

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Dpto. de QUÍMICA ORGÁNICA Y FARMACÉUTICA



***" α -QUIMOTRIPSINA INMOVILIZADA COMO
CATALIZADOR EN LA SÍNTESIS DE DIPÉPTIDOS"***

TESIS DOCTORAL

CARLOS TORRES FECED

Madrid, Enero de 1997

1957

El Dr. José Vicente Sinisterra Gago, Catedrático de Química Orgánica y Farmacéutica y el Dr. Andrés R. Alcántara León, Profesor Titular de Química Orgánica y Farmacéutica del Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid

CERTIFICAN:

que la presente Memoria titulada:

" α -QUIMOTRIPSINA INMOVILIZADA COMO CATALIZADOR EN LA SÍNTESIS DE DIPÉPTIDOS"

que presenta D. Carlos Torres Feced para optar al grado de Doctor en Farmacia, ha sido realizada bajo su dirección y reúne las condiciones necesarias para ser juzgada por el tribunal correspondiente, autorizando así su presentación.

Para que conste donde proceda firman el presente certificado en Madrid, 30 de Enero de 1997.

Fdo: Dr. José Vicente Sinisterra Gago

Fdo:Dr. Andrés R. Alcántara León



CIUDAD UNIVERSITARIA
28040 MADRID
TEL.: 394 18 23
FAX: 394 18 22

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA Y FARMACÉUTICA

D. JOSÉ VICENTE SINISTERRA GAGO, CATEDRÁTICO Y DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA Y FARMACÉUTICA DE LA FACULTAD DE FARMACIA EN LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

CERTIFICA: que **D. CARLOS TORRES FECED** ha realizado en los laboratorios de este Departamento, bajo la dirección del Dr. José V. Sinisterra Gago y del Dr. Andrés R. Alcántara León, el presente trabajo de Tesis Doctoral para optar al grado de Doctor en Farmacia, con el título:

***" α -QUIMOTRIPSINA INMOVILIZADA
COMO CATALIZADOR EN LA SÍNTESIS DE
DIPÉPTIDOS"***

Y para que conste donde proceda, a petición del interesado, firmo el presente en Madrid, a veintinueve de Enero de mil novecientos noventa y siete.



Memoria presentada para optar
al grado de Doctor en Farmacia por:
CARLOS TORRES FECED

***" α -QUIMOTRIPSINA INMOVILIZADA COMO
CATALIZADOR EN LA SÍNTESIS DE DIPÉPTIDOS"***

Directores: **Dr. José Vicente Sinisterra Gago**
Dr. Andrés R. Alcántara León

Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica
Facultad de Farmacia
Universidad Complutense de Madrid

Madrid, Enero de 1997

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento:

A D. Andrés R. Alcántara León, por su magistral dirección, por las enseñanzas de él recibidas, y por los buenos momentos que hemos compartido durante la realización de este trabajo.

A D. José Vicente Sinisterra Gago, por su dirección, y por el interés prestado en todo momento.

A Chema, Miki, Pepa y Mayda, con los que he compartido muy buenos momentos, trabajando codo con codo durante estos años y de los que guardo un entrañable recuerdo.

A Nieves Cabezas por su confianza y amistad.

A Mercedes Villacampa y al futuro Dr. José M^a Pérez, con los que he disfrutado de experiencias muy agradables fuera del departamento.

A Chami, Sonia, Isabel e Isidoro con los que pasado el último período de este trabajo disfrutando de su amistad.

A Antonio, Juancho y Ana por los ratos pasados juntos y por su pequeña contribución a este trabajo, y al resto de compañeros que han pasado o aún están en los laboratorios 1, 2 y 3.

A Angel Rumbero y Carmen del Campo por sus consejos y colaboración en la finalización de este trabajo.

A la profesora Elena de la Cuesta por despertar mi interés por el apasionante mundo de la Química Orgánica

Al resto de los componentes de este departamento, por hacer de éste un agradable lugar de trabajo.

A la Comunidad de Madrid, por su aportación económica en forma de beca de *Formación de Personal Investigador*.

A D. Javier Burguillo, por su interés y colaboración en la realización de las fotografías de microscopía electrónica.

A D. J. M. Guisán y a su grupo de trabajo por los derivados inmovilizados sobre agarosa indispensables para llevar a cabo la presente Memoria.

A D^a. M^a Helena Gil, por su disposición y ayuda prestada, suministrando los copolímeros requeridos para obtener los derivados objeto de estudio.

A mi familia y más concretamente a mis padres por la ayuda y comprensión prestada, sin la cual este trabajo no se hubiera podido realizar.

*A mi tía
Angelina y abuelos*

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN

<u>I.1.- ENZIMAS: ASPECTOS GENERALES</u>	1
<u>I.1.1.- ESTRUCTURA, CLASIFICACIÓN Y NOMENCLATURA</u>	1
<u>I.1.2.- CATÁLISIS ENZIMÁTICA Y SU APLICACIÓN EN PROCESOS BIOCATALIZADOS</u>	5
<u>I.2.- PROTEASAS: CONCEPTO Y CLASIFICACIÓN</u>	8
<u>I.3.- α-QUIMOTRIPSINA</u>	10
<u>I.3.1.- ESTRUCTURA Y OBTENCIÓN</u>	10
<u>I.3.2.- ESTRUCTURA DEL CENTRO ACTIVO</u>	18
<u>I.3.3.- REACCIONES DE HIDRÓLISIS</u>	25
<u>I.3.4.- SELECTIVIDAD DE LA α-QUIMOTRIPSINA</u>	31
<u>I.4.- SÍNTESIS DE PÉPTIDOS CATALIZADA POR ENZIMAS</u>	37
<u>I.4.1.- PROTEASAS EN LA SÍNTESIS DE PÉPTIDOS: PERSPECTIVAS Y LIMITACIONES</u>	37
<u>I.4.2.- MECANISMOS DE SÍNTESIS DE PÉPTIDOS</u>	44
<u>I.4.3.- FACTORES QUE INFLUYEN EN EL RENDIMIENTO DE LA SÍNTESIS DE UN ENLACE PEPTÍDICO</u>	51
<u>I.4.4.- ASPECTOS EXPERIMENTALES DE LA SÍNTESIS DE PÉPTIDOS CATALIZADA POR ENZIMAS</u>	65
<u>II.- OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO</u>	71
<u>II.1.- PLAN DE TRABAJO</u>	71
<u>III.- PARTE EXPERIMENTAL</u>	72
<u>III.1.- ENZIMAS, SUSTRATOS Y REACTIVOS</u>	72
<u>III.1.1.- ENZIMAS</u>	72
<u>III.1.2.- SUSTRATOS</u>	72
<u>III.1.3.- DISOLVENTES</u>	72

<u>III.1.4.- OTROS REACTIVOS</u>	74
<u>III.1.5.- APARATAJE EMPLEADO</u>	75
<u>III.1.6.- PROGRAMAS INFORMÁTICOS</u>	75
<u>III.2.- CARACTERIZACIÓN DEL PREPARADO COMERCIAL</u>	78
<u>III.2.1.- DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO PROTEICO</u> <u>DE LA α-QUIMOTRIPSINA COMERCIAL</u>	78
<u>III.2.2.- MEDIDA DE LA ACTIVIDAD DE LA</u> <u>α-QUIMOTRIPSINA NATIVA</u>	81
<u>III.3.- SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS DERIVADOS</u> <u>DE α-QUIMOTRIPSINA INMOVILIZADA SOBRE COPOLÍMEROS</u> <u>DE INJERTO (PE/HEMA)</u>	84
<u>III.3.1.- PREPARACIÓN DEL SOPORTE (PE/HEMA)</u>	84
<u>III.3.2.- INMOVILIZACIÓN COVALENTE DE LA α-QUIMOTRIPSINA</u> <u>SOBRE COPOLÍMEROS DE INJERTO (PE/HEMA)</u>	88
<u>III.3.3.- DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA</u> <u>DE LOS DERIVADOS INMOVILIZADOS</u>	91
<u>III.4.- DERIVADOS INMOVILIZADOS SOBRE</u> <u>GELES DE AGAROSA</u>	91
<u>III.4.1.- ACTIVACIÓN DEL SOPORTE</u>	91
<u>III.4.2.- INMOVILIZACIÓN DE LA ENZIMA</u>	93
<u>III.5.- SÍNTESIS PEPTÍDICA CATALIZADA POR α-QUIMOTRIPSINA</u> <u>INMOVILIZADA EN MEDIOS ORGÁNICO-ACUOSOS</u>	93
<u>III.6.- ENSAYOS CON DERIVADOS DE α-QUIMOTRIPSINA</u> <u>INMOVILIZADA SOBRE COPOLÍMEROS DE INJERTO (PE/HEMA)</u> ..	96
<u>III.6.1.- ENSAYOS DE ESTABILIDAD ENZIMÁTICA</u>	96
<u>III.6.2.- ENSAYOS DE ABRASIÓN</u>	103
<u>III.6.3.- HIDRÓLISIS DE BTEE</u>	104
<u>III.6.4.- REACCIONES DE SÍNTESIS DE PÉPTIDOS</u> <u>CINÉTICAMENTE CONTROLADAS</u>	105
<u>III.6.5.- SÍNTESIS DE PÉPTIDOS TERMODINÁMICAMENTE</u>	

<u>CONTROLADAS</u>	108
<u>III.6.6.- REACCIONES MÚLTIPLES DE SÍNTESIS DE PÉPTIDOS Y POSTERIOR PURIFICACIÓN DE LOS MISMOS</u>	109
<u>III.7.- ENSAYOS REALIZADOS CON DERIVADOS DE α-QUIMOTRIPSINA INMOVILIZADA SOBRE GELES DE AGAROSA</u> ..	111
<u>III.7.1.- HIDRÓLISIS DE BTEE</u>	111
<u>III.7.2.- REACCIONES DE SÍNTESIS DE PÉPTIDOS CINÉTICAMENTE CONTROLADAS, EFECTO DE DIVERSAS VARIABLES</u>	112
<u>III.7.3.- SÍNTESIS DE PÉPTIDOS TERMODINÁMICAMENTE CONTROLADAS</u>	114
<u>III.8.- REACCIONES CON SUSTRATOS NO NATURALES</u>	115
<u>III.8.1.- SÍNTESIS QUÍMICA DE LOS ÉSTERES, SUSTRATOS DE LAS REACCIONES ENZIMÁTICAS</u>	115
<u>III.8.2.- HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA EMPLEANDO SUSTRATOS NO CONVENCIONALES</u>	116
<u>IV.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	118
<u>IV.1.- ENSAYOS CON LOS DERIVADOS DE α-QUIMOTRIPSINA INMOVILIZADA SOBRE COPOLÍMEROS DE INJERTO</u>	118
<u>IV.1.1.- CARACTERÍSTICAS DE LOS DERIVADOS DE α-QUIMOTRIPSINA INMOVILIZADA SOBRE COPOLÍMEROS DE INJERTO</u>	118
<u>IV.1.2.- ESTUDIO DE LA RESISTENCIA A LA DESACTIVACIÓN</u> ..	126
<u>IV.1.3.- ENSAYOS DE ABRASIÓN</u>	139
<u>IV.1.4.- REACCIONES DE HIDRÓLISIS</u>	140
<u>IV.1.5.- REACCIONES DE SÍNTESIS DE PÉPTIDOS CINÉTICAMENTE CONTROLADAS</u>	143
<u>IV.1.6.- REACCIONES DE SÍNTESIS DE PÉPTIDOS TERMODINÁMICAMENTE CONTROLADAS</u>	181
<u>IV.1.7.- REACCIONES DE SÍNTESIS DE PÉPTIDOS</u>	

<u>EN REACTOR DISCONTINUO Y POSTERIOR</u>	
<u>PURIFICACIÓN DE LOS MISMOS</u>	182
<u>IV.2.- ENSAYOS CON DERIVADOS INMOVILIZADOS SOBRE</u>	
<u>GELES DE AGAROSA</u>	196
<u>IV.2.1.- CARACTERIZACIÓN DE LOS DERIVADOS INMOVILIZADOS</u>	
<u>SOBRE GELES DE AGAROSA</u>	196
<u>IV.2.2.- REACCIONES DE HIDRÓLISIS DE BTEE</u>	197
<u>IV.2.3.- REACCIONES DE SÍNTESIS DE PÉPTIDOS</u>	
<u>CINÉTICAMENTE CONTROLADAS</u>	202
<u>IV.2.4.- REACCIONES DE SÍNTESIS DE PÉPTIDOS</u>	
<u>TERMODINÁMICAMENTE CONTROLADAS</u>	233
<u>IV.3.- SUSTRATOS NO NATURALES</u>	236
<u>IV. 2.1.-INTRODUCCIÓN</u>	236
<u>IV.3.2.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	248
<u>V.- CONCLUSIONES</u>	268
<u>VI.- BIBLIOGRAFÍA</u>	270

I.- INTRODUCCIÓN

I.- INTRODUCCIÓN

I.1.- ENZIMAS: ASPECTOS GENERALES

I.1.1.- ESTRUCTURA, CLASIFICACIÓN Y NOMENCLATURA.

Las enzimas son proteínas desarrolladas por las células de los organismos vivos con la función específica de catalizar reacciones químicas *in vivo* (1). También son capaces de catalizar *in vitro* reacciones en las que intervienen tanto sustratos naturales como no naturales (2,3). Cuando el sustrato transformado pertenece a este segundo tipo, se emplea la denominación de BIOTRANSFORMACIÓN para designar el proceso.

Como todas las proteínas, las enzimas poseen una estructura primaria, secundaria y terciaria. La estructura primaria se debe a la secuencia de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, mientras que la secundaria y terciaria confieren a la enzima su forma tridimensional (**Figura 1**). La estructura cuaternaria sólo aparece en aquellas enzimas constituidas por varias subunidades, las cuales se asocian entre sí, mediante uniones de tipo no covalente.

Debido a su estructura proteica, las enzimas son sensibles a los cambios que se producen en su entorno. La presencia de disolventes orgánicos, iones, la variación del pH, de la temperatura o del microentorno, pueden alterar la estructura secundaria, terciaria o cuaternaria y pueden provocar la desnaturalización de la enzima, es decir, la pérdida de su estructura ordenada. En general, la mayoría de las enzimas desarrollan su actividad óptima a $\text{pH}=7.0$ y a una temperatura de 37°C , si bien existen excepciones, tales como las alcalasas que trabajan a un $\text{pH} > 8.0$, las lipasas, que trabajan en las interfases aceite-agua y son bastante resistentes a la presencia de disolventes orgánicos, o las enzimas de "termófilos" o "arqueas", cuya temperatura óptima de trabajo es igual o superior a 60°C .

Las enzimas se han clasificado sistemáticamente por el Comité Internacional de Enzimología en 6 clases principales, cada una de las cuales se divide a su vez en subclases, según el tipo de reacción que catalizan (**Tabla 1**). Cada enzima se designa por un nombre recomendado, generalmente corto y apropiado para su uso habitual, por un nombre sistemático, que identifica la reacción que cataliza, y por un número de clasificación que

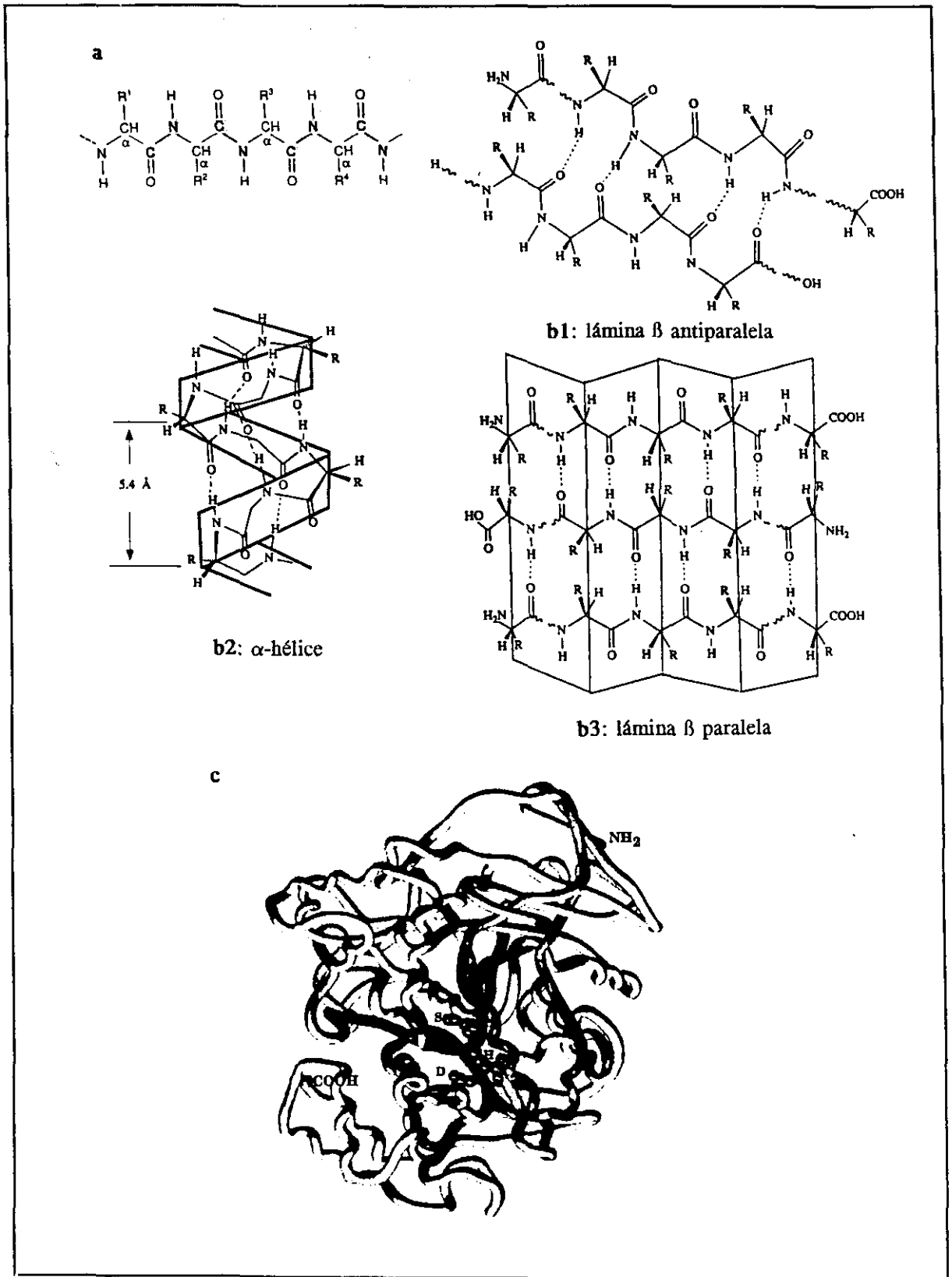


Figura 1.- Estructura de las enzimas: (a) estructura primaria; (b) estructura secundaria; (c) estructura terciaria.

Identifica a la enzima de forma inequívoca. Para ilustrar con un ejemplo, la enzima α -quimotripsina, empleada en la presente Tesis viene clasificada con el número E.C. 3.4.21.1, donde E.C. son las iniciales en inglés de Comisión de Enzimas, la primera cifra «3» representa el nombre de la clase (hidrolasa), la segunda cifra «4» representa a la subclase (enlaces peptídicos, ya que rompen este tipo de enlaces), la tercera cifra «21» a la sub-subclase (Serin-proteasas, ya que la unión al carboxilo se realiza a través de un resto de serina) y la cuarta cifra «1» que indica que la ruptura del enlace peptídico se produce en la vecindad de un aminoácido aromático.

Tabla 1. Clasificación internacional de las enzimas.

1.- OXIDO REDUCTASAS: (Reacciones de oxidación-reducción)	1.1 - Actúan sobre alcoholes $> -OH$ 1.2 - Actúan sobre cetonas $> C=O$ 1.3 - Actúan sobre alquenos $> =CH-$ 1.4 - Actúan sobre grupos amino $-NH_2$ 1.5 - Actúan sobre grupos imino $=NH$
2.- TRANSFERASAS: (Transferencia de grupos funcionales)	2.1 - Grupos de un átomo de C 2.2 - Grupos aldehídicos o cetónicos 2.4 - Grupos glucosilo 2.7 - Grupos fosfato 2.8 - Grupos que contienen azufre
3.- HIDROLASAS: (Reacciones de hidrólisis)	3.1 - Esteres 3.2 - Enlaces glucosídicos 3.4 - Enlaces peptídicos 3.5 - Otros enlaces C-N 3.6 - Anhídridos de ácido
4.- LIASAS: (Adición a dobles enlaces)	4.1 - $> C=C <$ 4.2 - $> C=O$ 4.3 - $> C=N-$
5.- ISOMERASAS (Reacciones de isomerización)	5.1 - Racemasas
6.- LIGASAS: (Formación de enlaces con escisión de ATP)	6.1 - Entre átomos de C y O 6.2 - Entre átomos de C y S 6.3 - Entre átomos de C y N 6.4 - Entre átomos de C y C

De los seis tipos de enzimas existentes, las hidrolasas (esterasas, lipasas y proteasas, etc) son las más empleadas en Síntesis Orgánica por las siguientes razones:

- 1) Accesibilidad comercial de las enzimas hidrolíticas de muy diverso origen;
- 2) Su buena estabilidad en presencia de medios no acuosos;
- 3) No suelen requerir cofactor para su acción catalítica.

Estas razones explican porqué más del 60 % de todas las Biotransformaciones de compuestos no naturales descritas durante las dos últimas décadas en la bibliografía habitual de la Química Orgánica se han realizado con hidrolasas (**Figura 2**).

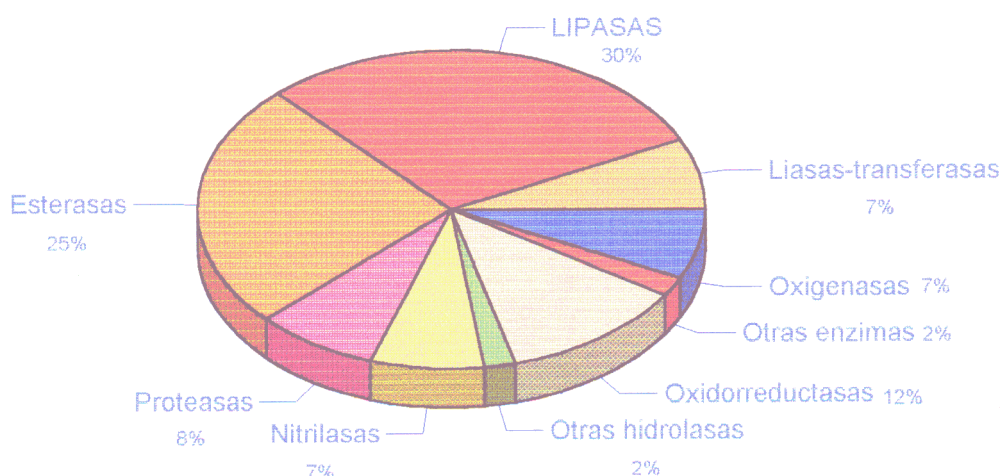


Figura 2.- Enzimas empleadas en Biotransformaciones

Las enzimas hidrolíticas se pueden emplear tanto en medio acuoso como en medios orgánicos. En el primer caso, nos encontramos ante procesos de hidrólisis catalizadas por las hidrolasas, cuyo interés en Síntesis Orgánica es limitado ya que pocos sustratos no naturales son solubles en agua. Mayor interés tienen los procesos catalizados en medios orgánico-acuosos, donde las enzimas catalizan una gran variedad de reacciones sintéticas: esterificaciones, interesterificaciones, lactonizaciones, tiotransesterificaciones, aminolisis, oximolisis, formación de enlaces amida, etc.

1.1.2.- CATÁLISIS ENZIMÁTICA Y SU APLICACIÓN EN PROCESOS BIOCATALIZADOS.

Las enzimas, como catalizadores, tienen las siguientes características principales, que pasamos a comentar:

1) Como todo catalizador, **aumentan la velocidad de la reacción** al disminuir la energía de activación necesaria para que ésta se lleve a cabo.

Las enzimas normalmente catalizan las reacciones con mayor eficacia que los catalizadores inorgánicos. Como ejemplo citaremos la descomposición del agua oxigenada en agua y oxígeno. La energía de activación necesaria para que suceda la reacción en ausencia de catalizador es de 75 KJ/mol. Esta energía se reduce a 50 KJ/mol en presencia de platino, y disminuye a 8 KJ/mol si se hace en presencia de peroxidasa (denominada clásicamente catalasa). Esto justifica el interés aplicado de los biocatalizadores.

