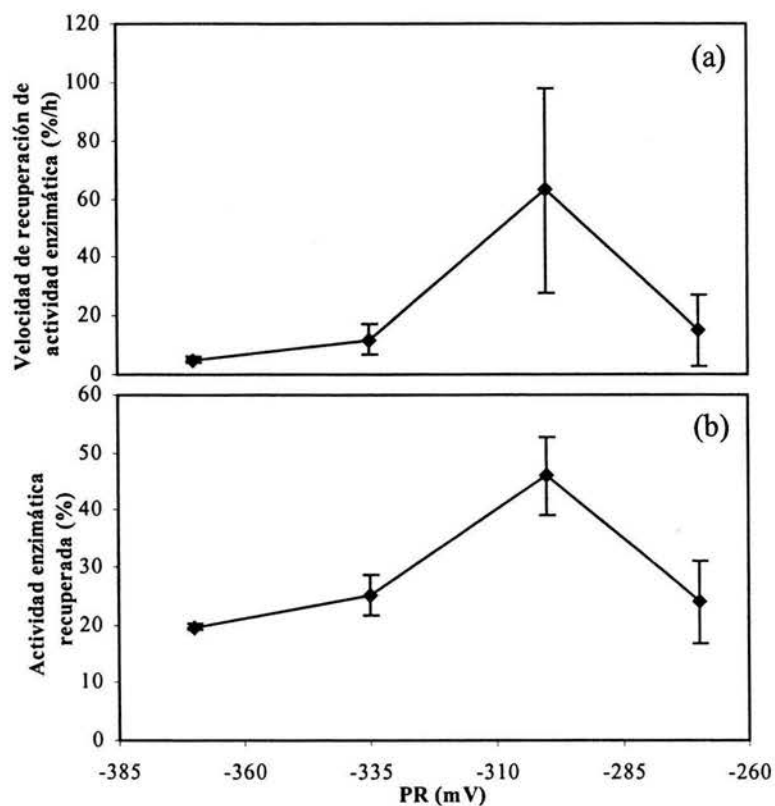


Figura H-6. (a) Dependencia de la velocidad de recuperación de la Actividad Enzimática sobre el potencial redox (b) Dependencia de la Actividad Enzimática recuperada sobre el potencial redox.