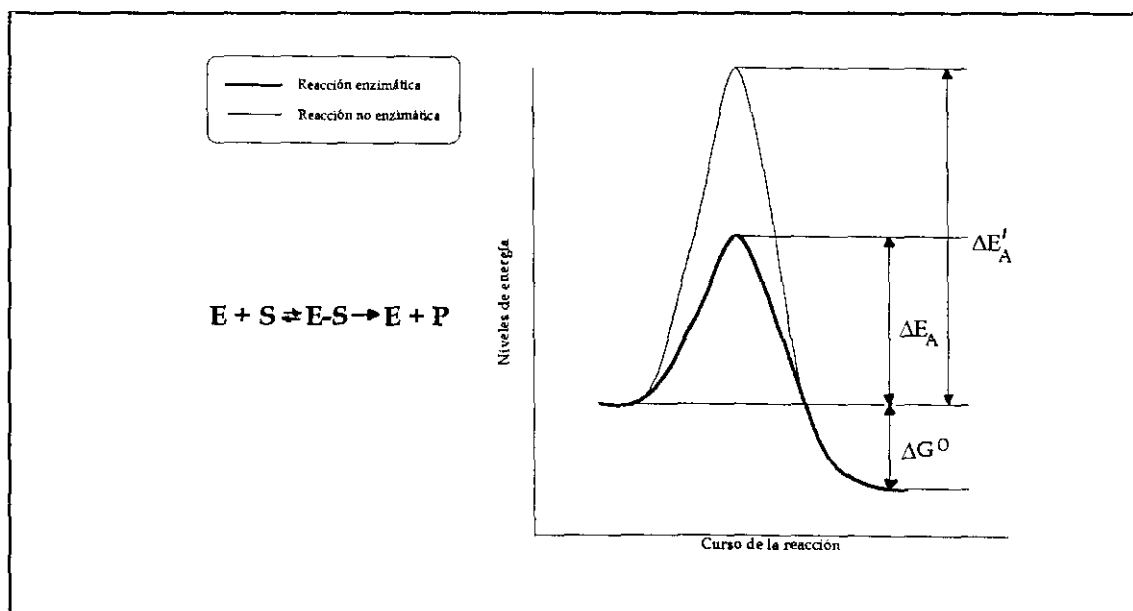


Figura 3.- Efecto de la catálisis enzimática sobre la energía de activación. ΔE_A es la energía libre de activación para una reacción catalizada por una enzima mientras que $\Delta E'_A$ es la de una reacción no catalizada. ΔG° es la energía libre de la reacción.

2) **Las enzimas son catalizadores selectivos:** la formación del complejo enzima-sustrato sucede en una pequeña región de la enzima denominada centro activo, el cual suele estar localizado en un hueco o cavidad de la estructura proteica. La selectividad de las enzimas es la base de muchas de sus aplicaciones en Síntesis Orgánica, ya que ofrecen la posibilidad de llevar a cabo transformaciones muy selectivas con estructuras quirales, polifuncionales o lábiles. La especificidad enzimática reside inherentemente en este centro activo, que posee las dimensiones correctas, la topología adecuada y el alineamiento óptimo de grupos conaiónicos y regiones hidrofóbicas para acomodar a un sustrato específico. Solamente unos pocos aminoácidos (entre 5 y 10) dentro del centro activo están directamente implicados en la catálisis enzimática y constituyen el centro de fijación. Estos aminoácidos no están localizados consecutivamente en la cadena polipeptídica, sino que se encuentran juntos tras el plegamiento característico de la enzima; por ello, la alteración de la estructura de la proteína puede desactivar el catalizador. No obstante, aquellos aminoácidos que no intervienen directamente en la catálisis también son importantes, ya que son esenciales en el mantenimiento de la conformación activa de la enzima.

Se han propuesto varios modelos para explicar la selectividad de las enzimas hacia un determinado sustrato. El modelo de "la llave y la cerradura" (4), que da una versión rígida de las enzimas, ha sido ampliamente superado por el modelo del "acoplamiento o encaje inducido" (5). En este modelo, el sustrato induce la orientación de los residuos en el centro activo para que se realice la unión al centro de fijación y suceda la catálisis.

3) **Las enzimas pueden ser objeto de regulación**, es decir, su actividad catalítica puede estar influenciada por la concentración de sustratos, productos y otras especies químicas presentes en solución. El tema de la regulación de las enzimas, de enorme importancia en los sistemas metabólicos donde normalmente actúan, es un inconveniente cuando se emplean como catalizadores en reacciones *in vitro* con sustratos no naturales. Así, cuando la concentración del producto de la reacción biocatalizada aumenta hasta cierto valor, puede existir una inhibición de la enzima por producto final lo cual reduce el interés de la aplicación de estas enzimas al no poder trabajar en grandes concentraciones de reactivos (6, 7). Existen dos formas de evitar este problema:

I) La eliminación del producto del medio de reacción a medida que se va formando

(a veces resulta un proceso no excesivamente sencillo).

II) El aumento de la cantidad de enzima (lo que supone un aumento en el coste del proceso).

4) Ciertas enzimas pueden requerir la **presencia de cofactores** para que sean activas. El aporte de estos cofactores y su regeneración significa un encarecimiento del proceso biocatalizado.

5) **La mayoría de las enzimas son solubles en agua** y presentan mayor actividad *in vivo* a pH=7-8 y a temperatura ambiente. Esto complica su utilización *in vitro* con sustratos no naturales, generalmente lipóides.

6) **Se pueden utilizar varias enzimas en combinación** para realizar transformaciones que sucedan en varios pasos sucesivos. Esto no es técnicamente viable, por lo que muchas veces se acude al empleo de la célula entera.

7) Las enzimas, dada su estructura proteica, **se degradan en condiciones relativamente suaves**. Los químicos, acostumbrados a conservar sus catalizadores metálicos durante mucho tiempo sin una pérdida considerable de actividad, se enfrentan con unos biocatalizadores que requieren un manejo mucho más cuidadoso; ésto implica muchas veces el que se busquen catalizadores inorgánicos menos eficaces pero más estables en las condiciones de reacción.

Las enzimas se pueden desnaturalizar mediante diversos mecanismos como:

I) La acción de proteasas presentes como contaminantes en los preparados enzimáticos;

II) La temperatura o los cambios de composición del medio, que pueden alterar la conformación de la proteína;

III) La contaminación microbiana;

IV) La autooxidación; etc.

Por ello la manipulación de las enzimas, tanto durante su utilización como durante su conservación, exige un manejo más delicado que el de otro tipo de catalizadores.

De todo lo dicho podemos concluir que la inestabilidad, el precio elevado y la especificidad respecto al sustrato son los principales inconvenientes que presentan las enzimas para ser utilizadas como catalizadores industriales con sustratos no naturales. Sin embargo,

muchos de estos problemas se han superado en los últimos años de investigación en biotransformaciones:

1) Existen ya una gran cantidad de enzimas comercialmente muy baratas, que transforman muchos sustratos estereoselectivamente originando intermedios de síntesis no accesibles económicamente por otras vías.

2) Con el objetivo de utilizar los biocatalizadores en procesos industriales a gran escala, se han desarrollado técnicas que mejoran la estabilidad de las enzimas y que facilitan su recuperación y reutilización (8); como ejemplos, citaremos la inmovilización y la modificación química.

3) Los avances de la Biología Molecular y los nuevos métodos del ADN recombinante han permitido la manipulación del material genético, el aislamiento de genes productores de enzimas y su expresión en otros microorganismos con el fin de obtener determinadas proteínas en grandes cantidades (9). Como consecuencia de esto, el precio de las enzimas ha bajado espectacularmente.

Estas técnicas también permiten la alteración controlada de las enzimas, creando enzimas artificiales con nuevas actividades.

4) La limitación que supone la insolubilidad de ciertos sustratos no naturales en agua se ha visto en parte superada por la posibilidad de realizar reacciones en sistemas heterogéneos en los que una pequeña parte del sustrato está presente en la disolución donde se suspende la enzima (10). Esto se logra empleando cosolventes orgánicos como el etilenglicol, el glicerol, el dimetilsulfóxido (DMSO) o la dimetilformamida (DMF), donde las enzimas son bastante estables (11).

I.2.- PROTEASAS: CONCEPTO Y CLASIFICACIÓN

Las enzimas que producen la ruptura de enlaces peptídicos (amídicos) en sustratos proteicos se denominan PROTEASAS (o también peptidasas). Estas enzimas llevan a cabo la catálisis en reacciones de transferencia de acilo, en las cuales un resto acilo es transferido a una molécula de agua.

El comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica, en sus reglas

dictadas a tal fin en 1984, clasificó a las proteasas dentro del grupo de enzimas hidrolíticas, junto con esterasas, glicosidasas y lipasas (**Tabla 1, Sección I.1.1**). Históricamente, las enzimas hidrolíticas que actúan sobre sustratos proteicos fueron de los primeros catalizadores biológicos en ser purificados y caracterizados, debido, en parte, a su estabilidad.

Las proteasas pueden, a su vez, clasificarse en dos tipos, dependiendo de su especificidad en la ruptura de los enlaces peptídicos: cuando el enlace susceptible de ser roto se encuentra en el interior de una cadena polipeptídica, la enzima se considera una ENDOPEPTIDASA; si por el contrario, la ruptura se lleva a cabo en el grupo amino terminal o en el carboxilo terminal, la enzima es una EXOPROTEASA, las cuales pueden ser, por tanto, bien aminopeptidasas o carboxipeptidasas.

Las proteasas se dividen en relación a su función fisiológica, en dos clases diferentes:

a) Proteasas que degradan los polipéptidos y las proteínas con fines digestivos y nutricionales. Tales enzimas funcionan tanto extracelularmente (en el tracto intestinal) como intracelularmente (en los orgánulos hidrolíticos intracelulares llamados lisosomas, situados fundamentalmente en las células del hígado y riñón).

b) Proteasas que tienen como función la limitación y control de la proteólisis de sustratos proteicos, para lo cual degradan o activan enzimas. Unos ejemplos de este tipo de transformación aparecen en la **Tabla 2**.

Tabla 2.- Proteasas actuando en procesos de control de funciones fisiológicas.

FUNCION FISIOLÓGICA	EJEMPLO
Mecanismos de defensa	Coagulación sanguínea
Producción hormonal	Proinsulina-Insulina
Digestión	Zimógeno-Proteasa activa
Uniones macromoleculares	Fibrinógeno-Fibrina Procolágeno-Colágeno
Desarrollo y crecimiento	Proquitina sintetasa-quitina sintetasa

Según su mecanismo de acción las proteasas se dividen por grupos (12):

1.-Proteasas con un residuo de SERINA en el centro activo (endoproteasas), también llamadas SERINPROTEASAS. Según su origen, se pueden dividir a su vez en dos familias: aquellas que se extraen de órganos de mamíferos, como son la α -quimotripsina, tripsina, y elastasa; y por otro lado, las que se obtienen a partir de microorganismos bacterianos, como es el caso de la subtilisina.

2.-Proteasas con un residuo CISTEINA en el centro activo (endoproteasas), también llamadas SULFHIDRILPROTEASAS tales como la papaína.

3.-Metaloproteasas (endoproteasas y exoproteasas) que contienen un metal en su estructura, bien provenientes del páncreas de mamíferos (carboxipeptidasa A) o bien de origen bacteriano como la termolisina.

4.-Proteasas con un residuo ASPÁRTICO en su centro activo, ASPARTILPROTEASAS (penicilinopepsina).

I.3- α -QUIMOTRIPSINA

I.3.1.- ESTRUCTURA Y OBTENCIÓN

La α -quimotripsina es, según las clasificaciones de proteasas dadas en la **Sección I.1.1**, una ENDOPROTEASA con un residuo SERINA en el centro activo.

Su origen se encuentra en las células acínicas del páncreas, donde se sintetiza en forma de precursor inerte, el quimotripsinógeno A, el cual está formado por una sola cadena polipeptídica de 245 residuos aminoácidos, con un peso molecular aproximado de 25 KDa. Este precursor inerte es transportado por el jugo pancreático hasta el intestino delgado, donde es atacado por la tripsina (SERINPROTEASA), lo que origina la ruptura de un enlace peptídico crucial para originar la enzima plenamente activa. Esta ruptura ocurre entre los residuos Arg₁₅ e Ile₁₆, (13, 14), originando un producto, compuesto por dos cadenas, completamente activo, llamado π -quimotripsina. Esta forma de la enzima no es estable en el intestino y sufre dos rupturas más (catalizadas por otras dos moléculas de quimotripsina) originando sucesivamente δ -quimotripsina (ruptura Leu₁₃-Ser₁₄) y α -quimotripsina (Thr₁₄₇ -

Asn₁₄₈) (Figura 4).

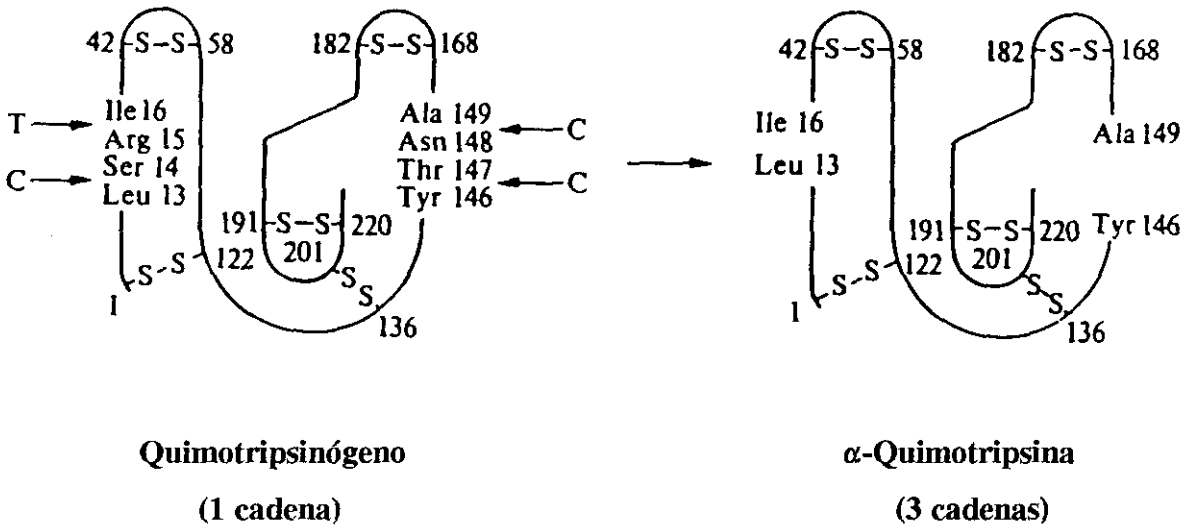


Figura 4.-Activación de quimotripsinógeno. T y C representan la acción de tripsina y quimotripsina respectivamente.

Esta última, la α -quimotripsina, es, por tanto, una enzima cuya estructura está formada por tres cadenas polipeptídicas unidas entre sí por puentes disulfuro. Una representación esquemática de la misma se muestra en la **Figura 5**.

Así, la α -quimotripsina consta de 241 residuos aminoacídicos con un peso molecular aproximado de 24,8 KDa; las tres cadenas pépticas unidas por enlaces disulfuro constan de 13, 131 y 97 residuos respectivamente y se denominan A, B y C.

Los residuos esenciales para la actividad catalítica de la proteína aparecen señalados con círculos en la **Figura 5**, y son Asp₁₀₂, His₅₇ y Ser₁₉₅. Los aminoácidos que intervienen en la conversión de quimotripsinógeno inactivo en α -quimotripsina activa están marcados con cuadros y son: Ile₁₆, Asp₁₉₄ e His₄₀. Muchos otros aminoácidos, que no están marcados, son importantes para la unión del sustrato porque forman la cavidad en la cual se fijan las cadenas

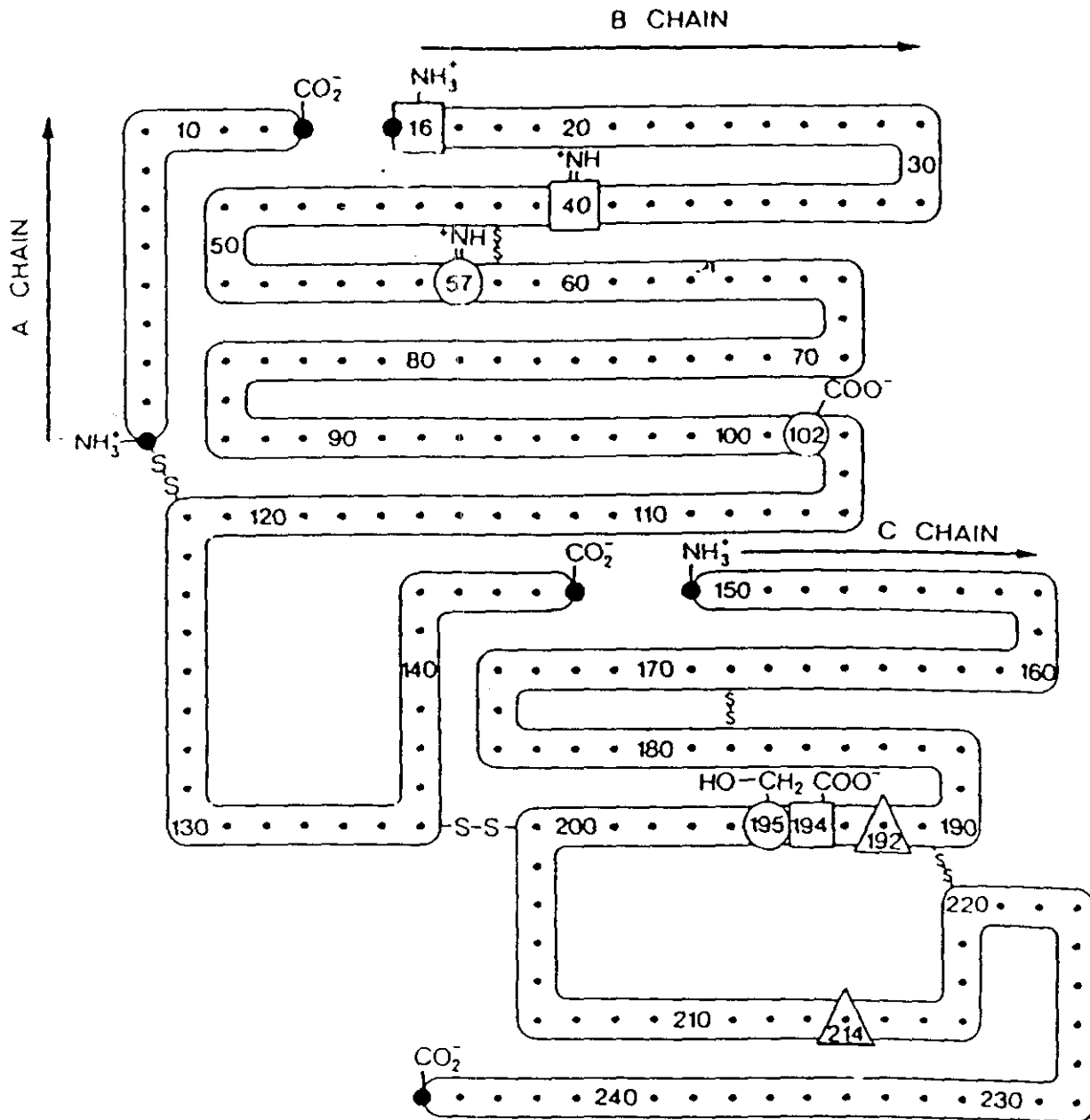


Figura 5.-Secuencia de aminoácidos de la α -quimotripsina bovina, según Hartley y cols (15, 16) y Meloun y cols (17).

- (●) Residuos amino y carboxilo terminales.
- (○) Residuos implicados en la reacción catalítica.
- (□) Residuos implicados en la activación del quimotripsinógeno.
- (△) Residuos implicados en la unión de los sustratos al centro activo.

laterales hidrofóbicas de los sustratos específicos de la α -quimotripsina (18); por otra parte, existen otros dos residuos marcados con triángulos que también están implicados en la unión de los sustratos, pero que se sitúan fuera del centro activo, y son Ser₂₁₄ (18) y Met₁₉₂ (19, 20).

En 1967 se obtuvo un mapa de Rayos X de densidades electrónicas de alta resolución de la Tosil- α -quimotripsina (21, 22). Posteriores cálculos permitieron mejorar el mapa de densidad electrónica, lo que hizo que se pudieran analizar coordinaciones atómicas de casi toda la molécula (23).

La Tosil- α -quimotripsina es un derivado inactivo de la α -quimotripsina que se obtiene por tosilación del resto de serina del centro activo (24, 25). La Tosil- α -quimotripsina cristalina tiene la misma estructura que la α -quimotripsina cristalina (26), salvo unas pocas diferencias en el centro activo. Los cristales pertenecen al grupo espacial P2, con unas distancias $a=49.3$ Å, $b=67.3$ Å, $c=65.9$ Å y un ángulo $\beta=101.8^\circ$. La celdilla unidad contiene dos moléculas de enzima (27) y aparece representada en la **Figura 6**.

La molécula de enzima es elipsoidal, con unas dimensiones de aproximadamente 51 Å a lo largo del eje cristalográfico "a" y 40 Å en los ejes "b" y "c". La molécula está un poco aplanada en el centro activo y presenta un agujero en la superficie el cual tiene un papel muy importante en la unión a los sustratos específicos.

Los residuos 235-245 de la parte C-terminal forman una α -hélice. En esta zona, el último enlace peptídico tiene una orientación que produce un estrechamiento de la hélice semejante a la estructura de hélice 3.0₁₀ (28). Este efecto ya ha sido observado en la Mioglobina y en la Lisozima. La estructura recibe el nombre de α_{T} -hélice (29). Los residuos 164-173 también presentan estructura en α -hélice; esta hélice está distorsionada por la existencia de un enlace de hidrógeno 3.0₁₀ en el centro de la hélice. El cuidadoso examen de este tramo acentúa la dificultad de decidir si la relación de los dos enlaces peptídicos consecutivos es más típica de la α -hélice o de la hélice 3.0₁₀ ya que la distancia total de los ángulos diedros, característicos de las dos hélices, es solo de 35° (29).

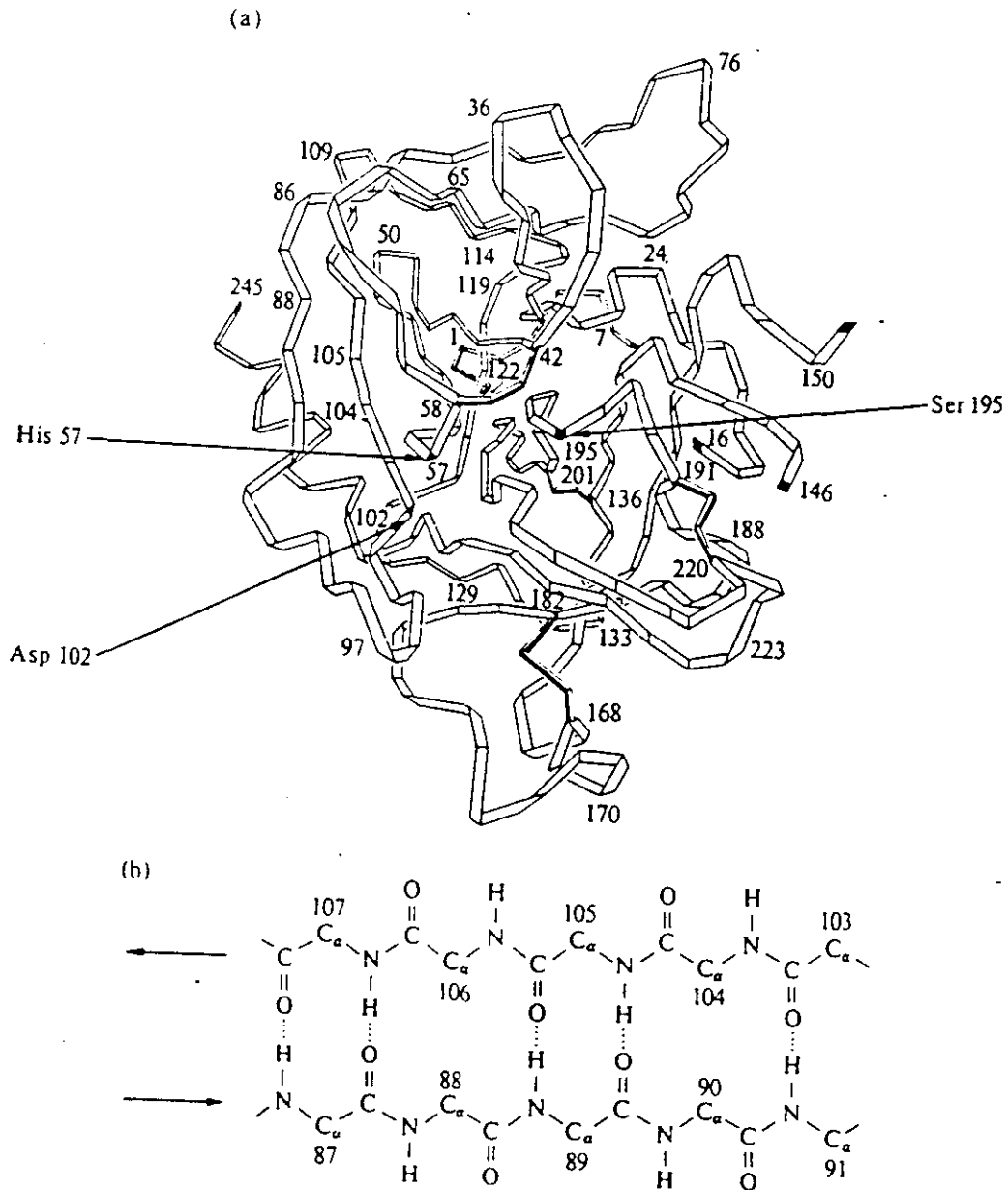


Figura 6.- (a)Estructura de la α -quimotripsina. (b) Representación de los puentes de hidrógeno en la estructura antiparalela de la α -quimotripsina.

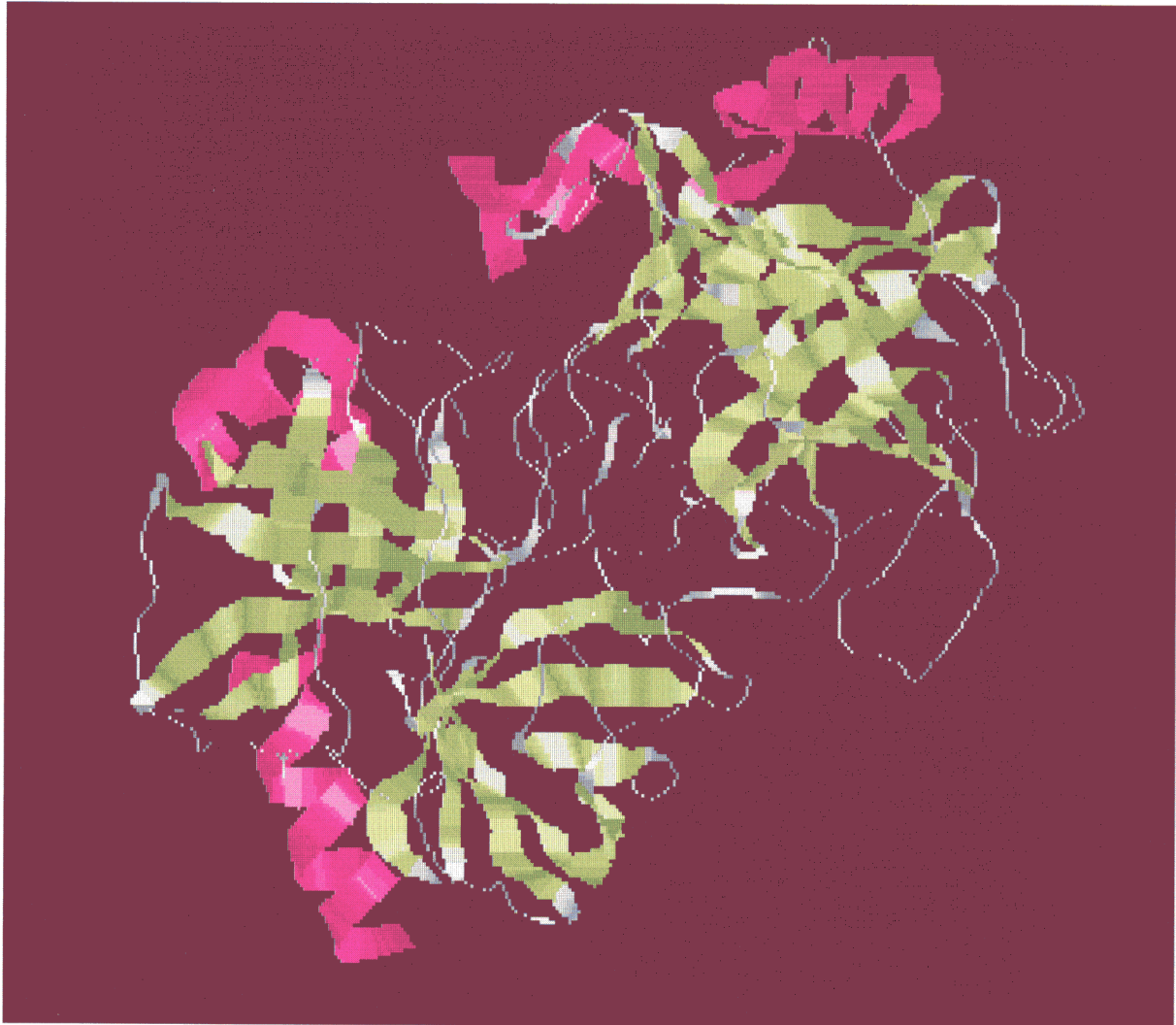


Figura 7.- Estructura de la α -quimotripsina, procedente del *Brookhaven Protein Data Bank*.

La disposición antiparalela de láminas plegadas (30) es bastante común en la molécula de α -quimotripsina, aunque no hay regiones extensas de lámina plegada regular. Por el trazado de la cadena principal en zig-zag, casi todos los residuos que forman los puentes de hidrógeno de la cadena principal están muy próximos. El modelo de líneas en zig-zag se utiliza para recalcar la distancia de dos unidades plegadas en la molécula entre los residuos 27-112 y 133-230. Cada una de estas unidades consta de una serie de seis líneas antiparalelas que siguen el mismo patrón; dentro de cada unidad hay algunos puentes de hidrógeno del tipo de láminas plegadas antiparalelas entre cada una de esas líneas y sus vecinas. Además, existen puentes de hidrógeno entre la sexta y la primera línea de cada unidad, de tal forma que las seis líneas se unen formando un cilindro (31, 32). Estos cilindros están tan distorsionados que son casi irreconocibles, pero cada uno contiene un núcleo de residuos hidrofóbicos.

En la cadena principal de la proteína los enlaces de hidrógeno se establecen entre un grupo amido y el carbonilo del tercer residuo posterior. Este tipo de enlace de hidrógeno es característico de la hélice 3.0_{10} (29) y muy común en la molécula de α -quimotripsina, especialmente al final de las vueltas o rizos donde la cadena polipeptídica se tuerce y vuelve a ser paralela a su dirección original (32).

Todos los grupos cargados de la proteína se sitúan en la superficie de la molécula, excepto el grupo α -amino de la Ile₁₆ y los grupos carboxílicos de Asp₁₀₂ y Asp₁₉₄. Aunque existen muchos grupos hidrofóbicos en la superficie de la molécula como Phe₃₉ y Phe₄₁, la α -quimotripsina presenta la tendencia general, observada en otras proteínas, a tener los grupos hidrofóbicos colocados hacia el interior y los grupos ionizables expuestos hacia el exterior. También se ha visto que hay varias moléculas de agua atrapadas dentro de la molécula de proteína (33). Los diferentes entornos de los residuos de la enzima aparecen en la **Tabla 3**.

Tabla 3.- Entorno de las cadenas de aminoácidos en la α -quimotripsina.

Amino-ácido	CADENA LATERAL			GRUPO FUNCIONAL		
	Externo	Superficie ^a	Interno ^b	Grupo	Externo	Interno
Gly	11	3	8			
Ala	13	3	6			
Val	4	8	11			
Leu	2	7	8			
Ile	3	3	4			
Ser	20	3	3	Hidroxilo	21	5
Thr	15	4	3	Hidroxilo	19	3
Asp	7	1	1	Carboxilo	7	2
Glu	4	1	0	Carboxilo	5	0
Asn	11	2	0	Amida	11	2
Gln	6	3	1	Amida	8	2
Lys	14	0	0	Amino	14	0
Arg	3	0	0	Guanidino	3	0
His	0	2	2	Imidazol-N	1	3
Phe	1	5	0			
Tyr	2	2	0	Hidroxilo	3	1
Trp	0	6	2	Indol-N	3	5
Pro	3	3	3			
Cys	3	4	3	Sulfuro	5	5
Met	1	0	1	Sulfuro	1	1

^a Superficie, significa: que solo un lado de la cadena lateral es accesible al agua.

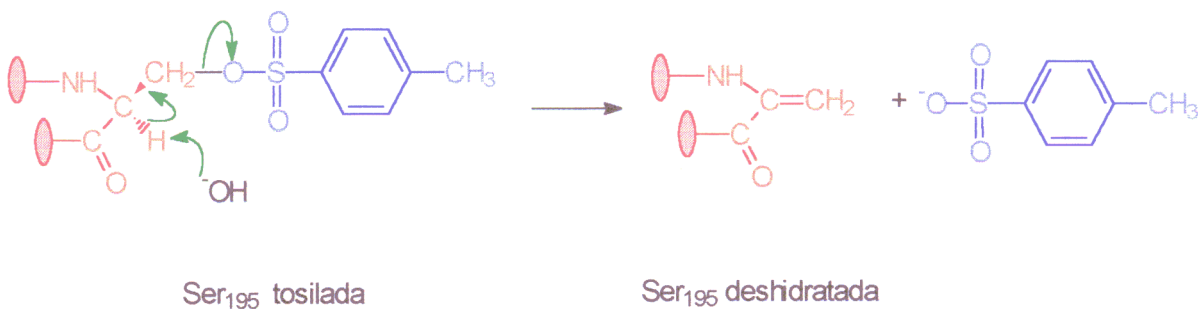
^b Interno, significa: inaccesible al agua, asumiendo que la estructura cristalográfica observada sea rígida.

I.3.2.-ESTRUCTURA DEL CENTRO ACTIVO DE LA α -QUIMOTRIPSINA

Son muy numerosos los trabajos cuyo objetivo es el conocimiento del centro activo de la α -quimotripsina (34-53). Para no cansar al lector hemos intentado centrarnos unicamente en aquellos aspectos fundamentales desde el punto de vista catalítico, resumiendo al máximo las descripciones morfológicas.

I.3.2.1.-Residuos implicados en la acilación.

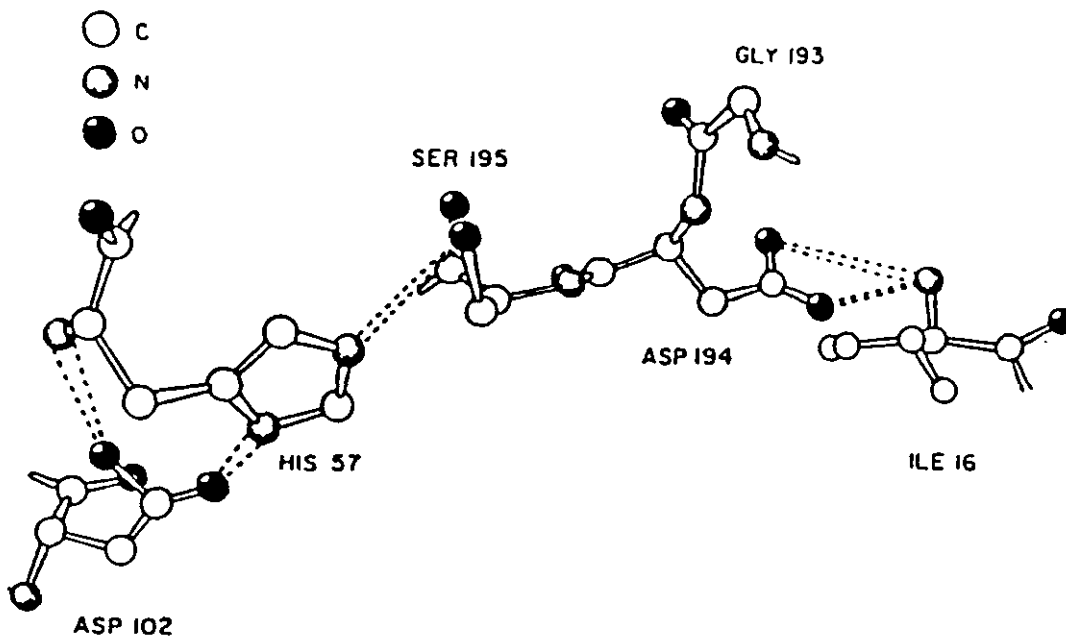
Es lógico pensar que el residuo acilado debe encontrarse en la región espacial donde existe la catálisis, esto es, en el centro activo. Para poder determinar cuál es el residuo o residuos que se acilaban se llevaron a cabo estudios de acilación con diferentes reactivos, y se concluyó que era un oxígeno el grupo nucleófilo que sufría la acilación: en la reacción estequiométrica con fluorofosfato de diisopropilo, sólo un residuo serina de los 28 que hay presentes mostró las propiedades nucleofílicas necesarias (54, 55). Mediante una serie de estudios cristalográficos se asignó este residuo a la Ser₁₉₅ (56). Ello implicaría que la modificación de la Ser₁₉₅ hace imposible el acto catalítico. Weiner y cols. (57) demostraron que la modificación de la serina por deshidratación formal en medio básico en la enzima tosilada, tal y como se expone en el **Esquema 1**, produce la inactivación de la enzima.



Esquema 1.- Reducción de la Ser₁₉₅.

Este experimento probaba que el residuo de la Ser₁₉₅ juega un papel vital en el proceso catalítico.

Normalmente, la ionización del grupo -OH de los residuos de serina, necesaria para llevar a cabo el incremento de nucleofilia del átomo de oxígeno y poder realizar el ataque nucleofílico que conduzca al intermedio acil-enzima, es insignificante debido al alto valor del pKa (≈ 14) del grupo -CH₂-OH. Debería existir alguna especie de catálisis básica que aumente la nucleofilia de la Ser₁₉₅ para facilitar esta disociación. Así, el complejo ES' se produce mediante un sistema de movimientos de densidad electrónica (58) en el cual están implicados tres residuos aminoacídicos: serina, histidina, y ácido aspártico, denominada TRIADA DE AMINOÁCIDOS del centro activo. Concretamente en el caso de la α -quimotripsina, estos residuos son la Ser₁₉₅, la His₅₇ y el Asp₁₀₂, hecho que fue deducido mediante estudios de difracción de Rayos X (58), los cuales mostraron un ordenamiento preciso de los tres residuos.



Esquema 2.-Representación de la triada catalítica.

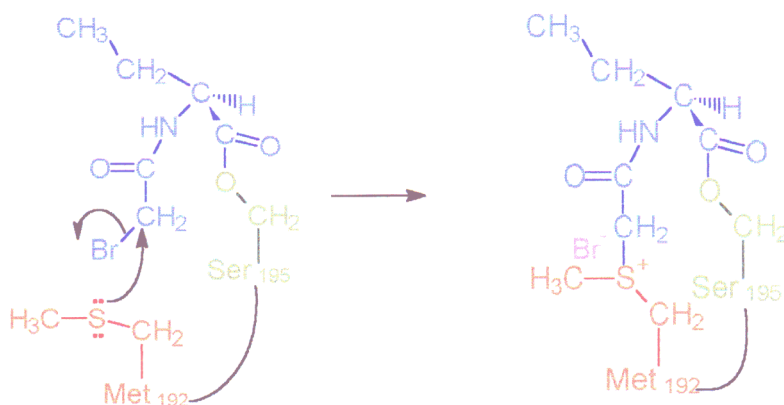
en las ionizaciones microscópicas del sistema. El valor de k_{cat} depende de un pKa de 6.7 a 7.0, y este pKa se asigna normalmente a la disociación de un protón de la forma catiónica de His₅₇. No obstante también se podría asignar a un grupo β -carboxílico, del Asp₁₀₂, el cual normalmente presenta un pKa de aproximadamente 4.5. No obstante, este último residuo se encuentra en un entorno hidrófobo en el interior de la proteína, y este medio elevaría el pKa de este grupo carboxílico, puesto que el anión carboxilato sería menos estable en un medio de baja constante dieléctrica. Por tanto, Hunkapiller y cols. (59) postularon que los pKa de los residuos de His₅₇ y de Asp₁₀₂ estaban invertidos, y que la ionización que se produce a valores de pH de aproximadamente 7.0 se debía a la pérdida de un protón del grupo carboxilo de un residuo aspártico en presencia de un anillo neutro de imidazol en lugar de la pérdida de un protón de un catión imidazólico en presencia de un anión carboxilato. Estas suposiciones se vieron refrendadas mediante un estudio realizado en una serin-proteasa de origen bacteriano, la proteasa α -lítica de *Myxobacter* 495 (59). Dicha enzima sólo presenta un residuo histidina, concretamente el situado en el centro activo, el cual puede ser marcado con ¹³C, y analizado con RMN, a fin de calcular los valores concretos de pKa, los cuales resultaron ser 4.0 para el catión imidazólico y 6.7 para el carboxilo del ácido aspártico. Posteriores estudios de RMN (60, 61) ya realizados sobre la propia α -quimotripsina, así como otros estudios de difracción de neutrones, (62) reafirmaron estos valores de pKa para los residuos mencionados.

La mutagénesis dirigida también ha sido empleada para reafirmar la importancia del residuo de Asp₁₀₂ (63), realizando el cambio de este aminoácido por una asparragina. El valor de k_{cat} calculado resultó ser 5000 veces menor que el de la enzima nativa, lo que demuestra que este residuo Asp₁₀₂ es importante, pero no imprescindible, para la catálisis. Mediante marcadores de afinidad se demostró también que la mutación de Asp₁₀₂ a Asn origina efectos considerablemente mayores sobre la reactividad de la Ser₁₉₅ que sobre la His₅₇. Otros estudios de mutagénesis dirigida demostraron que las tres cadenas laterales implicadas en el sistema de intercambio de densidad electrónica actúan de modo sinérgico para aumentar la velocidad de catálisis (64).

Un residuo metionina, concretamente Met₁₉₂, también tiene cierta importancia en la catálisis, debido a su cercanía con el centro activo. Esto fue demostrado por Lawson y Schramm (65), al realizar la acilación de la Ser₁₉₅ con N-(bromoacetyl)- α -aminobutirato de p-

Schramm (65), al realizar la acilación de la Ser₁₉₅ con N-(bromoacetil)- α -aminobutirato de p-nitrofenilo; el grupo bromoacetilo se sitúa cerca del centro activo y puede reaccionar con un nucleófilo cercano, como es el azufre del residuo Met₁₉₂ tal y como muestra el **Esquema 3**. La enzima acilada es aún activa, pero los parámetros cinéticos de Michaelis-Menten (K_m y k_{cat}) se encuentran alterados puesto que parte del centro activo se encuentra bloqueado.

Es importante también considerar el papel desempeñado por el residuo Gly₁₉₃, que forma un enlace por puente de hidrógeno mediante un grupo -NH- de la cadena polipeptídica y el carbonilo de un sustrato o inhibidor; la Ile₁₆ y el Asp₁₉₄, que forman un par iónico esencial para mantener a la enzima en una conformación activa (66), y por último la Ser₂₁₄ que forma un enlace de hidrógeno mediante un oxígeno carbonílico de la cadena y el -NH- del amido del sustrato (34).



Esquema 3.-Importancia de la metionina en la catálisis.

I.3.2.2.-Mecanismo de acción

El mecanismo cualitativo de hidrólisis de un sustrato polipeptídico por parte de la α -quimotripsina se divide en los siguientes pasos:

a) PASO DE ACILACIÓN

El sustrato se une al centro de unión de la enzima, mediante un puente de hidrógeno entre un hidrógeno del grupo N-acilamino y el grupo carbonilo de la Ser₂₁₄, de forma que el grupo carbonilo reactivo se coloca con su oxígeno entre los -NH- de la cadena de los grupos Ser₁₉₅ y Gly₁₉₃ (**Esquema 4**), originando el complejo ES (paso a₁).

No obstante, es posible que el enlace de hidrógeno entre el oxígeno y la Gly₁₉₃ sea más largo y débil. Ahora se produce el primer paso químico, ataque del hidróxilo de la Ser₁₉₅ al carbono carbonílico para formar un intermedio tetraédrico (paso a₂). Durante este ataque, el protón del hidróxilo es transferido al imidazol de la His₅₇, mientras el residuo Asp₁₀₂ retira el otro protón del anillo de imidazol. De esta forma se ha aumentado la nucleofilia del grupo hidróxilo de la Ser₁₉₅.

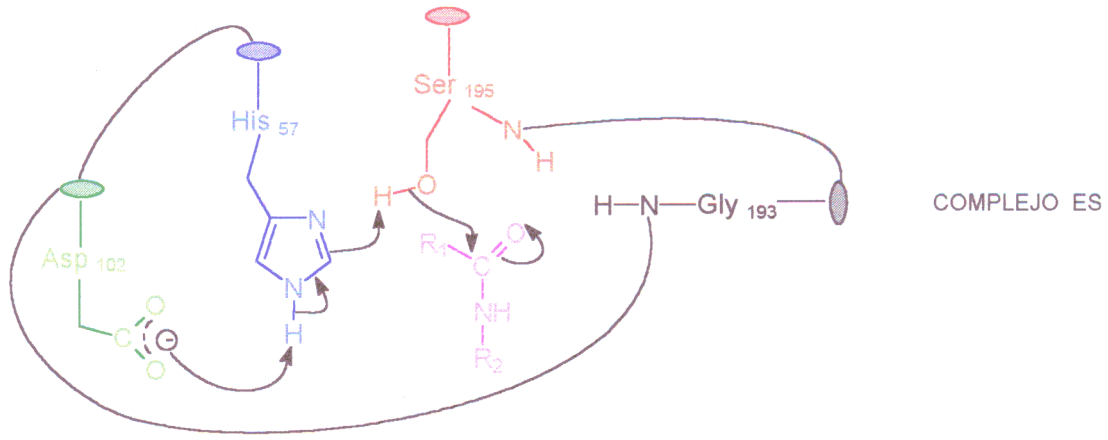
El oxígeno, con su carga negativa, se mueve hacía posiciones más cercanas al -NH- del residuo Gly₁₉₃, formando un enlace de hidrógeno más corto y fuerte. El estado de transición se estabiliza con respecto al complejo ES debido a las mejores interacciones del grupo saliente y el centro activo de la enzima, más concretamente al enlace de hidrógeno con la citada glicina. El intermedio tetraédrico posteriormente se rompe (paso a₃), para formar el complejo acil-enzima produciéndose la liberación del primer producto de la reacción hidrólisis.

En el **Esquema 4** se muestran los pasos (a₁, a₂, a₃) que componen el proceso de acilación.

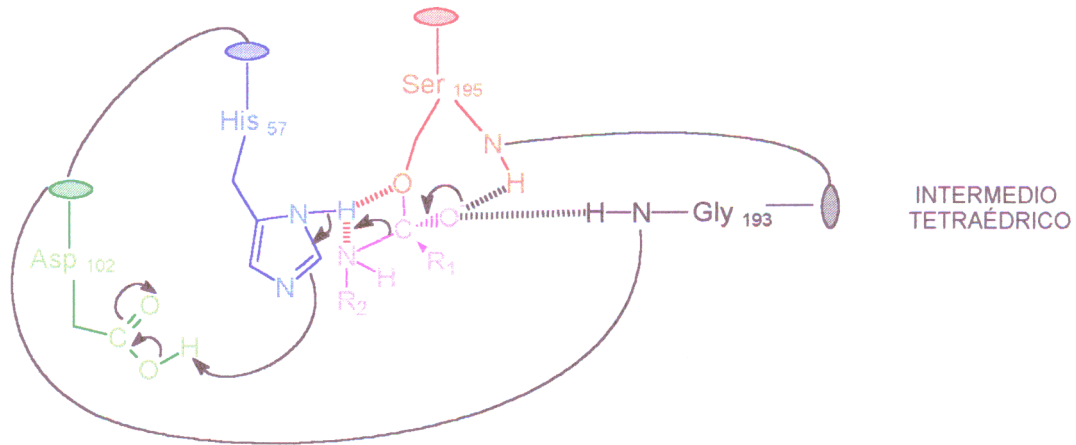
b) PASO DE DEACILACIÓN

El proceso de deacilación supone el ataque de una molécula de agua, que actúa como nucleófilo, atacando al complejo acil-enzima. Según el principio de reversibilidad microscópica, los pasos implicados en esta reacción han de seguir mecanismos similares a los del proceso directo. La activación de la molécula para actuar como nucleófilo se produce de modo similar al hidroxilo de la Ser₁₉₅; de nuevo funciona el mecanismo de desplazamiento de densidad de carga electrónica entre la triada de aminoácidos del centro activo, tal y como se representa en el **Esquema 5**.