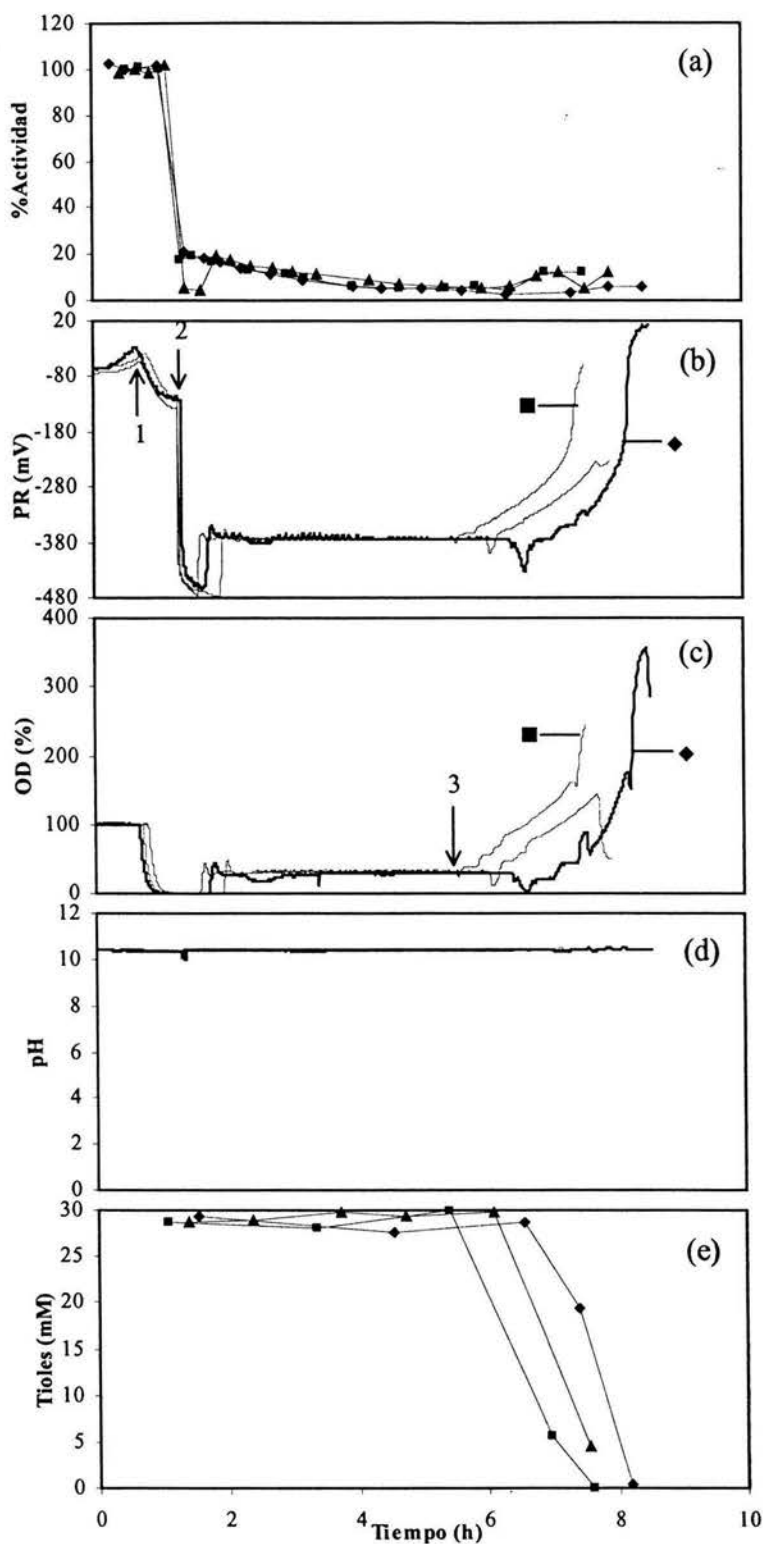
APÉNDICE I. CINÉTICAS SIN CuSO_4 

Figura I-1. Cinéticas de desnaturalización de la FA en el reactor a 30% de OD sin CuSO_4 . Primera (\blacktriangle) Segunda (\blacksquare) Tercera (\blacklozenge). Perfiles de (a) Actividad Enzimática, (b) PR (c) OD (d) pH (e) Concentración de Tioles. El PR disminuyó al desplazar el O_2 del medio (flecha 1). Se agregó una alícuota de 440 μL de ME a la solución de renaturalización con la FA (flecha 2). Se agregó 25 μL de CuSO_4 100 mM (flecha 3).