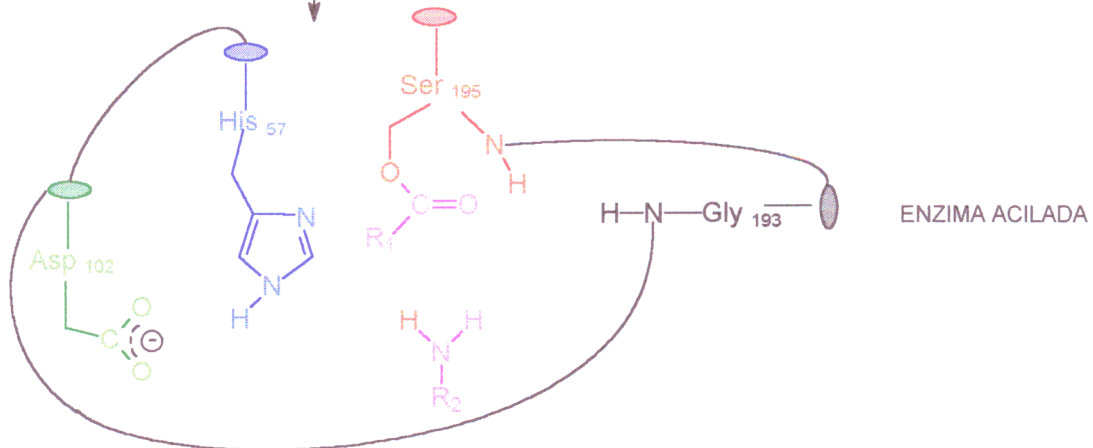
a₁)



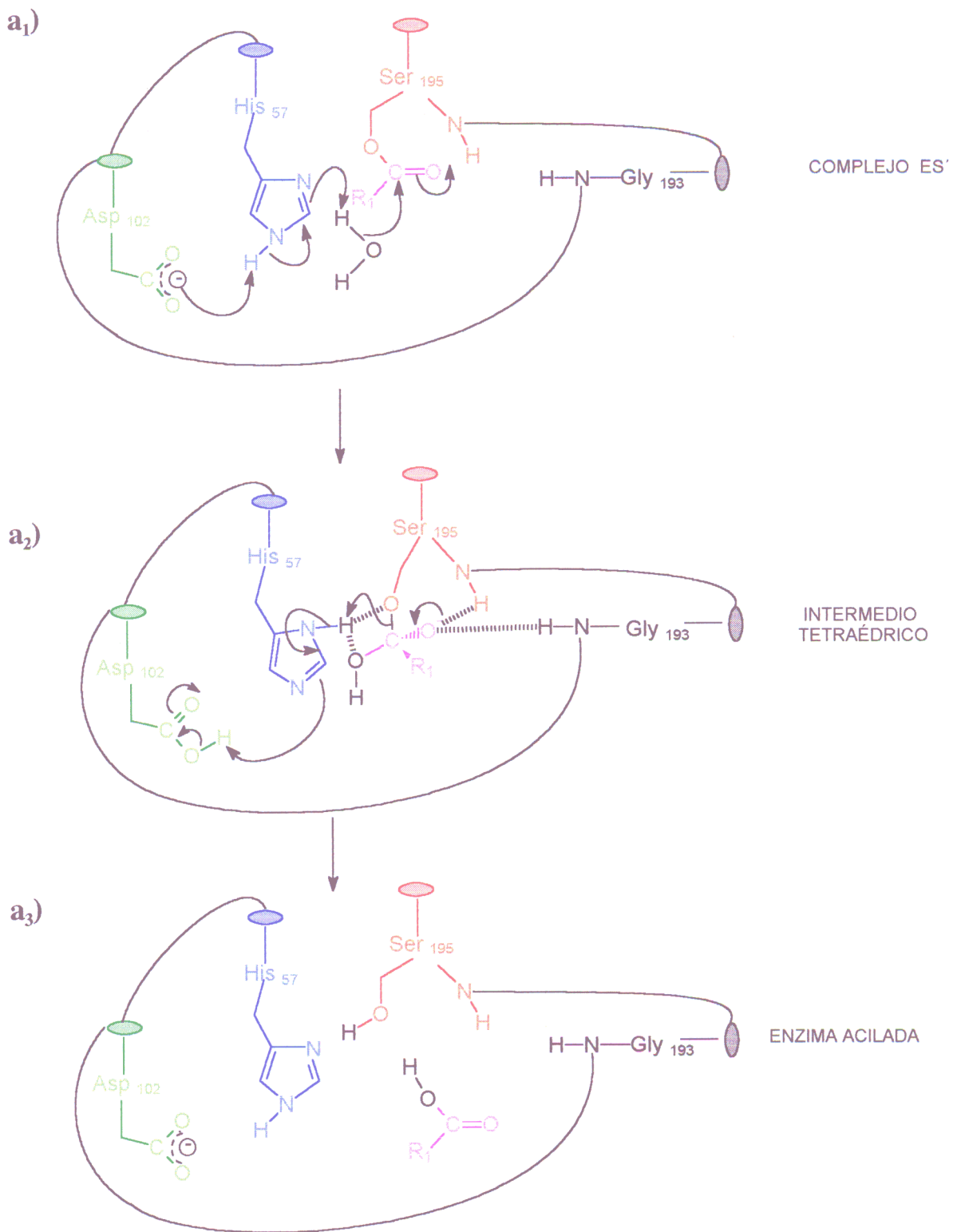
a₂)



a₃)



Esquema 4.-Proceso de acilación de la enzima.

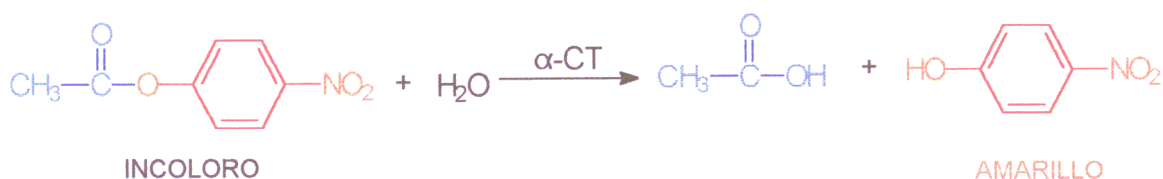


Esquema 5.-Proceso de hidrólisis del complejo acil-enzima.

La eficacia catalítica se produce puesto que el sistema de desplazamiento de densidad electrónica evita la existencia de espacios inestables, que presenten separación de cargas, y facilita el transporte de los protones entre los residuos enzimáticos, sustratos y productos finales.

I.3.3.- REACCIONES DE HIDRÓLISIS

Históricamente, la primera observación de la valoración de la α -quimotripsina, se realizó con el sustrato acetato de p-nitrofenilo (**Esquema 6**), en 1954, en el ya clásico experimento de Hartley y Kilby (67).



Esquema 6.- Reacción de hidrólisis del acetato de p-nitrofenilo.

Es evidente que el éster no puede guardar parecido con el modelo estructural de los sustratos de la α -quimotripsina comentados anteriormente (**Sección I.1.1**). No obstante, el hecho de la gran acidez del p-nitrofenóxido originado ($\text{pK}_a=7.0$) y el gran valor del coeficiente de extinción molar del mismo ($\epsilon_{400\text{nm}} = 18000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$) (68), nos permite disponer de un ensayo muy sensible para la monitorización de la hidrólisis catalizada enzimáticamente. Como parece lógico, el acetato de p-nitrofenilo (pNPA) es un pobre sustrato de la enzima. No obstante, cuando se llevaron a cabo estas medidas, se observó un valor matemáticamente distinto de cero al extrapolar (a tiempo cero) los valores de absorbancia frente al tiempo en la curva cinética. Posteriormente se comprobó que dicho valor extrapolado coincidía, al ser transformado a moles de anión p-nitrofenóxido, de manera estequiométrica con la cantidad de enzima empleada, como se muestra en la **Figura 8**.

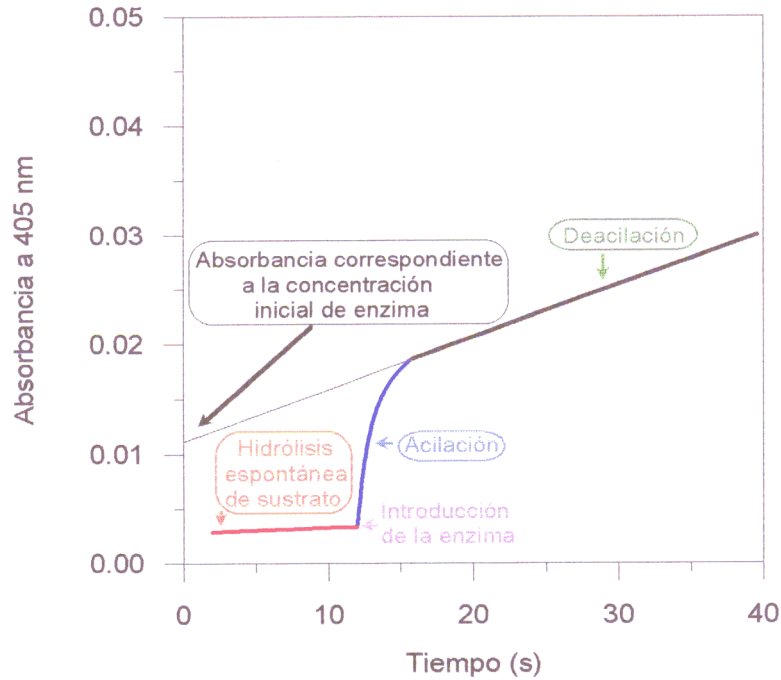
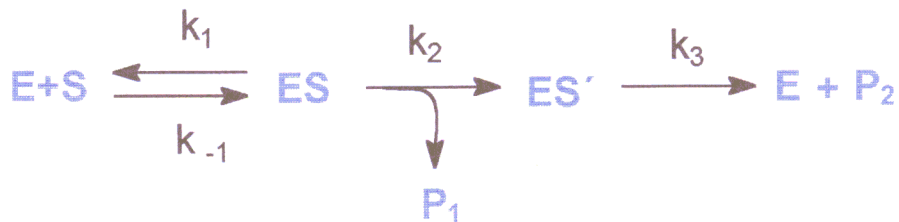


Figura 8.- Cinética de la hidrólisis del éster del acetato de p-nitrofenilo

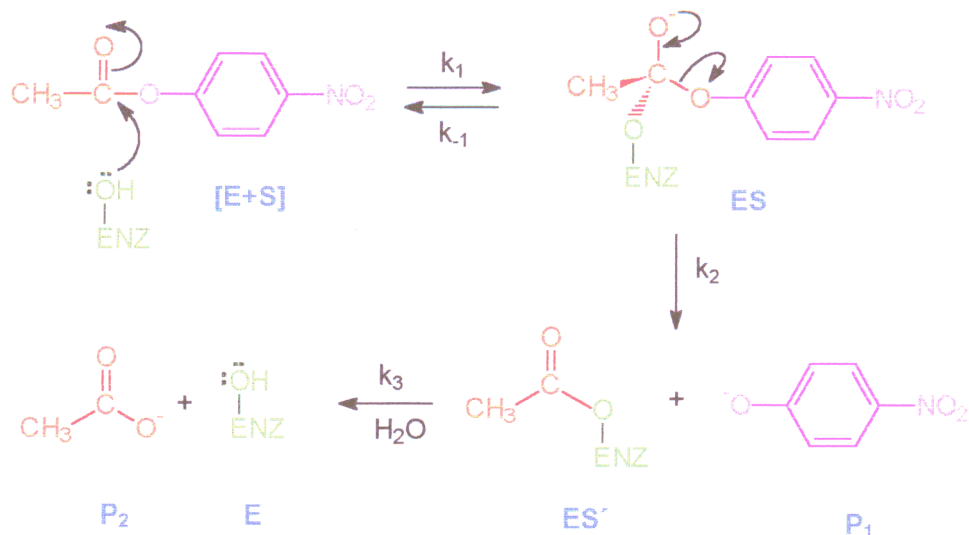
Es difícil admitir que el anión p-nitrofenóxido se produzca de manera instantánea. Presumiblemente, debe formarse a una velocidad rápida pero finita. Así pues, estamos ante una CINÉTICA BIFÁSICA, donde se producen dos reacciones a velocidades significativamente diferentes, tal y como se expresa en el siguiente esquema, empleando la nomenclatura clásica de Michaelis-Menten (69).



Esquema 7.- Mecanismo general de hidrólisis.

En este caso, ES' representa un intermedio de reacción que se origina a partir de ES después de que se haya producido algún cambio químico y uno de los productos (P_1) haya sido liberado. Posteriormente, ES' se rompe para liberar la enzima inalterada y el segundo producto

de reacción. Para la α -quimotripsina, según Hartley y Kilby (67), P_1 es el anión p-nitrofenolato y P_2 es el producto final siendo $k_2 > k_3$. Como k_1 es muy rápido, k_3 será el paso determinante de la velocidad de reacción. Por tanto, estos autores postularon el siguiente mecanismo:



Esquema 8.- Mecanismo de la reacción de hidrólisis del acetato de p-nitrofenilo.

ES sería un intermediario covalente del tipo acil-enzima (de geometría tetraédrica) producido por el ataque nucleofílico a través de $-\text{OH}$ (grupo nucleófilo) (**Esquema 8**), que desplaza al anión p-nitrofenóxido (un buen saliente) como primer producto. Así, la liberación inicial del p-nitrofenóxido representa una rápida acilación de toda la enzima en disolución, lo que supone una cantidad estequiométrica del producto cromóforo. El siguiente paso (más lento) sería la hidrólisis del complejo acil-enzima (ES') para liberar la enzima y el anión acetato (**Figura 8**).

Este comportamiento fue definido como *explosión inicial* de p-nitrofenóxido ("initial burst") (67), y así se adaptó el término para otras reacciones enzimáticas que presentan el mismo comportamiento (70). Por tanto, se definió el término VALORACIÓN para una reacción de este tipo, que origina un producto intermedio fácilmente valorable generalmente por espectrofotometría ultravioleta-visible (71), con las condiciones cinéticas de que $[E] \ll [S]$, $[S] \geq K_m$, y $k_2 \geq k_3$.

Desde que se describió este fenómeno de valoración de la enzima, han aparecido en la

bibliografía otros casos con: cinamato de o-nitrofenilo (72), con N-*trans*-cinamoil-imidazol (73), con un sustrato específico de la α -quimotripsina, el N-acetil-*L*-triptofanato de metilo (66) o con la sultona del ácido 2-hidroxi-5-nitro- α -tolueno-sulfónico (74).

En la hipótesis de Hartley y Kilby se predijo que el complejo ES' debe presentar una geometría covalente. Posteriormente esta hipótesis fue confirmada con diferentes experimentos:

1.-Un estudio cinético mediante la técnica "stopped flow" de la hidrólisis de un tripéptido con elastasa demostró que la descomposición de un intermedio tetraédrico para producir la enzima acilada es el paso limitante de la reacción hidrolítica total (75).

2.-Mediante estudio de Rayos X de complejos formados por tripsina y moléculas proteicas pequeñas que actúan como potentes inhibidores. (76, 77)

3.-Reduciendo la temperatura de la reacción hidrolítica hasta el punto de lograr el aislamiento del complejo tetraédrico (78).

1.3.3.1.- Diferencias entre ésteres y amidas

Dado que el paso fundamental del proceso químico es la acilación de la enzima para originar el complejo acil-enzima, éste es el primer paso a estudiar.

Para ello vamos a comentar brevemente la formación del complejo acil-enzima en la hidrólisis de ésteres y en la hidrólisis de amidas (hidrolisis de péptidos).

El mecanismo de hidrólisis del acetato de p-nitrofenilo se ha usado como modelo para estudiar la hidrólisis de ésteres catalizada por α -quimotripsina (Esquema 8 anteriormente expuesto). El proceso implica la acetilación del grupo -OH de la Ser₁₉₅ y tiene lugar en dos etapas (79, 80), como ya se ha comentado.

Guntfreund y Sturtevant sugirieron que la hidrólisis de todos los ésteres catalizada por α -quimotripsina tiene el mismo mecanismo que el observado para el caso de la hidrólisis del acetato de p-nitrofenilo (81, 82).

Cuando el sustrato *S* es el éster etílico de la N-benzoil-*L*-tirosina, sustrato que se empleará a menudo en la presente Memoria, P₁ es etanol y P₂ es N-benzoil-*L*-tirosina, k₁ es la constante de disociación del complejo enzima-sustrato y ES' es la enzima acilada, en la que

el oxígeno del -OH de la Ser₁₉₅ está unido al carbono carboxílico de la N-benzoil-*L*-tirosina.

a) Estudios cinéticos de la hidrólisis de ésteres

La velocidad de hidrólisis de ésteres catalizada por α -quimotripsina se ha medido bien mediante valoración del ácido liberado en la reacción de hidrólisis (83), bien empleado métodos espectrofotométricos (84, 85). Cuando la concentración inicial de sustrato $[S_0]$ es mayor que la concentración de enzima, $[E]$, las representaciones de velocidad frente a concentración de sustratos nos permiten determinar los parámetros cinéticos (86, 87).

Las constantes cinéticas para el proceso indicado anteriormente son:

$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{[E]} = \frac{k_2 \times k_3}{k_2 + k_3} \quad [1]$$

$$K_m = k_1 \times \frac{k_3}{k_2 + k_3} \quad [2]$$

En este caso, se ha visto que $k_2 > k_3$ con lo que los parámetros cinéticos se pueden escribir como:

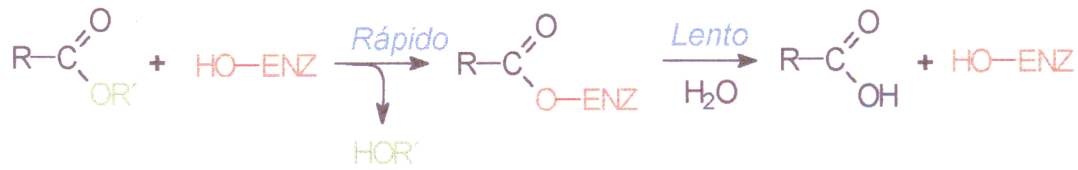
$$k_{cat} = k_3$$

$$K_m = (k_3/k_2)$$

Para explicar la influencia del alcohol en el proceso se ha realizado hidrólisis de diferentes ésteres de N-acetil-*L*-fenilalanina (R = Metilo, Etilo, o p-nitrofenilo) (88), analizando los valores de k_{cat} para cada uno de ellos, observándose que eran similares, lo que indica que el paso limitante del proceso, por analogía con la hidrólisis del acetato de p-nitrofenilo, debería ser la descomposición del complejo N-acetil-*L*-fenilalanina- α -quimotripsina.

De todos estos datos se deduce que la hidrólisis de ésteres tiene lugar a través de la formación rápida de un intermedio cuya ruptura es el paso limitante de la velocidad de

reacción (90, 91, 92). Así pues, la hidrólisis de ésteres puede visualizarse como:



Esquema 9.- Hidrólisis de ésteres.

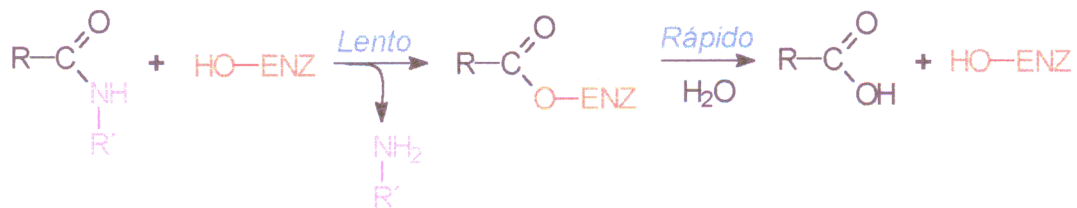
b) Hidrólisis de amidas

En este caso, la formación del complejo acil-enzima es el paso limitante, lo que ha podido deducirse a través de experimentos de equilibrio y cinéticos realizados por diversos autores (93-96). La técnica empleada para medir los parámetros cinéticos es similar a la empleada para los ésteres (97). Según estos datos, la constante de formación de dicho intermedio es más pequeña que la constante de velocidad de deacilación. Además la concentración del complejo acil-enzima debe ser muy pequeña, por lo que puede aplicarse el principio del estado estacionario.

$$k_{\text{cat}} = k_2$$

$$K_m = k_1$$

Por lo tanto, la hidrólisis de amidas puede visualizarse como:

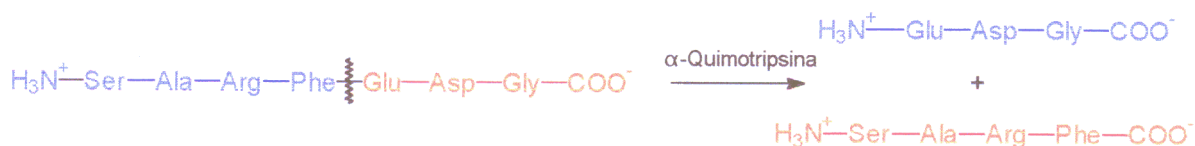


Esquema 10.- Hidrólisis de amidas.

I.3.4.- SELECTIVIDAD DE LA α -QUIMOTRIPSINA

I.3.4.1.- Sustratos específicos

Las proteínas y polipéptidos ingeridos en la dieta alimenticia son los sustratos naturales y fisiológicos de la α -quimotripsina, y sobre ellos actúa como una endopeptidasa con una amplia, aunque fácilmente definible, especificidad. Esta enzima produce la ruptura de los enlaces unidos a residuos aromáticos (y más lentamente, en residuos hidrofóbicos). Por tanto, se romperán enlaces peptídicos donde intervengan con su grupo carboxilo: Phe, Tyr, Trp (33, 96) y en un proceso que requiere un mayor período de incubación; His (97), Leu (97, 98), Met (99), Ala y Gly (100), siendo la hidrólisis de los ésteres de esta última 100 veces más lenta que la de los ésteres de Ala.



Esquema 11.-Representación de la ruptura de un enlace peptídico, a nivel de un aminoácido aromático llevada a cabo por la α -quimotripsina.

Esto hace que se considere a la α -quimotripsina como una proteasa que actúa sobre aminoácidos hidrofóbicos, cuando estos participan en el enlace amido con su grupo carboxílico. La cadena lateral del sustrato no precisa la presencia de un grupo aromático, ya que se ha comprobado que al sustituir el anillo de benceno de la fenilalanina por un resto ciclohexilo la velocidad de hidrólisis no varía apreciablemente (100, 101). Estos resultados son consecuentes con la información que se tiene acerca de la forma y la naturaleza hidrofóbica de la zona de unión de los sustratos a la α -quimotripsina.

Niemann, Cohen y cols. emprendieron un reconocimiento a gran escala de la topografía del centro activo de la α -quimotripsina (15, 102, 103). Este tema fue también tratado por Cunningham (104). A partir de estos trabajos se desarrolló el concepto de la presencia de

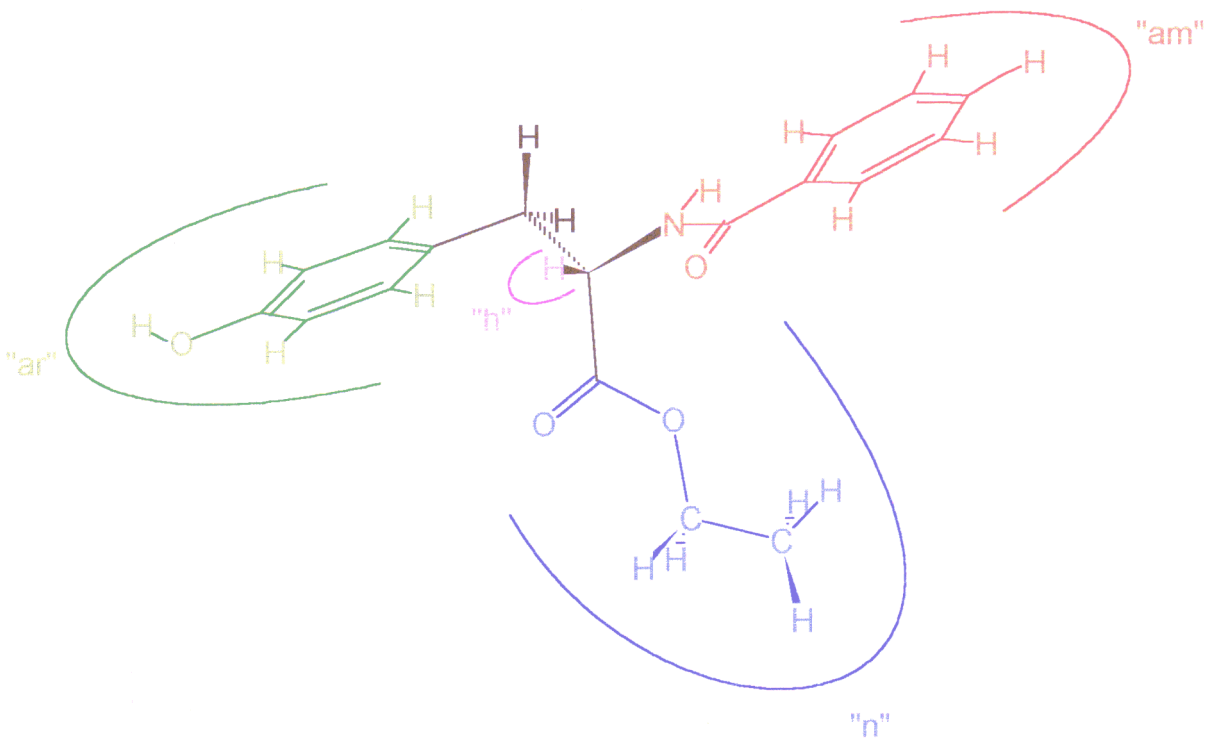
cuatro sub-centros orientados hacia los vértices de un tetraedro en el cual el carbono asimétrico es el centro (**Esquema 12**). Cohen indicó que en cada uno de esos cuatro lugares se colocaba un determinado grupo funcional:

"ar" grupo arilo

"am" grupo acilamido

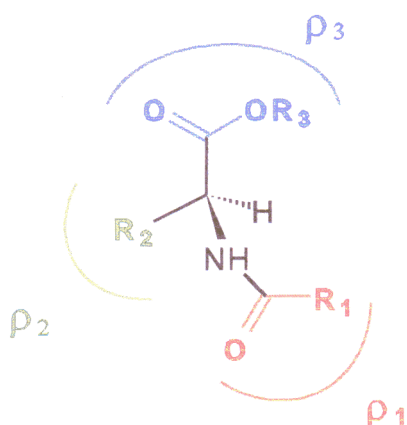
"n" lugar hidrolítico

"h" *L*-hidrógeno



Esquema 12.- Estructura del centro activo de α -quimotripsina, con el sustrato N-benzoil-L-tirosinato de etilo (BTEE) situado en él.

Existe otra nomenclatura que describe los distintos subsitios del centro activo, y empleamos para discutir la forma de unión del sustrato a la α -quimotripsina, a la cual nos referiremos al discutir la unión de sustratos no naturales al centro activo de la enzima. Así, los aminoácidos de la serie *L*, se unirían a la enzima para ser hidrolizados según el **Esquema 13** (105):



Esquema 13.- Unión de los aminoácidos de la serie *L* al centro activo de la α -quimotripsina.

Los derivados de la Tirosina-O-alkilada (106) y p-Iodo-*L*-fenilalanina (51) se hidrolizan muy lentamente. Este hecho concuerda exactamente con los resultados cristalográficos que indican que los sustratos que tienen cadenas laterales muy largas no encajan correctamente en el centro "ar" y por tanto se hidrolizarán más lentamente.