APÉNDICE K. RELACIÓN ENTRE AGENTE OXIDANTE Y REDUCTOR

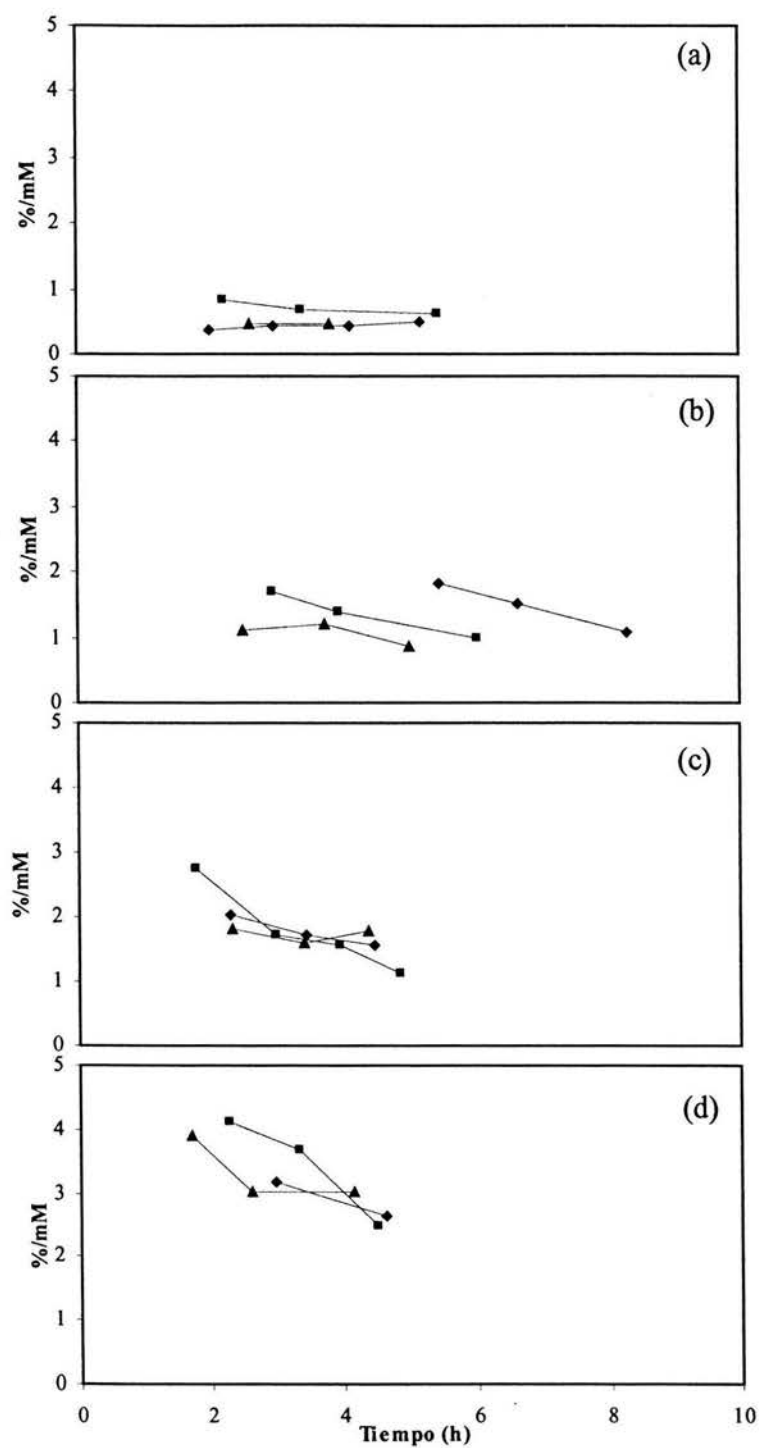


Figura K-1. Relación entre el OD (%) que es el agente oxidante y el ME (mM) que es el agente reductor cuando se controló a. (a) -370 mV (b) -345 mV, (c) -350 mV y (d) -330 mV. Se realizó tres cinéticas para cada valor: primera (▲), segunda (■) y tercera (◆).

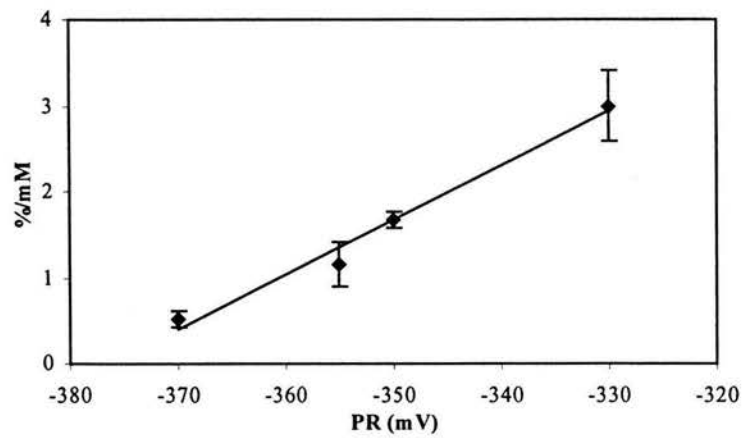


Figura K-2. Dependencia de la relación OD-ME en el PR. La gráfica muestra una relación lineal. Se promedió los dos últimos puntos de cada gráfica de la figura K-1.