Los sustratos que llevan radicales unidos al carbono- β de la cadena lateral (Valina, Isoleucina y β,β -Dimetil-fenilalanina) se unen peor a la enzima y, por tanto, se hidrolizan más lentamente que los correspondientes sustratos no ramificados.

La metilación del carbono α tiene un fuerte efecto sobre la actividad enzimática, ya que disminuye la velocidad de hidrólisis tres órdenes de magnitud respecto a la fenilalanina, aunque no afecta apenas a la fuerza de enlace del sustrato con el enzima (106, 107).

La conformación del N-formil-*L*-triptófano observada en estudios cristalográficos indica que el hidrógeno- α está en contacto con el oxígeno carbonílico del grupo formilo (18). Esta

observación sugiere que el impedimento estérico en esta posición no permite al grupo acilamido del carbono- α alcanzar la conformación adecuada, impidiendo así que el enlace sensible al proceso de hidrólisis adopte la correcta conformación para ser hidrolizado.

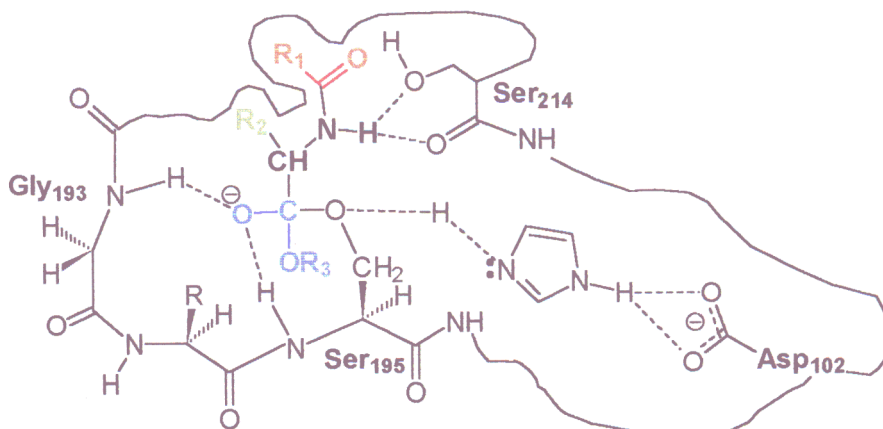
El grupo acilamido, que está unido al residuo aminoacídico específico, tiene un importante efecto sobre la reactividad de la α -quimotripsina. La sustitución de ese grupo amido -NH- por un éster (108) o por un grupo metileno (102) o incluso la presencia de un resto metilo en el citado grupo amido provocan una disminución en la reactividad y en la estereoespecificidad de la α -quimotripsina (102, 106, 109). Ingles y Knowles (50) demostraron que el aumento de la reactividad de los sustratos con grupo amido no era debido a que se unieran más fuertemente a la enzima, sino que era el resultado de una orientación más favorable de estos sustratos específicos. Estos autores demostraron que la energía de la interacción enzima-acilamido era similar a la del enlace de hidrógeno y sugirieron que esa energía de enlace era compensada forzando al sustrato a una configuración de alta energía.

Mediante estudios cristalográficos se ha visto que el grupo amido del N-formil-*L*-triptófano está orientado de tal forma que puede establecer un enlace de hidrógeno con el grupo carbonilo de la Ser₂₁₄ (18). Si el resto aromático de un sustrato específico está unido firmemente al centro "ar", entonces la función acilamido podría evitar la rotación alrededor del enlace α - β del residuo aminoacídico, y así el enlace que va a ser hidrolizado adoptaría la orientación adecuada para la actuación hidrolítica de la enzima.

Los resultados cristalográficos sobre la unión de sustratos a la α -quimotripsina son confusos debido a la interacción con Tyr₁₄₆ de una molécula de agua adyacente al entorno de la zona de interacción del acilamido. Por ello, los datos de Rayos X no dan evidencia acerca de la adquisición de una conformación de alta energía por parte del sustrato, si bien tampoco la excluyen de la unión.

Norin y cols. (110) empleando la metodología de la Mecánica Molecular (M.M.) han postulado semicuantitativamente la estereoquímica de los sustratos susceptibles de hidrólisis de ésteres catalizada por α -quimotripsina. Estos autores proponen un esquema del estado de transición más detallado que el indicado por Hansch y cols (111) para explicar la enantiopreferencia observada, analizando las interacciones de los grupos que rodean al centro

estereogénico y los diversos aminoácidos del centro activo de la enzima. Este modelo aparece representado en el siguiente esquema:

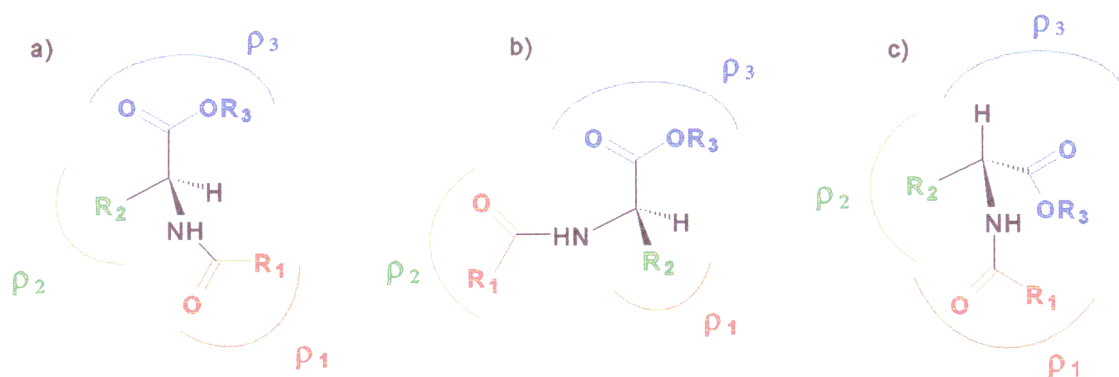


Esquema 14.- Estereoquímica de los sustratos susceptibles de hidrólisis de ésteres catalizada por α -quimotripsina, según el modelo de Norin *y cols.*

La α -quimotripsina presenta estereopreferencia por los aminoácidos de la serie *L* (112, 113). La hidrólisis, catalizada por α -quimotripsina, del éster etílico de la N-acetil-*D*-fenilalanina es del orden de 10^6 - 10^7 veces más lenta que la de su correspondiente isómero *L* (115). En los derivados de N-formil-fenilalanina, la velocidad de hidrólisis del isómero *L* es 10^4 veces mayor que la del isómero *D* (105). Los estereoisómeros *D* se comportan como inhibidores competitivos; además, los isómeros *D* se unen ligeramente peor a la enzima que los correspondientes isómeros *L* (114, 115). Niemann sugirió que los sustratos *D* se unirían de forma normal a los lugares de enlace "ar" y "n" de la enzima, pero la unión por los lugares del grupo acilamido y el hidrógeno- α serían anormales (105). La lenta hidrólisis de esos sustratos *D* se explicaría basándose en la importancia de esas dos interacciones para la actividad hidrolítica. Cohen sugirió que el hidrógeno- α ocupa el subsitio "h" en el centro activo y esto provoca que la cadena lateral de los estereoisómeros *D* de los sustratos naturales se coloque en el lugar "ar" provocando que los centros hidrolítico y aminoacilo (116) no tengan los grupos funcionales que le son propios.

Los intentos de unir sustratos *D* análogos al centro activo de cristales de α -quimotripsina han sido un fracaso, quizá debido a la inestabilidad de los cristales.

Se ha propuesto una forma alternativa de enlace que parece ser más probable. Los lugares "ar" y "am" estarían ocupados por el grupo arilo y el amido; y el hidrógeno- α estaría apuntando hacia la Ser₁₉₅ y el enlace éster o amido hacia la parte externa de la molécula. La forma sugerida por Niemann anteriormente, con el lugar "ar" ocupado y con el grupo éster o amido correctamente orientado para la hidrólisis parece ser posible en el caso de los compuestos *D* (15). Esta particular conformación podría ser extraña debido a la no influencia de la orientación del grupo amido, pero estos resultados estructurales no indican que la acilación de los sustratos *D* sea imposible, aunque los dos efectos mencionados podrían hacer que tuviera lugar lentamente. Hansch y cols. (111), han postulado, después de un concienzudo estudio Q.S.A.R sobre las hidrólisis de ésteres de aminoácidos *D* y *L* los requerimientos geométricos que se necesita para que el éster interaccione con la α -quimotripsina, en estado nativo, como sustrato o inhibidor.



Esquema 15.- Disposición de los sustratos, aminoácidos de las series *D* (a) y *L* (b), y de un inhibidor (c), en el centro activo de la α -quimotripsina.

Las cinéticas de hidrólisis del N-acetil-(*D,L*)-triptófano de p-nitrofenilo indican que los donadores de acilo reaccionan con la Ser₁₉₅ rápidamente para dar un complejo N-acetil-(*D,L*)-triptófano-enzima, siendo el complejo *D*-acilenzima el que se hidróliza más lentamente (117). Este aspecto de la estereoespecificidad se ha cuantificado mediante el estudio de las

velocidades de deacilación de los complejos (*D* y *L*)-acil- α -quimotripsina procedentes del proceso de hidrólisis de los ésteres de p-nitrofenilo de algunos aminoácidos naturales (118).

La velocidad de deacilación del complejo acil-enzima depende directamente de la fuerza de enlace de la cadena lateral del aminoácido, aumentando en la serie *L* y disminuyendo en la serie *D*. Las diferencias de velocidad observadas para la deacilación de los distintos aminoácidos de la serie *L* dependen fundamentalmente de factores entrópicos (119).

El valor obtenido en el proceso de hidrólisis de los derivados del *L*-triptófano implica que la orientación es casi perfecta para la deacilación del complejo acil-enzima por el agua (51).

I.4.- SÍNTESIS DE PÉPTIDOS CATALIZADA POR ENZIMAS

I.4.1.- PROTEASAS EN LA SÍNTESIS DE PÉPTIDOS: LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS

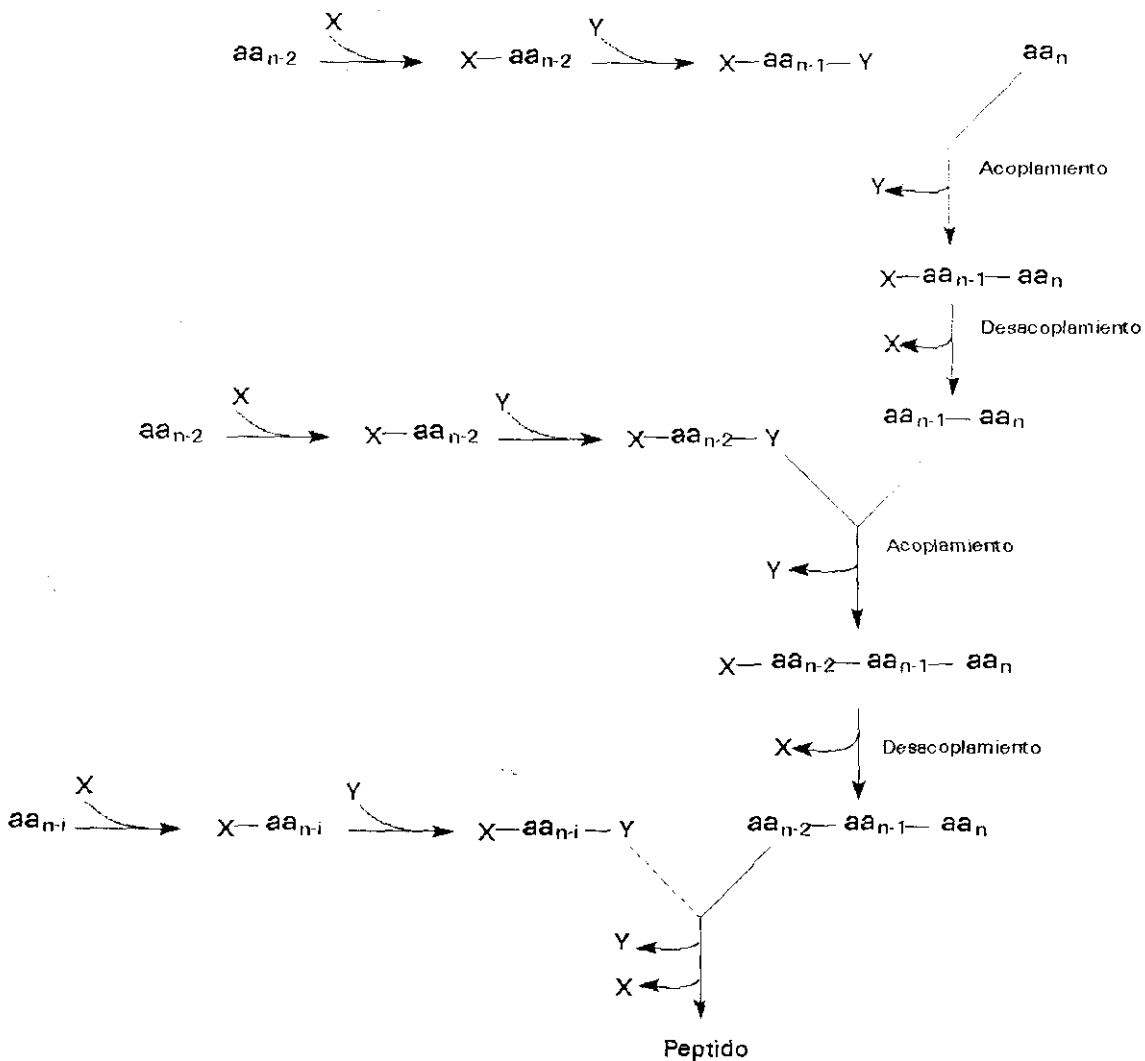
Los péptidos son polímeros de aminoácidos de pequeño peso molecular (desde 2 hasta 100 residuos aminoacídicos), que presentan una enorme versatilidad funcional. Estos pueden: estimular o inhibir la liberación de hormonas, actuar como edulcorantes, toxinas, agentes quimiotácticos, factores de crecimiento, analgésicos, neurotransmisores, etc. (120). El interés por el estudio y síntesis de péptidos ha ido paralelo con la velocidad con que se van descubriendo nuevos péptidos biológicamente activos. Así mientras en una revisión publicada en 1953 "Naturally Occurring Peptides" (121), se presentan las estructuras conocidas de solamente seis péptidos, hoy día la cifra es del orden de millares de péptidos conocidos.

Recomendamos al lector el excelente trabajo de revisión bibliográfica recientemente publicado por Vulfson *y cols.*, en el cual se citan innumerables ejemplos de péptidos biológicamente activos (122).

La variedad de propiedades biológicas de los péptidos hace que la síntesis, tanto de péptidos naturales, como de análogos sintéticos, tenga un enorme interés y diferentes campos de aplicación. Un ejemplo de ello sería el uso de péptidos sintéticos como agentes terapéuticos, v. g., los análogos sintéticos de hormonas peptídicas, que podrían tener nuevas e importantes

propiedades farmacológicas: mayor potencia de acción, diferente especificidad biológica, mayor estabilidad, etc.

La automatización de la metodología de síntesis de péptidos en fase sólida descrita por Merrifield (123) ha permitido en la actualidad obtener péptidos mediante un proceso sencillo y automatizado, el cual aparece reflejado en el **Esquema 21**.



Esquema 21.- Síntesis en fase sólida, X e Y son reactivos de protección y activación respectivamente

No obstante, este proceso presenta algunas desventajas frente a otros métodos de síntesis de péptidos, como se puede observar en la **Tabla 7**, en la que se comparan entre sí los diferentes métodos de inmovilización.

Tabla 7.- Comparación de los diferentes métodos empleados actualmente en la síntesis de péptidos (122).

Condiciones generales	Síntesis química en fase sólida	Síntesis química en fase líquida	Síntesis enzimática	Ingeniería Genética
Escala típica	mg., dg. ó g.	g., kg. ó tonel.	g., kg. ó tonel.	g., kg. ó tonel.
Longitud del péptido	de medio a largo	de corto a medio	corto	largo y proteínas
Limitaciones de la secuencia	ninguna	ninguna	alguna ¹	ninguna
Protecciones	global	parcial o global	minima	ninguna
Coste de sustratos y reactivos	muy caro	caro	relativamente barato	barato
Condiciones de reacción	peligroso ²	peligroso ²	suave/no peligroso	suave
Racemizaciones	algunas	algunas	ninguna	ninguna
Pureza ³	muy elevada	elevada	media/elevada	baja/media
Estado de desarrollo	bien establecido	bien establecido	avanzado	comenzando
Aplicaciones	restringida a investigación	muy empleada en investigación e industria	algunos usos industriales	muy empleada en investigación e industria
Futuras perspectivas	debido a su elevado coste, se emplea para obtener productos farmacéuticos de elevado valor	péptidos cortos o medios de uso farmacéutico con elevado valor	Alimentos y productos farmacéuticos de medio a alto valor, atractiva para la producción de aditivos alimentarios	método ideal para péptidos largos y proteínas

¹ Problemas en la unión de aminoácidos tales como prolina e hidroxiprolina.

² La naturaleza tóxica de los reactivos empleados tanto para las protecciones y desprotecciones hace que este método sea peligroso para la salud.

³ Rendimiento de la secuencia deseada.

Numerosos son los procesos de síntesis peptídica catalizados por α -quimotripsina como demuestra la **Tabla 8**, en la cual se resumen algunos procesos catalizados por proteasas.

Tabla 8.- Ejemplos de síntesis de péptidos biológicamente activos, empleando proteasas (122).

Péptido	Secuencia	Síntesis	Enzimas ¹
Aspartamo	Asp-Phe	Total	Tl
Kiotorfina	Tyr-Arg	Total	α -CT
edulcorante de lisina	Phe-Lys	Total	α -CT
Péptido nutricional	Tyr-Trp-Val	Total	α -CT, Pa
γ -MSH de bovino (9-12) ²	His-Phe-Arg-Trp	Total	α -CT, Tl, Tr
γ -MSH de bovino (13-16) ²	Asp-Arg-Phe-Gly	Total	α -CT, CY, Tr
Leu-encefalina	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu	Total	α -CT, Pa
2-D-Ala, 5-D-Leu-encefalina	Tyr-D-Ala-Gly-Phe-D-Leu	Parcial	α -CT, Tl
Dinorfina (1-8)	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile	Total	α -CT, Pa, Tr
Colecistoquinina (26-33)	Asp-Tyr-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe	Parcial	α -CT, Pa, Tl
FCE de ratón ³	His-Ile-Glu-Ser-Leu-Asp-Ser-Tyr-Thr-Cys	Parcial	Cp, CY, Tr, V8
Antígeno de Hepatitis B (122-129)	Arg-Thr-Cys-Met-Thr-Thr-Ala-Gln	Total	CY, Pa, Tr
Somatostatina ⁴	(-Ala-Gly-Cys-Lys-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys-)	Parcial	α -CT, Tl, Tr

¹ Abreviaturas: Cp, quimopapaina; α -CT, α -quimotripsina; CY, carboxipeptidasa Y ciclica; Pa, papaina; Tl, termolisina; Tr, tripsina; V8, proteasa V8.

² Fragmento de la hormona γ -melanocito estimulante.

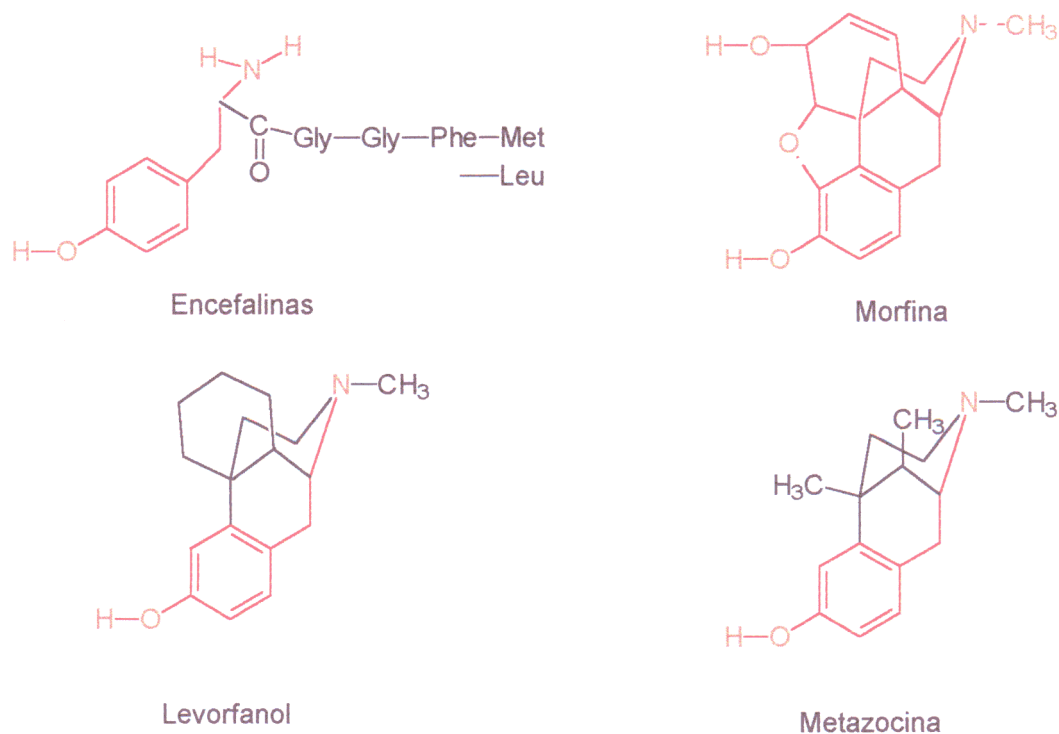
³ Fragmento del factor de crecimiento epicraneal de ratón.

⁴ Péptido cíclico unido a Ala-Cys.

Actualmente, muchos autores emplean dipéptidos modificados; como precursores de productos cíclicos con interés terapéutico (con grupos funcionales o radicales que no aparecen

habitualmente en estos aminoácidos) y requieren un manejo especial, para mantener inalterados ciertos residuos, para lo cual la especificidad de las enzimas facilitaría enormemente el proceso (124).

Otro ejemplo en el que la síntesis de péptidos catalizada por proteasas resulta interesante, es la obtención de péptidos opióides (kitorfina, encefalinas, endorfinas etc.) (125), los cuales presentan una gran similitud morfológica con fármacos opiáceos, como se demuestra en la **Esquema 22**:



Esquema 22.- Semejanzas entre las estructuras de péptidos opióides y fármacos opiáceos.

Así, pequeños cambios en estas moléculas pueden causar grandes alteraciones en actividad, llegando incluso a la obtención de inhibidores (**Tabla 9**), por lo cual el empleo de enzimas específicas, que no modifiquen los grupos funcionales de los aminoácidos o de sus derivados, resulta realmente atractivo (126).

Tabla 9.- Potencia relativa de varios péptidos y derivados respecto a la Met-enkefalina (126).

Estructura	Vaso deferente	Ileón de Cobaya
Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu	8.3	1.8
I-Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu	0.6	0.5
I ₂ -Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu	0.02	0.2
Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Met-NH ₂	3.8	7.7
Tyr-D-Met-Gly-Phe-Leu-OMe	2.9	0.06
Tyr-D-Met-Gly-Phe-Leu-NH ₂	3.6	2.7
Tyr-D-Met-Gly-Phe-Pro-NH ₂	0.9	0.02
N-Me-Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-NH ₂	6.4	0.01
N-Me-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-NH ₂	0.8	4.8
Tyr-D-Ala-Gly-Δ ¹ -Phe-Met-NH ₂	—	8.6

Pero donde la síntesis de péptidos catalizada por enzimas resulta realmente interesante es en procesos de tipo convergente, en los que dos péptidos se unen para originar otro de mayor tamaño, como muestra la **Tabla 10**.

Tabla 10.- Ejemplos de semisíntesis y modificación de proteínas empleando proteasas (122).

Péptido/proteína	Condensación/modificación	Enzima ¹
Ribonucleasa A bovina	(1-19)-Ala + Ser-(22-124)	Su
Nucleasa de estafilococo	(6-48)-Lys + Gly-(51-149)	Tr
Citocromo C equino	(1-37)-Arg + Lys-(40-104)	Cp
Somatotropina humana	(1-133)-Arg + Thr-(136-191)	Tr
Análogo de insulina humana	(Des-B23-B30)-Arg + Gly-(B23-B30)	Tr
(F-His ¹²)-(F-His ¹¹⁹) y (F-His ^{12,119})-RNasa ²	(1-20) + (21-51) + (52-63) + (64-76) + (77-97) + (98-115) + (116-124) ³	Sl
Insulina humana	(B30-Ala)-insulina porcina a (B30-Thr)-insulina humana	Ap
Hemoglobina-(Gly ^{α142})	Hb-Arg(141) a Hb-Arg(141)-Gly-NH ₂ (142)	Tr
FRHC(1-29)NH ₂ ⁴	FRHC(1-28)-Ala a FRHC(1-28)-Arg	CY

¹ Abreviaturas: Ap, proteasa de *Acromobacter*; Cp, quimopapaína; carboxipeptidasa Y cíclica; SI, subtiligasa; Su, subtilisina; Tr, tripsina.

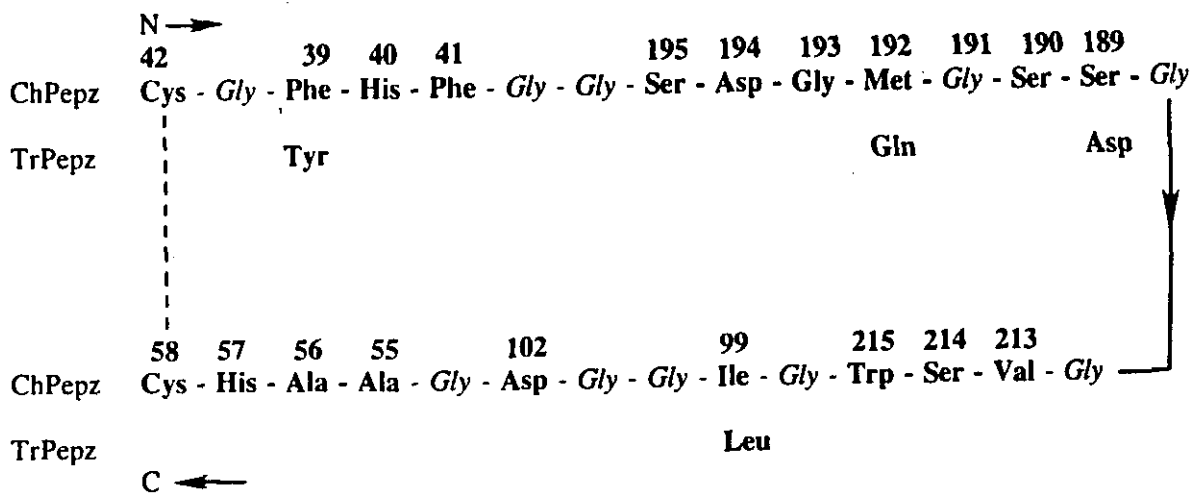
² Ribonucleasa A con residuos de histidina reemplazados por 4-fluor-histidina (F-His).

³ Condensaciones llevadas a cabo desde C terminal a N terminal.

⁴ Factor regulador de la hormona del crecimiento.

Finalmente, los recientes estudios basados en el conocimiento del centro activo de muchos biocatalizadores, así como la aparición de nuevas moléculas, augura un prometedor futuro a la catálisis con enzimas.

Dentro de esta línea destacan los trabajos de B. W. Matthews y cols. (127), los cuales han llevado a cabo síntesis de dos oligopéptidos cíclicos de 29 aminoácidos con actividad catalítica semejante a la α -quimotripsina o a la tripsina. Para ello, estos autores han demostrado que basta con modificar 4 aminoácidos (Esquema 23).



Esquema 23.- Representación de oligopéptidos, con actividad similar a la α -quimotripsina (ChPepz) y a la tripsina (TrPepz) (127).

1.4.2.- MECANISMOS DE SÍNTESIS DE PÉPTIDOS

Durante los últimos años han aparecido en la bibliografía muchos trabajos en los que se demuestra que las proteasas, cuya misión *in vivo* es la hidrólisis de péptidos, pueden utilizarse para catalizar el proceso inverso (síntesis de péptidos) (128-132). Esta metodología tiene interés práctico en el caso de la síntesis convergente de péptidos (133) o bien si se emplean aminoácidos funcionalizados, situaciones éstas en que la síntesis en fase sólida tipo Merrifield (123) tiene severas limitaciones.

Actualmente se emplean numerosas proteasas en la síntesis de hormonas peptídicas (134), neuropéptidos (135), edulcorantes tales como el aspartamo (136) y algunas otras proteínas como las que se emplean en la semisíntesis de la insulina humana (122).

Las proteasas pueden catalizar la síntesis de péptidos por dos metodologías diferentes:

- 1) Síntesis cinéticamente controlada.
- 2) Síntesis termodinámicamente controlada.

Estos dos procesos aparecen reflejados en la **Figura 9**.

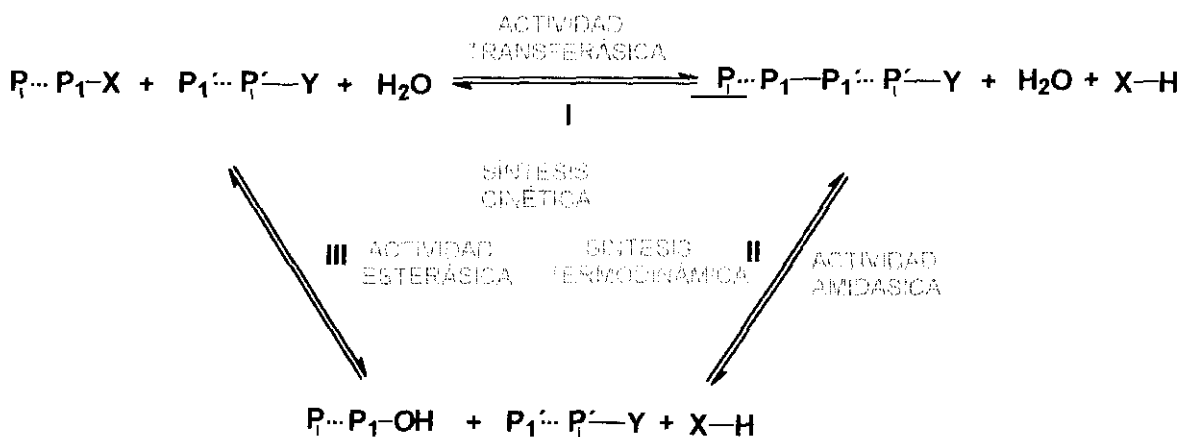


Figura 9.- Síntesis del péptido $\text{P}_1 \dots \text{P}_1 \text{-P}'_1 \dots \text{P}'_1 \text{-Y}$ por ambas metodologías: Síntesis cinéticamente controlada (I+II+III) y síntesis termodinámicamente controlada (II).

El proceso cinéticamente controlado (I-III) intenta mimetizar a la naturaleza y requiere la presencia de un donador de acilo activado, generalmente en forma de éster (péptido o aminoácido), el cual transfiere un grupo acilo a otro sustrato que actúa como nucleófilo (aminoácido o péptido) (reacción I). En esta reacción, la proteasa actúa como transferasa. Compitiendo con esta reacción está la hidrólisis del éster (reacción III). El péptido producto también puede ser sustrato de la enzima y puede hidrolizarse (reacción II). El rendimiento total de la reacción depende entonces de la relación entre las constantes aparentes de velocidad transferásica e hidrolítica $(k_T/k_H)_{app.}$, y la velocidad con la que el producto es hidrolizado. Cuando la relación $(k_T/k_H)_{app.}$ es elevada, el producto $P_1 \dots P_i - P'_1 \dots P'_i - Y$ puede obtenerse con altos rendimientos incluso a pesar de que los productos $P_1 \dots P_i - OH$ y $P'_1 \dots P'_i - Y$ sean los termodinámicamente estables. Es por ello por lo que esta metodología se conoce también como "modelo cinético" ó de "no equilibrio", y conduce a los máximos rendimientos en péptido a cortos tiempos de reacción.

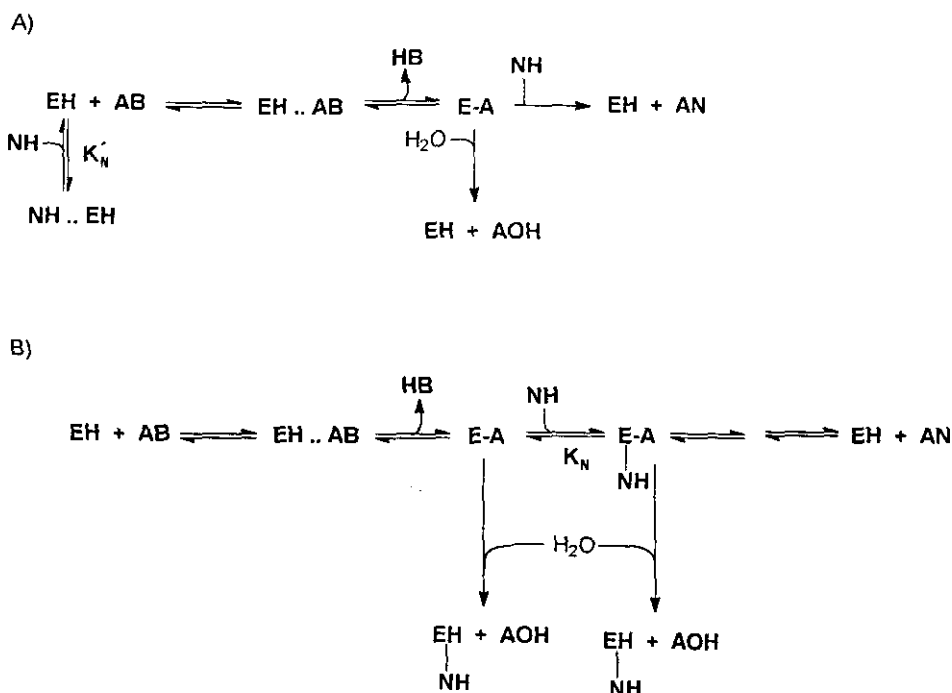
Esta formación de péptido en ausencia de equilibrio de concentraciones requiere de sustratos activados; por el contrario, el proceso termodinámico se consigue por reacción directa del ácido (molécula donadora de acilo, $P_1 \dots P_i - OH$) y el nucleófilo ($P'_1 \dots P'_i - Y$, reacción II). En este caso la proteasa actúa como una verdadera "péptido sintetasa" deteniéndose el proceso cuando se alcanza el equilibrio entre los moles de péptido sintetizados e hidrolizados; aunque la enzima no interviene en el equilibrio, influye en la reacción aumentando la velocidad con la cual éste se establece (Figura 9, reacción II).

Centrándonos en el proceso cinéticamente controlado, diremos que para que una proteasa pueda utilizarse como catalizador de este proceso se necesita que la relación entre las constantes de velocidad transferásica e hidrolítica $(k_T/k_H)_{app.}$, sea superior a 1000 (137). Estos valores tan elevados son necesarios para minimizar la transferencia del grupo acilo a la molécula de agua (hidrólisis), a bajas concentraciones de péptido ($< 10^{-3}$). Esto solamente lo cumplen las proteasas que forman un intermedio covalente acil-enzima y por lo tanto, son las que pueden ser usadas para catalizar una síntesis de péptidos cinéticamente controlada.

I.4.2.1.- Síntesis cinéticamente controlada (S.C.C.)

Existen dos mecanismos para las reacciones de condensación catalizadas por serin-proteasas, los cuales han sido ampliamente estudiados por Riechman y Kasche (138-140). El primero (**Esquema 16-A**) precisa la adsorción del nucleófilo (NH) en el centro activo antes de que tenga lugar la formación del complejo acil-enzima (EA). Según este mecanismo, la velocidad de síntesis de péptido será siempre proporcional a la concentración de nucleófilo que actúa como reactivo y activador enzimático.

En el otro mecanismo (**Esquema 16-B**), la adsorción del nucleófilo tiene lugar una vez formado el complejo acil-enzima (EA) (141, 142). El producto de condensación deseado sólo puede formarse a partir de este complejo ternario. Este mecanismo implica dos intermedios reactivos enzima-sustrato (E-A y E(NH-A)) capaces ambos de reaccionar con el agua.



Esquema 16.- Posibles mecanismos para la semisíntesis de péptidos catalizada por serin-proteasas. Símbolos, EH, enzima; AB, donador de acilo; HB, grupo saliente, alcohol; E-A acil-enzima; NH nucleófilo; AOH, producto de hidrólisis; AN producto de condensación; K_N , constante de equilibrio de unión del nucleófilo al complejo acil-enzima y K_N' constante de equilibrio de unión del nucleófilo a la enzima.

En este tipo de mecanismos el rendimiento viene controlado por tres factores:

a) Porcentaje de moléculas de enzima que tengan el nucleófilo adsorbido en el centro activo. Dependen de la afinidad de la enzima por el nucleófilo y de la concentración de este.

b) Posibilidad de que el nucleófilo sea capaz de superar al agua en su afinidad por el complejo acil-enzima

c) Velocidad de hidrólisis del péptido formado, pues en este tipo de síntesis los rendimientos máximos son transitorios, ya que los productos formados son termodinámicamente inestables.

Por tanto, los máximos rendimientos se conseguirán cuando la relación de las constantes aparentes de velocidad transferásica/hidrolítica $(k_T/k_H)_{app}$ sea lo más alta posible y cuanto menor sea la velocidad de hidrólisis del péptido formado. Las variables que influyen en la interacción enzima-sustrato deben jugar un papel fundamental en el curso de la reacción y en el rendimiento del producto de síntesis.

Según el valor relativo de la velocidad de síntesis (V_{AN}) y de hidrólisis del péptido formado tenemos dos interacciones extremas:

1) Cuando la velocidad de síntesis (V_{AN}) es similar a la velocidad de hidrólisis del péptido formado.

La expresión que nos da el máximo rendimiento en péptido $[AN]_{max}$ para este caso sería:

$$[AN]_{max} = \frac{(k_T/k_H)_{app} \times [NH]}{[H_2O] + (k_T/k_H)_{app} \times [NH]} \times \frac{(k_{cat}/k_m)_{AB,NH}}{(k_{cat}/k_m)_{AN,NH}} \times [AB] \quad [3]$$

Donde $[NH]$ es la concentración de nucleófilo y $[AB]$ es la concentración de donador de acilo.

La expresión [3] se puede simplificar para este caso 1) de la siguiente manera [4]:

$$[AN]_{max} = \alpha \times \beta \times [AB] \times [NH] \quad [4]$$

Donde α depende de $(k_T/k_H)_{app}$ y de la constante de equilibrio de unión del nucleófilo (NH) al complejo acil-enzima (K_N), β depende de las propiedades del donador de acilo activado, y de la concentración de producto final en presencia del nucleófilo. El valor de $(k_T/k_H)_{app}$ puede determinarse a partir del cociente de velocidades transferásica (V_{AN}) e

hidrolítica (V_{AOH}) [5]:

$$\frac{V_{AN}}{V_{AOH}} = \left(\frac{k_T}{k_H}\right)_{app} \times \frac{[NH]}{[H_2O]} \quad [5]$$

El análisis de estas ecuaciones (143, 144) ha permitido definir una constante "p" que nos proporciona una medida de la máxima cantidad de péptido que se puede obtener en un proceso cinéticamente controlado catalizado por una transferasa en presencia de un nucleófilo, y que también equivale a la cantidad de nucleófilo a la cual la velocidad de síntesis (V_{AN}) se iguala con la de hidrólisis (V_{AOH}).

$$p = \left(\frac{k_T}{k_H}\right)_{app} \times [H_2O] = \frac{V_{AOH}}{V_{AN}} \times [NH] \quad [6]$$

Este parametro también representa la concentración de nucleófilo a la cual ambas velocidades se igualan (145).

Ejemplos típicos son los procesos de acilación de 6-APA y 7-ACA catalizados por penicilin G acilasa (146) o la acilación de hidratos de carbono (142).

II) Cuando la velocidad de síntesis (V_{AN}) es mucho mayor que la de hidrólisis del péptido formado. Esto sucede en la síntesis de péptidos (138, 141, 147), con ésteres como donadores de acilo activados y con proteasas de una relación de constantes de velocidad $(k_T/k_H)_{app}$, elevada. Para $[NH]_0$ (concentración inicial de nucleófilo) $\gg [AN]_{max}$, el contenido de nucleófilo y la relación $(k_T/k_H)_{app}$, son practicamente constantes durante la síntesis. Por lo tanto la expresión para $[AN]_{max}$ se transforma en:

$$[AN]_{max} = \frac{[AB]_0 \times [NH]_0}{[H_2O] \times (k_T/k_H) + [NH]_0} \quad [7]$$

A diferencia de lo que sucede en el primer caso, el rendimiento máximo no depende de β (Ecuación [4]). En ambos casos el rendimiento máximo no depende de la cantidad de enzima añadida, la cual sólo influye en el tiempo requerido para alcanzar el máximo de conversión (137, 139).

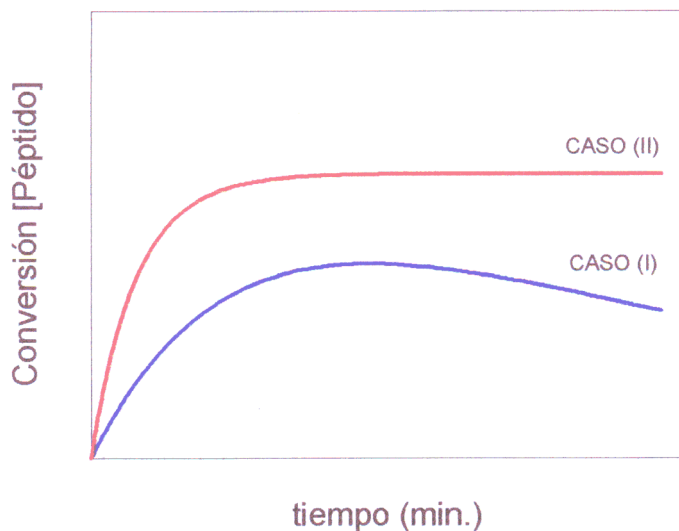


Figura 10.- Variación de la concentración de [AN] a lo largo de la reacción para los casos (I) cuando la velocidad de síntesis es del mismo orden que la de hidrólisis del péptido formado y caso (II) cuando la velocidad de hidrólisis del péptido formado es mucho menor que la de síntesis.

Por último, según el medio de reacción tenemos dos metodologías para llevar a cabo la síntesis cinéticamente controlada:

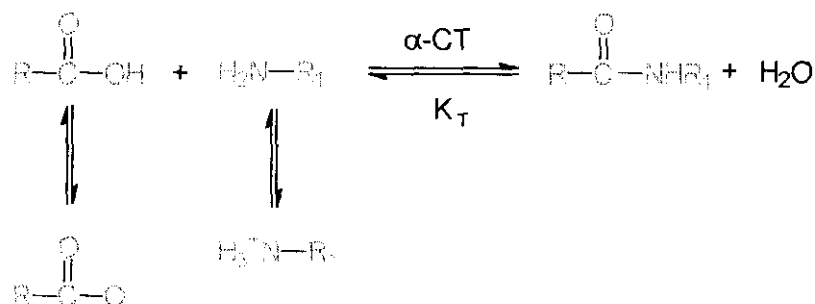
- 1) Si se emplean disolventes miscibles con agua estamos en **condiciones monofásicas**.
 - 2) Si se emplean disolventes inmiscibles con agua tenemos las **condiciones bifásicas**.
- Las particularidades de una y otra metodología se discutirán más adelante.

I.4.2.2.- Síntesis termodinámicamente controlada (S.T.C.)

La síntesis termodinámicamente controlada en sistemas monofásicos con mezclas agua-codisolvente orgánico o en sistemas bifásicos es, en principio, la estrategia más sencilla para sintetizar enlaces peptídicos con proteasas debido a que: (a) es una reacción directa entre el ácido carboxílico (donador de acilo) y el nucleófilo (grupo amino); (b) la activación del donador de acilo es innecesaria, lo cual abarata el proceso; (c) el producto de la reacción es estable; (d) la purificación del producto es más fácil que en la S.C.C., ya que hay un

componente menos.

En la bibliografía hay pocos estudios sistemáticos sobre esta estrategia (137, 148, 149). De forma simple, el esquema de esta aproximación sintética puede ser representado de la siguiente forma:



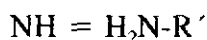
Esquema 17.- Mecanismo de la Síntesis Termodinámicamente Controlada

Podemos observar que tan sólo las formas no iónicas del ácido (AOH) y el nucleófilo (NH) están implicadas en la reacción de síntesis. Como ya hemos comentado, la enzima no influye en el rendimiento obtenido, si no que este es función de la constante de equilibrio termodinámico, K_T . La enzima, por tanto, sólo disminuye el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio.

Evidentemente, el agua es un componente no deseado si se pretende desplazar el equilibrio en el sentido de la síntesis. Es por ello por lo que se suele trabajar a bajas concentraciones de agua en el medio:

$$\frac{K_T}{a_w} = \frac{[AN]}{[AOH] \times [NH]} \quad [8]$$

donde:



De esta forma, la constante de equilibrio termodinámico deberá englobar un término dependiente de la concentración de agua, a_w .

A partir de esta ecuación, la concentración de péptido en el equilibrio puede ser también representada como una función de la concentración total del ácido y amina, tal y como indica la ecuación [9]:

$$[AN] = K_f \times K_{no-ion} \times \frac{[AOH] \times [NH]}{[H_2O]} \quad [9]$$

donde el rendimiento final es función de K_{no-ion} , que es la razón entre el producto de las concentraciones de las formas no ionizadas de nucleófilo [NH] y de donador de acilo [AOH] en el equilibrio y el producto de las concentraciones totales del ácido y la amina. Evidentemente, la proporción relativa de las formas ionizadas y sin ionizar depende del pH, de la constante dieléctrica del medio, etc. Por ello, el rendimiento dependerá del pH, de los pKs de los grupos amino y ácido, de la fuerza iónica, de la naturaleza del tampón, de la temperatura, del disolvente y de la cantidad de agua presente en la reacción.

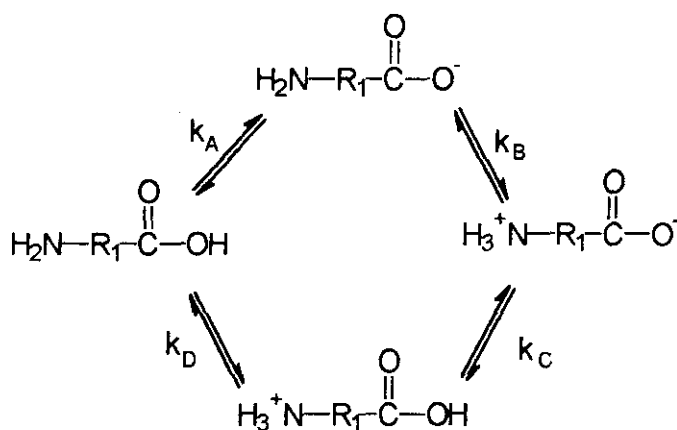
I.4.3.- FACTORES QUE INFLUYEN EN EL RENDIMIENTO DE LA SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE UN ENLACE PEPTÍDICO

I.4.3.1.- Importancia del pH

a) Síntesis termodinámicamente controlada

A la vista de la ecuación [9], los rendimientos máximos se conseguirán para un valor de pH comprendido entre el pKa del ácido y el pKa del nucleófilo. El valor máximo de K_{no-ion} se alcanza cuando la diferencia de pKs entre el grupo amino y el ácido es mínima (Esquema 18):

Una forma de disminuir la diferencia de pKa entre los dos sustratos consiste en proteger tanto el amino del aminoácido que actúa de donador de acilo como el carboxilo del aminoácido que actúa de nucleófilo, utilizando para tal protección grupos hidrofóbicos y apolares. De esta forma se disminuye la influencia mutua de los grupos amino y ácido a través del efecto inductivo. La forma más común es acetilar el grupo amino lo que se traduce en un aumento del pKa del ácido, y amidificar el grupo carboxílico, lo cual disminuye la basicidad del grupo amino.



Esquema 18.- Equilibrio entre las formas iónicas y no iónicas de los sustratos

El ejemplo más clásico es el caso de la glicina (Tabla 4):

Tabla 4.- Variación de los pKa, empleando grupos protectores y disolventes (150).

Aminoácidos	pKa (ácido)	pKa (amino)	ΔpKa
Glicina	2.35	9.8	7.4
N-Acetil-glicina/ H_2O	3.6	8.2	4.6
N-Acetil-glicina en (80% DMSO)	6.9	8.1	1.2

Por otro lado, la introducción de estructuras apolares en la molécula favorece su solubilidad en medios orgánico-acuosos, los cuales, al tener una constante dieléctrica menor que el agua, desfavorecen la ionización de $-\text{COOH}$ y $-\text{NH}_2$, aumentándose los $(\text{pKa})_{\text{app}}$ de ambos grupos, tal y como se indica en la **Tabla 4** para la glicina en un medio con un 80% de DMSO (151).

Según el disolvente sea o no miscible en agua hay que diferenciar: S.T.C. en sistemas monofásicos (152, 153) y S.T.C. en sistemas bifásicos con bajo contenido en agua (154-156) cuyas peculiaridades comentaremos al hablar del papel de los disolventes en el proceso.

b) Síntesis cinéticamente controlada

En este tipo de reacciones, el donador de acilo generalmente tiene el grupo carboxilo activado en forma de éster, y su grupo amino está protegido (benzoilado, acetilado, etc.) y el nucleófilo presenta su grupo carboxilo bloqueado en forma de amida, por tanto, sólo el grupo amino del nucleófilo es el que nos va a condicionar el pH óptimo de trabajo, el cual debe ser superior al pKa del grupo amino de nucleófilo (157); no obstante, no interesa que el pH sea demasiado elevado ya que se incrementa la concentración de grupos OH^- , los cuales compiten con el grupo amino del nucleófilo por el complejo acil-enzima causando un descenso en la relación $(k_T/k_H)_{\text{app}}$, con lo cual disminuye el rendimiento final en péptido.

Así, algunos de los factores que habrá que tener en cuenta a la hora de diseñar ensayos de este tipo serían: la naturaleza de los sustratos, la enzima empleada, (ya que muchas se desnaturalizan a pHs elevados, p.e. penicilin amidasa), y la naturaleza de las especies del tampón (p. e., el Tris puede actuar como nucleófilo compitiendo con el aminoácido cuando el pH es superior a 8 (149, 158), aunque por el contrario, otros autores como Mattiasson y cols han conseguido muy buenos resultados con esta base (159)). Para concluir, podemos afirmar que el pH ideal para este tipo de reacciones está comprendido entre 8-10.

1.4.3.2.- Influencia de la temperatura

a) Síntesis termodinámicamente controlada

Teniendo en cuenta que la reacción entre aminoácidos no cargados para la formación de un enlace peptídico es endotérmica (143) podríamos afirmar que al aumentar la temperatura se elevaría el rendimiento. No obstante, debemos tener en cuenta en este planteamiento teórico que muchos catalizadores se desnaturalizan cuando incrementamos la temperatura; por lo tanto, no podemos generalizar ni extrapolar de un sistema a otro.

b) Síntesis cinéticamente controlada

No existen muchos trabajos al respecto (137, 160), aunque algunos autores afirman que la temperatura óptima es inferior a 20 °C (139), Mattiasson y cols (161, 162), han descrito un aumento en el rendimiento en péptido debido a un aumento en la relación $(k_T/k_H)_{app}$, debido a un acusado descenso de k_H aparente, cuando se trabaja a temperaturas inferiores a 0 °C. De igual forma Ullmann y cols. (163) también describen recientemente la síntesis de di y tripéptidos empleando α -quimotripsina, tripsina o papaína en sistemas a 0 °C, obteniéndose éstos con altos rendimientos, y con una minimización en los problemas derivados de los procesos de aislamiento y purificación. Sin embargo otros autores aseguran que un incremento en la temperatura también causa un aumento en el rendimiento en péptido al incrementarse k_T .

1.4.3.3.- Influencia de la fuerza iónica

a) Síntesis termodinámicamente controlada

Un aumento de la fuerza iónica estabilizaría los iones libres, causando un descenso en la constante de equilibrio k_T , al desestabilizar las formas no ionizadas, que son las reactivas. Se ha observado que el pKa del grupo carboxilo desciende mientras que el del grupo amino se mantiene constante o aumenta con la fuerza iónica, lo cual dificulta el proceso al aumentar el ΔpKa . En el caso de productos solubles en H₂O obtenidos por condensación, incrementando la fuerza iónica disminuimos el rendimiento final, ya que el péptido obtenido es más difícil de aislar y purificar.

b) Síntesis cinéticamente controlada

En todos los casos, la fuerza iónica influye en la unión del nucleófilo al centro activo de la enzima, el cual puede estar cargado, por lo que, cuando las cargas implicadas sean opuestas, un aumento en la fuerza iónica estabilizaría estas, disminuyendo la atracción entre el nucleófilo y el centro activo y por lo tanto el rendimiento (137). En cambio, si las cargas que presentan el nucleófilo y el subsitio de unión al centro activo son iguales (como sucede en la síntesis de péptidos) un aumento en la fuerza iónica causaría un incremento en el rendimiento final a péptido.

1.4.3.4.-Influencia del disolvente

De todos los parámetros que caracterizan a un disolvente orgánico: coeficiente de solubilidad de Hildebrand (δ), la constante dieléctrica (ϵ), el momento dipolar (μ) o el coeficiente de partición P (en el sistema n-octanol/agua), etc., éste último es el que ejerce una mayor influencia en la actividad catalítica de la enzima (164). Así, se ha podido comprobar como la actividad enzimática es baja en disolventes con un $\log P < 2$, moderada si $2 < \log P < 4$, y alta si el $\log P > 4$. Aquellos disolventes con un $\log P$ mayor de 4, no alteran *la capa de agua esencial* situada alrededor del biocatalizador, con lo que este permanece activo. Por el contrario, estos disolventes con elevado coeficiente de partición reducen notoriamente la solubilidad de muchos de los sustratos, por lo que su empleo en reacciones biocatalíticas no se puede generalizar.

La naturaleza del disolvente orgánico afecta a la estabilidad y actividad enzimática por tres vías:

a) Inhibiendo o inactivando la enzima, por interacción directa con ella, ya que el disolvente orgánico puede distorsionar los puentes de hidrógeno y las interacciones hidrófobas que mantienen la estructura proteica, provocando una disminución de su actividad y estabilidad (165).

b) Los disolventes orgánicos pueden interaccionar con sustratos o con productos de la reacción. Por ejemplo, el cloroformo provoca una significativa disminución de la actividad

catalítica de la peroxidasa durante la reacción de oxidación de fenoles (166).

c) El disolvente orgánico puede interaccionar con el agua esencial que rodea a las enzimas, provocando la alteración de su conformación activa. Como comentamos anteriormente la interacción entre el disolvente y el agua esencial de la enzima es directamente proporcional a la polaridad del disolvente. Así, los disolventes de mayor $\log P$ son los que menos afectan a la actividad de las enzimas (167).

a) Síntesis termodinámicamente controlada

En general se ha observado que la presencia de disolventes orgánicos disminuyen las constantes de disociación, aumentando la constante de equilibrio y por lo tanto también el rendimiento final en péptido (137, 168).

b) Síntesis cinéticamente controlada

En un principio, el empleo de disolventes hidrófilos en medios con una cierta cantidad de agua reduciría las reacciones de hidrólisis aumentando el rendimiento final en péptido, por lo que la adición de disolventes con un $\log P$ bajo mejoraría la síntesis del péptido (como sucede para el caso I), empleando DMF (160, 169, 170)). Por otro lado, el catalizador necesita de una pequeña cantidad de agua para realizar su actividad (monocapa de hidratación), de manera que si ésta es capturada por el disolvente o por el soporte (en caso de que la proteína esté inmovilizada), no se observaría reacción; en consonancia con estas afirmaciones, Reslow y cols. definieron el concepto de acuofilia del cual, hablaremos más ampliamente en otro apartado. Así, numerosos autores han llevado a cabo ensayos en los que se mide la actividad de agua óptima para cada reacción biocatalítica (171-173).

Con respecto a la naturaleza del disolvente conviene comentar que los disolventes de mayor $\log P$ son los menos perjudiciales para la enzima (174). Por otro lado, no parece recomendable el empleo de alcoholes como disolventes debido a la aparición reacciones de transesterificación (158, 175).

I.4.3.4.1.- Influencia de la naturaleza del disolvente.

Centrándonos ahora en el caso de la resolución de ésteres (1^{er} paso de la síntesis cinéticamente controlada) diremos que ésta es sensible a la naturaleza del disolvente, en especial en el caso de trabajar con disolventes hidroxílicos o inmiscibles con agua, tal y como se ve en la **Tabla 5**, para el caso de la resolución del éster racémico de la tirosina (175).

De la **Tabla 5** se deduce que hay que emplear disolventes apróticos (acetonitrilo, acetona, etc.), en vez de alcoholes o DMF, que interaccionan con la proteína o conducen a procesos de interesterificación.

I.4.3.5.- Importancia del agua en las reacciones biocatalizadas en un medio orgánico

Si bien las reacciones catalizadas por enzimas se comenzaron a estudiar en agua, cada día se ha impuesto de forma progresiva el empleo de medios orgánicos ligeramente hidratados. Ello se debe a que las enzimas en estos disolventes miscibles en agua son menos sensibles a la desactivación que en medios acuosos. Esto se ha explicado porque la enzima está cinéticamente atrapada en su estado nativo y activo, en parte debido a la baja constante dieléctrica del medio, potenciándose así las uniones electrostáticas que rigidifican la molécula (176), como se ha comprobado por medidas de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) (177).

Otra propiedad que se ve muy afectada es la especificidad del biocatalizador (164b,.178). En esta línea se ha descrito la alteración de la especificidad por sustrato en la metanolisis y en la hidrólisis de aminoácidos N-sustituídos, catalizada por α -quimotripsina, en la aminolisis de ésteres catalizada por subtilisina en diferentes medios (179), etc. Este hecho se ha atribuido a la variación de la relación k_{cat}/K_m (164b), por efecto de la solvatación del biocatalizador, de los reactivos y del complejo acil-enzima.

Asimismo, Klibanov y cols han descrito la variación de la enantioselectividad de la subtilisina *Calsberg* en la síntesis de péptidos con *L* y *D* aminoácidos (180, 181). Estos efectos se explican en la misma línea del razonamiento anterior, ya que ambos enantiómeros se solvatan de forma diferente según la geometría del disolvente. En este sentido Arroyo y

Sinisterra (182) han demostrado como el disolvente afecta a la resolución de (*R,S*) ketoprofeno vía esterificación enantioselectiva catalizada por la lipasa de *C. antarctica* al emplear (+) ó (-) carvona como disolvente.

Tabla 5.- Resolución del éster etílico de la (*D,L*)-tirosina (50 mM), empleando α -quimotripsina (10 μ M), disolvente/agua (9/1), volumen total= 20 ml, T=30 °C (175).

Disolvente	Rendimiento	e.e./%	<i>E</i>
Metanol	0	--	--
Etanol	34	96	80
1-Propanol	46	89	39
2-Propanol	41	85	22
1-Butanol	20	95	49
2-Metil-i-propanol	13	> 99	> 230
2-Butanol	42	96	102
2-Metil-2-propanol	39	83	18
1-pentanol	38	93	49
3-Metil-1-butanol	41	92	46
2-Metil-2-butanol	41	82	18
Tetrahidrofurano	49	> 99	> 752
1.4-Dioxano	49	95	126
Acetonitrilo	48	> 99	> 646
Acetona	50	> 99	> 1060
DMF ^b	32	92	37
DMA ^b	41	> 99	> 412

^b 50 % de agua.

La presencia del agua es fundamental en la actividad catalítica de las enzimas, ya que ayuda a mantener la conformación activa mediante interacciones de tipo no covalente, interacciones no electrostáticas, enlaces de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals (183). Al sustituir el agua por un disolvente orgánico se produce, en principio, una distorsión de la estructura proteica con la consiguiente pérdida de actividad enzimática. De hecho ninguna enzima sería capaz de mantenerse activa en un disolvente totalmente anhidro si no fuera por

la presencia de una mínima cantidad de agua. De esta forma, una enzima en un medio orgánico se puede mantener completamente hidratada y activa mediante la adición de un pequeño volumen de agua, el cual previene la posible alteración que pueda provocar el medio orgánico de reacción en el microentorno de la proteína. En este principio se basa la catálisis enzimática en medios prácticamente anhidros, tema que ha merecido el interés de muchos investigadores y la organización de varios congresos internacionales (184).

Es obvio que la presencia de agua es necesaria para la catálisis enzimática; lo que no parece tan claro es la cantidad mínima que requiere una enzima para mantenerse activa. Por ejemplo son suficientes únicamente 50 moléculas de agua por una de enzima para que la α -quimotripsina sea activa en octano (185). En el caso de otras enzimas hidrolíticas como la subtilisina o lipasas también es necesaria una cantidad mínima de agua (186-188). Pero para otras enzimas es fundamental un gran nivel de hidratación; como ejemplos nos encontramos la peroxidasa de rábano que dobla su actividad con un 0.25 % (v/v) de tampón en tolueno respecto a un 0.025 % (189); y la polifenol oxidasa, que necesita aproximadamente un 0.5 % (v/v) de agua (3.5×10^7 moléculas de agua por molécula de enzima) para ser activa en cloroformo (190). Entre el primer caso y este último existe una gran variación en cuanto a la cantidad de agua presente en el medio necesaria para la actividad de las enzimas mencionadas. Por tanto, esta magnitud no es del todo satisfactoria para controlar la actividad de la enzima en medios orgánicos ligeramente hidratados. Un método más correcto es relacionar la actividad catalítica con la cantidad de agua *disponible* por la enzima en un disolvente orgánico. De aquí surge la necesidad de recurrir al concepto de **actividad de agua (a_w)**, que parece ser el parámetro que mejor describe la distribución del agua en sistemas multifásicos (191).

I.4.3.5.1.- Actividad de agua: definición.

Si suponemos un sistema cerrado en el que una fase gaseosa húmeda se encuentra en equilibrio con una fase líquida, también húmeda, podemos definir la actividad de agua (a_w) de la fase líquida a una temperatura dada como [10]:

$$a_w = \frac{f_w}{f_w^\circ} \quad [10]$$

donde f_w es la fugacidad del agua de la mezcla a la temperatura de equilibrio, y f_w° es la fugacidad del agua pura a la misma temperatura.

Si la concentración del agua en el sistema es pequeña (como sucede en los procesos biocatalizados en medios orgánicos ligeramente hidratados) y se trabaja a bajas presiones (p. e. a presión ambiental a 1 atm), se puede suponer que el vapor de agua se comporta como un gas ideal, y podemos sustituir la fugacidad por la presión de vapor [11]:

$$a_w = \frac{P_w}{P_w^\circ} \quad [11]$$

La presión de vapor del agua pura en estas condiciones se considera igual a la unidad.

La ecuación transformada y expresada en tanto por ciento se define como *Humedad Relativa en Equilibrio* (HRE) [12].

$$HRE = P_w \times 100 = a_w \times 100 \quad [12]$$

1.4.3.5.2.- Isotermas de adsorción

En la práctica la actividad de agua (a_w) se determina introduciendo la muestra en una cámara de medida cerrada, a temperatura constante y con un volumen lo más pequeño posible. Pasado un tiempo, se alcanza el equilibrio entre la humedad del aire de la cámara y la de la muestra. Esta humedad relativa del aire en la cámara de medida corresponde a P_w y si consideramos $P_w^\circ = 1$ obtenemos el valor de a_w a partir de [11].

La forma más común de representar estos datos, es una curva que nos de la variación de la cantidad de agua añadida (g. de agua/g. de muestra) frente a la a_w . Según las medidas sean efectuadas durante la deshidratación de la muestra desorción o en el curso de la rehidratación de la misma adsorción o resorción) se obtendrán dos curvas, que no tienen porqué coincidir (fenómeno de histéresis).

Una isoterma de adsorción se divide en tres zonas:

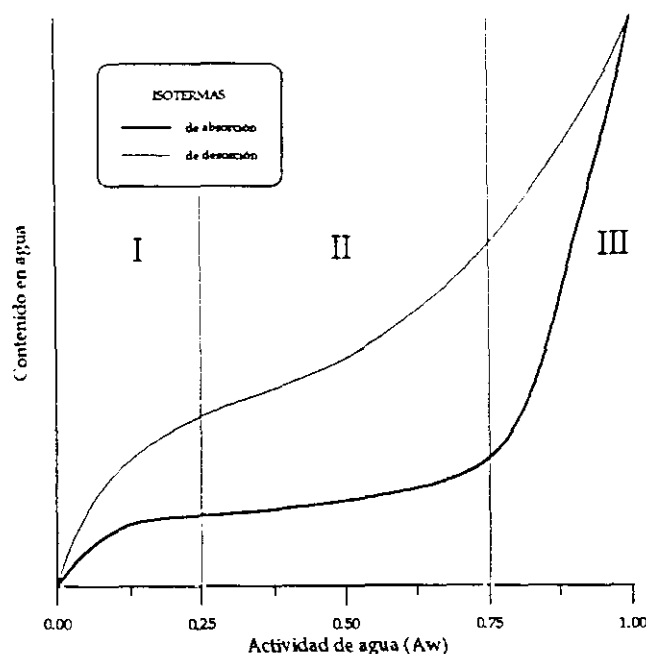


Figura 11.- Isoterma teórica de adsorción-desorción

Zona I. El agua presente en esta zona de la isoterma es el agua más fuertemente unida y más inmóvil, por lo que para el caso de las proteínas correspondería al agua de cristalización. Este agua está unida a zonas polares de la proteína por interacciones agua-ión o agua-dipolo. La entalpía de vaporización de este agua es mucho mayor que la del agua pura y no puede congelarse a -40°C . El límite de las zonas I y II corresponde al contenido de humedad "monocapa". Por "monocapa" se entiende no la cobertura de toda la materia seca por una capa simple de moléculas de agua densamente empaquetadas, sino que se trata de la cantidad de agua necesaria para formar una simple capa de moléculas de agua "monocapa" sobre los grupos altamente polares de la materia seca.

Zona II. El agua añadida en la zona II ocupa los restantes sitios de la primera capa y varias capas adicionales (agua en multicapa). La entalpía de vaporización del agua en multicapa es ligera o moderadamente mayor que la del agua pura.

Zona III. El agua de la zona III es la que menos fuertemente ligada y más móvil (molecularmente) y se denomina "agua de la fase masiva". Tiene una entalpía de vaporización igual que la del agua pura, por lo que se trata de agua congelable.

I.4.3.5.3.- Competencia por el agua en un sistema biocatalítico

La disponibilidad del agua alrededor de las moléculas activas de enzima depende de la presencia de elementos en el sistema que pueden competir por el agua, según sea su afinidad por la misma, tales como: los disolventes orgánicos, los reactivos, los aditivos y los soportes.

1) Disolventes: los disolventes compiten con la enzima por el agua. Según su polaridad, estos disolventes podrán solubilizar mayor (polares) o menor (apolares) cantidad de agua, y todo ello redundará en la actividad catalítica de la enzima. Esta capacidad de captación de agua por parte del disolvente se verá reflejada en su isoterma de adsorción. Peter Halling pudo comprobar la similitud de las isotermas de las proteínas en aire y en disolventes de diferente polaridad hasta un valor de a_w próximo a 0.5 (192). De este descubrimiento se deduce que el disolvente no influye en el agua fuertemente ligada a la enzima, la cual suele corresponder con el agua que queda después de la liofilización.

2) Reactivos: la naturaleza y la concentración de los sustratos pueden alterar la distribución del agua en el sistema. Una concentración elevada de alcohol (193) o de ácido (194) en una reacción de esterificación catalizada por enzimas puede provocar una disminución drástica de la actividad enzimática debido al aumento de la capacidad de la fase orgánica para solubilizar agua, y por lo tanto de sustraerla del biocatalizador. Se pueden fijar unas condiciones óptimas de a_w en el medio que permitan compatibilizar una elevada concentración de reactivos con una actividad enzimática interesante.

3) Aditivos: las sales pueden competir por el agua con la enzima (195). De la misma forma los azúcares presentes en muchos preparados comerciales de enzimas son capaces de captar agua (171, 196, 197), por lo que algunos autores han observado desplazamientos de las

curvas de adsorción de agua empleando sorbitol como aditivo (171). Compuestos similares al agua (glicerol y glicoles (198), la N,N-dimetilformamida (199) y el dimetilsulfóxido (200)) son capaces de alterar la actividad enzimática. La adición de estos compuestos produce un incremento en la actividad de muchos biocatalizadores en medios orgánicos con a_w baja, pues actúan como miméticos del agua.

4) **Soportes:** Reslow demostró claramente en 1988 como la naturaleza del material que soportaba la enzima inmovilizada era capaz de influir en la actividad catalítica (201). La causa de este comportamiento era la *acuofilia* del soporte, definida como la capacidad de éste de retener agua en un sistema que emplea como disolvente orgánico diisopropiléter. Estudios análogos (194, 202) demostraron que los soportes hidrofóbicos favorecen la actividad catalítica frente a los soportes de tipo hidrofílico. De todas formas, ni la capacidad del soporte para adsorber agua, ni su contenido en agua pueden pronosticar una actividad determinada en una reacción biocatalizada.

En el equilibrio, la a_w será la misma en todas las fases del sistema, incluyendo el soporte donde la enzima se encuentra inmovilizada. Controlando el valor de a_w del sistema, se ha podido comprobar que el perfil actividad enzimática/ a_w es prácticamente el mismo en la mayoría de los soportes empleados (203-206).

I.4.3.5.4.- Influencia de la cantidad de agua en la resolución de mezclas racémicas.

La cantidad de agua presente en la reacción para la resolución enantioselectiva del éster étflico de la (D,L)-tirosina, catalizada por α -quimotripsina resultó ser fundamental para diferentes disolventes como se refleja en la **Figura 12** (175):

Los rendimientos obtenidos difieren de un disolvente a otro, según aumenta la cantidad de agua, pero el exceso enantiomérico sigue el mismo comportamiento en todos los disolventes, disminuyendo cuando el porcentaje de agua presente en la reacción es elevado, aunque el rendimiento sea muy alto, debido a una hidrólisis química indiscriminada de ambos esteroisómeros, frente a una hidrólisis enzimática mucho más selectiva hacia el isómero L. Esta

tiene lugar con menores porcentajes de agua, y controlada por ciertos residuos del centro activo, variando la enantiopreferencia de los catalizadores enzimáticos.

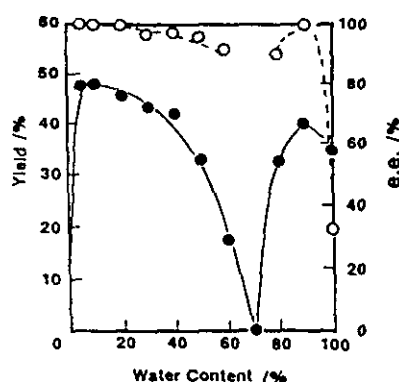


Fig. 1. Resolution of DL-tyrosine ethyl ester in acetonitrile-water. DL-Tyrosine ethyl ester 50 mM, CT 10 μ M, 30°C, 24 h. O: e.e.; ●: yield.

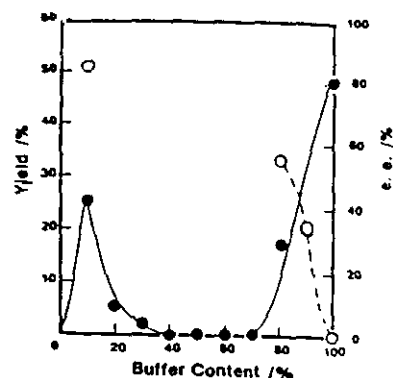


Fig. 2. Resolution of DL-tyrosine ethyl ester in acetonitrile-aqueous phosphate buffer (0.1 M, pH 8.0). DL-Tyrosine ethyl ester 50 mM, CT 10 μ M, 30°C, 24 h. O: e.e.; ●: yield.

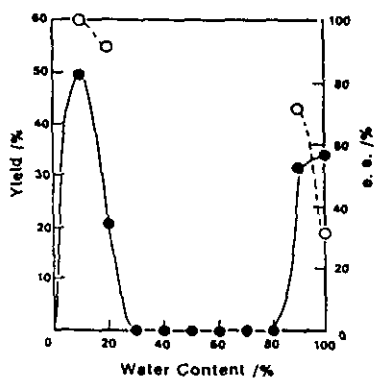


Fig. 3. Resolution of DL-tyrosine ethyl ester in THF-water. DL-Tyrosine ethyl ester 50 mM, CT 10 μ M, 30°C, 24 h. O: e.e.; ●: yield.

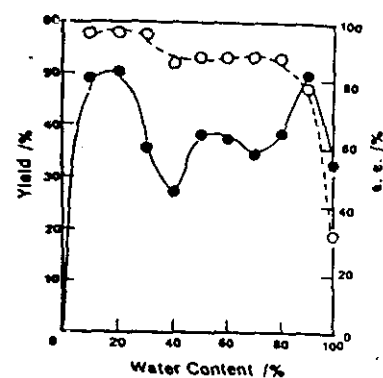


Fig. 4. Resolution of DL-tyrosine ethyl ester in 1,4-dioxane-water. DL-Tyrosine ethyl ester 50 mM, CT 10 μ M, 30°C, 24 h. O: e.e.; ●: yield.

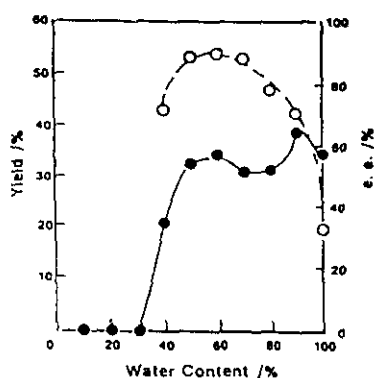


Fig. 5. Resolution of DL-tyrosine ethyl ester in DMF-water. DL-Tyrosine ethyl ester 50 mM, CT 10 μ M, 30°C, 24 h. O: e.e.; ●: yield.

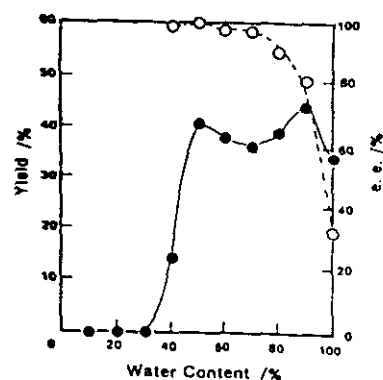


Fig. 6. Resolution of DL-tyrosine ethyl ester in DMA-water. DL-Tyrosine ethyl ester 50 mM, CT 10 μ M, 30°C, 24 h. O: e.e.; ●: yield.

Figura 12.- Importancia del porcentaje de agua en la hidrólisis del éster de la (D,L)-tirosina, empleando diferentes disolventes orgánicos, tomada del artículo (175).

I.4.4.- ASPECTOS EXPERIMENTALES DE LA SÍNTESIS DE PÉPTIDOS CATALIZADA POR ENZIMAS

I.4.4.1.- Las enzimas: pureza y purificación

Generalmente los preparados comerciales de proteasas son impuros, ya que pueden contener diferentes formas de una misma proteasa (α y β -tripsina) y/u otras proteasas impurificando la preparación. En el primer caso, en el que existan varias formas de la misma enzima, estas influyen en el rendimiento del proceso cinéticamente controlado. Asimismo, la presencia de otras proteasas puede originar reacciones de hidrólisis indeseables, tanto para los reactivos como para los productos. Por lo tanto, es fundamental en los procesos de control cinético, el trabajar con proteasas puras a fin de lograr una buena reproductibilidad.

El isoelectroenfoque sería un método rápido que conviene realizar para visualizar la pureza de la proteasa (207, 208), si bien no se han de descartar ensayos de contenido proteico y test de actividad esterásica

I.4.4.2.- Inmovilización de enzimas

La inmovilización de enzimas tiene como objetivo lograr biocatalizadores estables, reutilizables y fáciles de manejar. Existen varias metodologías que se pueden agrupar en tres tipos:

- a) Unión a un soporte (de forma covalente, por fuerzas electrostáticas o por adsorción física).
- b) Reticulado usando reactivos bi o polifuncionales.
- c) Atrapamiento en matrices, microcápsulas, liposomas, micelas reversas, etc.

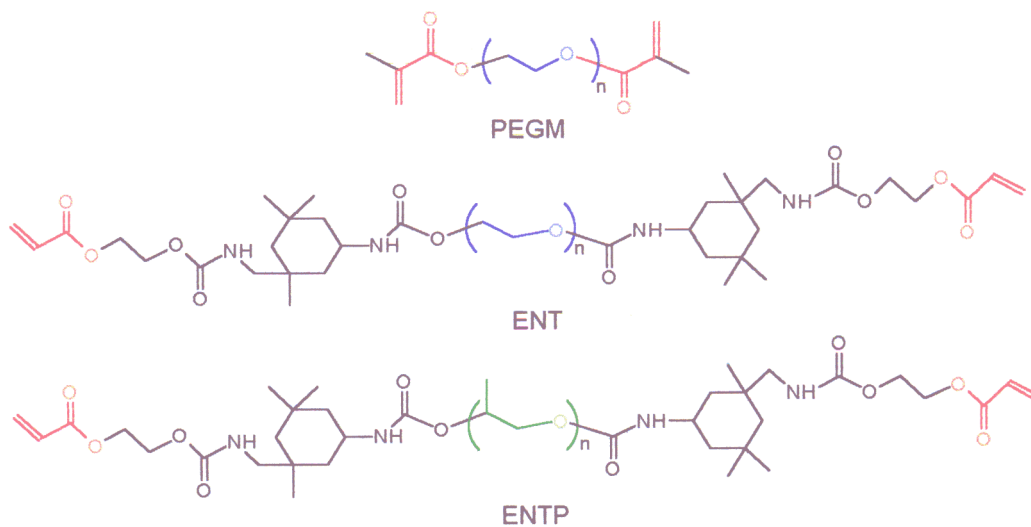
En el caso de la α -quimotripsina se han descrito diversas metodologías de inmovilización y sería prolijo detallar todas. Entre las más interesantes citaremos la inmovilización sobre geles de agarosa activados con grupos formilo (209), agarosa activada con grupos amino (210), β -ciclodextrinas (211), polimetacrilatos (212), copolimeros de estireno (213).

Asimismo, la enzima se ha adsorbido sobre sepiolita (214), etilcelulosa (215), alcohol polivinílico (216), etc. Para el lector interesado en este tema recomendamos la excelente revisión bibliográfica realizada por Mosbach (217).

Para poder analizar en profundidad el comportamiento de los sistemas inmovilizados que se emplearán en la presente Tesis Doctoral, formados por dos componentes uno hidrófobo, polietileno (PE), y otro más hidrofílico como es el metacrilato de 2'-hidroxietilo (HEMA) (218, 219), debemos exponer someramente como Fukui *y cols.* (220, 221) han solucionado los problemas de transferencia de masa empleando derivados en los que la enzima o célula se encuentra atrapada y que presentan muchas similitudes con nuestros sistemas. Así, estos autores describen 4 grandes grupos de metodologías para la inmovilización por atrapamiento:

a) Método de las resinas obtenidas por fotoentrecruzamiento

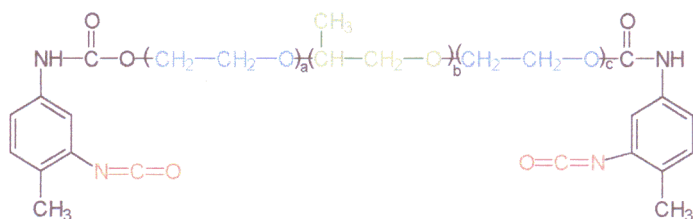
Este método se basa en la iluminación a una longitud de onda próxima al ultravioleta capaz de iniciar la polimerización del monómero, durante 3-5 minutos, para conseguir inmovilizar el catalizador en el interior del polímero, los cuales pueden presentar diferente composición, como se observa en el **Esquema 19**.



Esquema 19.- Estructuras de resinas típicas empleadas para inmovilizar biocatalizadores por fotoentrecruzamiento; PEGM (formado a partir de polietilenglicol y metacrilato), ENT (obtenido a partir de hidroxietilacrilato, isoforona, diisocianato y polietilenglicol y ENTP (igual que el anterior pero en vez de emplear polietilenglicol, se utiliza polipropilenglicol).

b) Método del uretano

Este método es más simple y útil que el anterior, ya que simplemente consiste en hacer reaccionar en una disolución acuosa de biocatalizador (durante 30-60 minutos) a grupos de isocianato terminales de una molécula de prepolímero (**Esquema 20**) con los de otra molécula de prepolímero, formando un residuo de urea y liberando dióxido de carbono, originando así una estructura reticular que inmovilice al catalizador en su interior.



Esquema 20.- Fórmula general de un prepolímero de uretano (PU).

c) Método de irradiación

Se han empleado diferentes monómeros funcionales para inmovilizar biocatalizadores por atrapamiento via γ -irradiación (que varía según el tipo de monómero), tales como: alcohol polivinílico (5-7 Mrad) (222), diacrilato de polietilenglicol (223), dimetacrilato de polietilenglicol (1 Mrad y a una temperatura de -24°C) (223, 224).

d) Entrecruzamiento de varios prepolímeros en presencia de agentes químicos

En esta ocasión la unión de varios prepolímeros se realiza a través de moléculas con varios grupos funcionales tales como glioxal, glutaraldehido, alcohol polivinílico oxidado con peryodato, dimetacrilato de polietilenglicol, etc. Así, por ejemplo, se han inmovilizado enzimas por atrapamiento, vía polimerización radicalaria de ácido acrílico y N,N-dimetilaminoetil-metacrilato en presencia de dimetacrilato de polietilenglicol como agente entrecruzante.

En todos los casos los prepolímeros pueden presentar diferente longitud en las cadenas (de polietilenglicol, polipropilenglicol etc), pudiendo obtener soportes con diferentes: tamaños de poro, pesos moleculares, propiedades físico-químicas (solubilidad, punto de fusión, etc),

y con un mayor o menor carácter apolar, el cual beneficia o dificulta, junto con el tamaño de poro, el acceso de los sustratos al centro catalítico según la polaridad de estos, como podemos observar en la **Tabla 6**:

Tabla 6.- Efecto del gel en la oxidación de esteroides y en el coeficiente de reparto entre el gel y el disolvente (220).

Entradas	Gel	Colesterol		Dehidroepiandrosterona	
		Act. Rel. (%) ^a	p ^b	Act. Rel. (%) ^a	p ^b
1	ENTP-2000	102	2.00	108	2.36
2	ENT-4000 : ENTP-2000 (15 : 85)	97	1.58	NA	NA
3	ENT-4000 : ENTP-2000 (30 : 70)	86	1.13	NA	NA
4	ENT-4000 : ENTP-2000 (70 : 30)	0	0.16	NA	NA
5	ENT-4000 : ENTP-2000 (85 : 15)	0	0.06	NA	NA
6	ENT-4000	0	0.02	77	0.31
7	PU-3	75	0.63	107	1.67
8	PU-3 : PU-6 (75 : 25)	24	0.24	96	1.48
9	PU-3 : PU-6 (50 : 50)	0	0.02	88	1.16
10	PU-3 : PU-6 (25 : 75)	0	0.03	73	0.48
11	PU-6	0	0.01	70	0.30

NA: No analizado

^a Actividad relativa del biocatalizador inmovilizado con respecto a las células libres expresada en porcentaje (enzima libre = 100%).

^b Coeficiente de partición de colesterol o dehidroepiandrosterona entre el gel y el disolvente

En esta tabla podemos observar como el coeficiente de partición de los reactivos entre el gel y el disolvente es fundamental para la actividad del catalizador. Así, los biocatalizadores inmovilizados en geles con menor coeficiente de partición son los que presentan peores actividades, (entradas 4, 5, 6, 9, 10 y 11), tanto para el colesterol como para la dehidroepiandrosterona, presentando esta segunda mayor valor de actividad relativa que el primero, al igual que sucede con su coeficiente de partición.

Si bien la inmovilización estabiliza al biocatalizador frente a los cambios del medio, añade una complicación más al estudio del proceso, ya que el soporte no es inerte y compite con la enzima por el agua del medio, lo cual es muy importante en procesos de síntesis de péptidos cinéticamente controlada en medios orgánicos ligeramente hidratados. Este punto ha sido ampliamente discutido por Reslow *y cols.* (201) introduciendo el término de acuofilia del soporte, como ya hemos comentado anteriormente.

Aun teniendo en cuenta esas complicaciones que presenta, la inmovilización de catalizadores resulta una metodología muy atractiva, ya que nos permite recuperar el catalizador y reutilizarlo en un nuevo ciclo de síntesis, consiguiendo reducir los costes del proceso como muestra la **Figura 13**.

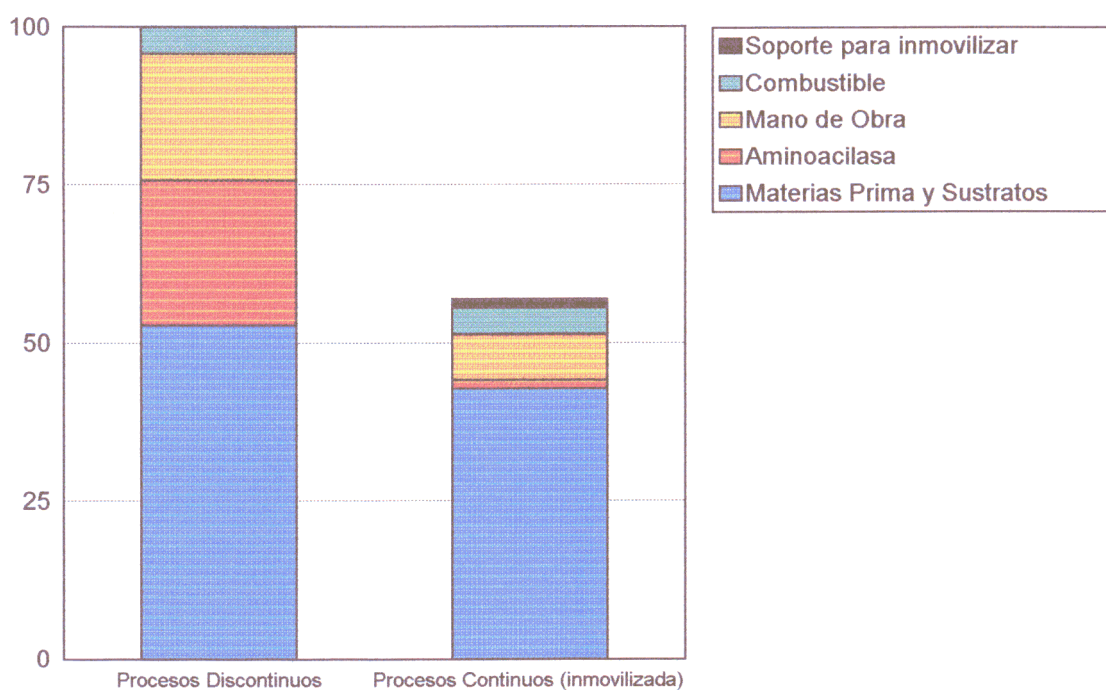


Figura 13.- Comparación de los costes de producción en la síntesis de *L*-aminoácidos, en procesos discontinuos (enzima libre) y en procesos continuos (enzima inmovilizada) (225).

I.4.4.3.- Sustratos y tampones

En general, diremos que la funcionalización de los sustratos es mucho más sencilla que en el caso de la síntesis en fase sólida tipo Merrifield o empleando métodos químicos.

En una S.T.C, conviene emplear aminoácidos que tengan protegidos los grupos funcionales que no van a estar implicados en la reacción. No obstante, dada la quimioselectividad de las proteasas, no se han de proteger los grupos de las cadenas laterales.

La situación resulta algo más complicada en el caso de la S.C.C, ya que el donador de acilo además de tener bloqueado el grupo amino (en forma de amida) también precisa que el grupo carboxilo esté activado como éster.

Con respecto a los tampones, como ya hemos comentado anteriormente, no parece influir demasiado su naturaleza.

II.- OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

II.- OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

De lo indicado en el apartado anterior, se deduce que la búsqueda de nuevos derivados de enzimas, y en especial de α -quimotripsina, es un tema de interés en Biotecnología por las muchas aplicaciones sintéticas que posee. En esta línea se han desarrollado por miembros de nuestro grupo derivados modificados químicamente de α -quimotripsina, o inmovilizados sobre agarosa, vía tosilo o vía glicidol.

No obstante, estos derivados tienen muchos problemas a la hora de ser utilizados con fines preparativos dadas sus pobres propiedades mecánicas. Es por ello por lo que se planteó la colaboración con el grupo de la Dra. Gil de la Universidad de Coimbra, a fin de obtener derivados inmovilizados de α -quimotripsina sobre copolímeros, cuyas propiedades mecánicas y su resistencia a los efectos producidos por la variación del pH, de porcentaje de medio orgánico, y de su naturaleza, los hacía candidatos idóneos para desarrollar una nueva familia de biocatalizadores de posible uso en Síntesis Orgánica. Para lograr este objetivo se ha abordado el siguiente Plan de Trabajo, en el cual hemos utilizado como término de comparación un derivado inmovilizado de α -quimotripsina suministrado por el Dr. Guisán.

II.1 PLAN DE TRABAJO

- 1) Caracterización de los derivados inmovilizados de α -quimotripsina.
- 2) Estudios de abrasión y estabilidad térmica de los derivados inmovilizados obtenidos sobre copolímeros de injerto
- 3) Optimización de la actividad transferásica del derivado α -quimotripsina-agarosa.
- 4) Optimización de la actividad transferásica del derivado α -quimotripsina-copolímeros.
- 5) Estudios de reutilización de los derivados de α -quimotripsina-copolímeros.
- 6) Estudios de quimioselectividad de los derivados inmovilizados.

III. PARTE EXPERIMENTAL

III.- PARTE EXPERIMENTAL

III.1.- ENZIMAS, SUSTRATOS Y REACTIVOS

III.1.1.- ENZIMAS

El biocatalizador empleado a lo largo de toda la Memoria ha sido la α -quimotripsina de páncreas de bovino (E. C. 3.4.21.1), tipo II, de la casa SIGMA (artículo 4129), con una actividad específica de 48 unidades/mg de sólido y 50 unidades/mg de proteína (una unidad internacional de actividad es la cantidad de proteína activa que hidroliza 1 μ mol de éster etílico de la N-benzoil-L-tirosina por minuto a pH=7.8 y a 25°C). Esta enzima se conserva en su estado de polvo liofilizado a -15°C.

III.1.2.- SUSTRATOS

Para medir la actividad de la α -quimotripsina se han empleado:

- p-Nitroanilida de la N-glutaril-L-fenilalanina (GpNA) (SIGMA).
- p-Nitroanilida de la N-benzoil-L-tirosina (BTpNA) (SIGMA).

Como donadores de acilo:

- Éster etílico de la N-benzoil-L-tirosina (BTEE) (Bz-L-Tyr-OEt) (SIGMA).
- Éster etílico de la N-acetil-L-fenilalanina (APEE) (Ac-L-Phe-OEt) (SIGMA).
- N-acetil-L-tirosina (Ac-L-Tyr-OH) (SIGMA).

Y como nucleófilos:

- Hidrocloruro de L-alaninamida (H-L-Ala-NH₂) (SIGMA).
- Hidrocloruro de L-leucinamida (H-L-Leu-NH₂) (SIGMA).
- Hidrocloruro de L-metioninamida (H-L-Met-NH₂) (SIGMA).
- Hidrocloruro de L-glicinamida (H-L-Gly-NH₂) (SIGMA).
- Hidrocloruro de L-serinamida (H-L-Ser-NH₂) (SIGMA).
- Hidrocloruro de L-aspartamida (H-L-Asp-NH₂) (SIGMA).
- Dihidrocloruro de L-argininamida (H-L-Arg-NH₂) (SIGMA).

En la determinación del número de centros activos en un preparado se empleó:

-Sultona del ácido 2'-hidroxi-5'-nitrofenil-metanosulfónico (SULTONA) (SIGMA).

Precusores de sustratos y sustratos no convencionales:

- Éster N-(4-Clorobutanoil)-L-triptofanato de metilo
- N-(3-indolilmetil)-glicinato de etilo.
- (Cis 1,3) 1-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1H-β-carbolina-3-carboxilato de metilo.
- Ácido (±) 2-fenilbutírico (ALDRICH).
- Ácido (±) 3-fenilbutírico (ALDRICH).
- Ácido (±) tetrahidrofurano-2-carboxílico (ALDRICH).
- Ácido (±) tetrahidrofurano-3-carboxílico (ALDRICH).
- Ácido (±) 1,2,3,4,-tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico (ALDRICH).
- (*R*) Mandelato de etilo (FLUKA).
- (*S*) Mandelato de etilo (FLUKA).
- (*R,S*) Mandelato de etilo (FLUKA).
- (*R,S*) Mandelato de bencilo (FLUKA).
- (*R,S*) Mandelato de isoamilo (FLUKA).

III.1.3.-DISOLVENTES

- Acetato de etilo (PANREAC) (99.8% de pureza).
- Acetonitrilo (SCHARLAU) (>99% de pureza).
- 1,4-Butanodiol (MERCK) (98% de pureza).
- Diclorometano (SCHARLAU) (>99% de pureza).
- N,N-Dimetilformamida (MERCK) (>99% de pureza).
- Etanol absoluto (MERCK) (>99% de pureza).
- Isobutilmetilcetona (MERCK) (>99% de pureza).
- Metanol (MERCK) (>99% de pureza).
- 1-Propanol (SCHARLAU) (>99% de pureza).
- Tolueno (MERCK) (>98% de pureza)
- 1,1,1-Tricloroetano (MERCK) (>99% de pureza).

III.1.4.-OTROS REACTIVOS

- Acetato sódico (PANREAC).
- Acetona (SCHARLAU).
- Ácido acético (PROBUS).
- Ácido cítrico (MERCK).
- Ácido clorhídrico 35-36% (MERCK).
- Ácido bórico (PANREAC).
- Albúmina bovina (SIGMA).
- Bicarbonato sódico (PANREAC).
- Borato sódico (PANREAC).
- Carbonato sódico (PROBUS).
- Carbonato potásico (PROBUS).
- N-Ciclohexil-N'-(2-(metilmorfolino)etil)-carbodiimida-4-tolueno-sulfonato (CMC)
(MERCK).
- Citrato sódico cristalizado dihidrato (MERCK).
- Fosfato dipotásico (MERCK).
- Fosfato disódico (PANREAC).
- Fosfato monopotásico (PANREAC).
- Fosfato monosódico monohidrato (PANREAC).
- Hidróxido sódico (MERCK).
- Metacrilato de 2'-hidroxietilo (HEMA) (Biochemical Co. Poole, Dorset, U.K.).
- Polietileno (PE), suministrado por Telcon Plastics. Ltd. U.K.
- Sulfato de cobre (II) pentahidrato (MERCK).
- Trietilamina (ALDRICH).
- Tris-(hidroximetil)-aminometano (Tris) (MERCK).
- Triton X 100 (MERCK)

Todos estos reactivos presentan la pureza de grado analítico o superior.

III.1.5.- APARATAJE EMPLEADO

- Espectrofotómetro de ultravioleta-visible Shimadzu 2100 UV. equipado con un sistema de termostatación por recircularización de agua, con cubetas de un paso óptico de 1 cm, y un volumen total de 3 ml.

-Cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC), LDC, con una columna C₈, Nucleosil 128 (LDM) (fase reversa).

-Valorador volumétrico ATI ORION AF8 (para medir la cantidad de agua, mediante el método de Karl-Fisher).

- Espectrómetro Resonancia Magnética Nuclear (RMN) BRUCKER 250 MHZ).

III.1.6.- PROGRAMAS INFORMÁTICOS

a) Programas para ajustes matemáticos. SIMFIT V. 4.0 (226).

A lo largo de esta Tesis Doctoral se ha utilizado como herramienta de cálculo el paquete integrado *SIMFIT* versión 4.0 para llevar a cabo el ajuste de los datos experimentales a determinadas ecuaciones matemáticas.

Este paquete informático, diseñado por W. G. Bardsley, escrito en lenguaje Fortran compilado y desarrollado en base a rutinas de regresión no lineal de la librería "NAG WORKSTATION", emplea algoritmos de optimización matemática por iteración con el objetivo de minimizar la función Sumatorio de Residuales (SSQ) definida mediante el método de mínimos cuadrados.

La función SSQ se define como:

$$SSQ = \sum (y_i - f(p, x_i))^2 \quad [13]$$

donde y_i es un dato experimental obtenido para la variable independiente "y", cuando la variable dependiente "x" adopta un valor " x_i ".

P son los parámetros óptimos del ajuste

Las suposiciones estadísticas en las que se basa el criterio de los mínimos cuadrados son: que la ecuación por ajustar es la correcta, el error en la respuesta es estrictamente aditivo

y los errores son independientes entre sí y siguen una distribución homocedástica (varianza constante), esto es, las medidas se han hecho con la misma precisión. Este tipo de regresión se denomina regresión sin pesos estadísticos.

No obstante la mayoría de las veces las medidas experimentales siguen una distribución heterocedástica (diferente varianza), y se hace necesario dar más importancia a los datos de menor error frente a los de mayor error. Para ello, lo que se hace es corregir los residuales con un factor llamado peso estadístico (w_i), que es inversamente proporcional a la varianza de los datos (el cuadrado de la desviación estándar).

$$W_i = \frac{1}{S_i^2} \quad [14]$$

De esta forma, la función que se optimiza se denomina sumatorio ponderado de residuales (WSSQ), que se define como:

$$WSSQ = \sum (1/S_i^2) \times (y_i - f(p, x_i))^2 \quad [15]$$

La desviación estándar en las mediciones de la variable dependiente se determina mediante réplicas. De esta forma, se le asigna a cada conjunto de medidas (y_i) su desviación estándar correspondiente, que se utiliza para ponderar el error. No obstante esta metodología es recomendable siempre que el número de réplicas obtenidas por cada valor de la variable "y" sea mayor o igual que 3. Como esto no es factible en muchas ocasiones, otra metodología que puede sugerirse consiste en determinar el error experimental promedio que tiene el método y asignar a cada punto dicho error experimental como error relativo constante; generalmente se toma como valor de dicho error el 5 %.

Como parámetros que cuantifican la bondad del ajuste, el paquete *SIMFIT* calcula el valor del coeficiente de determinación (R^2). Por otra parte, cuando se utilizan como pesos estadísticos las desviaciones típicas de los errores (o estimaciones de las mismas), la función WSSQ sigue una distribución Ji-cuadrado (χ^2) con "g" grados de libertad, siendo $g = n^\circ$ de puntos experimentales - n° de parámetros del ajuste. De esta forma, por comparación del valor de ji-cuadrado con WSSQ se puede establecer la bondad del ajuste. El programa *SIMFIT*

calcula automáticamente la probabilidad de que ji-cuadrado exceda del valor de WSSQ. Así, cuando la probabilidad de ji-cuadrado sea mayor de WSSQ es menor de 0.01 (nivel de significancia del 1 %) o menor de 0.05 (nivel de significancia del 5 %), se debería rechazar el ajuste utilizando dichos niveles de significación.

SIMFIT también permite establecer criterios de bondad de ajustes a través del estudio de los residuales, los cuales, en un óptimo deberían quedar distribuidos al azar y no deberían presentar una correlación serial significativa, por lo que el número de residuales positivos y negativos debe ser similar, y no debe haber series largas de residuales con el mismo signo, ni tampoco muy pocas series. El número de residuales positivos se designa con la letra "n", y el de residuales negativos con la letra "m" y el n° de series con "r". *SIMFIT* establece dos test acerca de las series, que deben dar una probabilidad (p) comprendida entre $\alpha/2$ y $1-\alpha/2$ ($\alpha=0.05$ ó 0.01 según el nivel de significancia con el que se trabaje). La prueba de los signos, también desarrollada por este programa, debe dar una probabilidad de $p \geq \alpha$ para poder considerar el ajuste como bueno. Un nuevo estadístico que el programa calcula es el test de Durbon-Watson, que indica la posibilidad de que exista una correlación seriada, esto es, que el signo que presente un residual venga impuesto por el signo del anterior. Normalmente, cuando el valor de dicho estadístico está comprendido entre 1.5 y 2.5 se puede descartar dicho efecto.

Es frecuente que los parámetros del ajuste deban ser distintos de cero, pues el hecho de anularse suele conllevar el que la variable respuesta "y" no dependa de alguna variable explicativa "x", que lleve consigo una simplificación del modelo debido a la desaparición funcional del mismo. Así para determinar si un parámetro puede considerarse nulo o no, éste se mide en unidades estándar, es decir, se calcula el cociente:

$$T = (\text{Valor estimado del parámetro}) / (\text{error de estándar de su estimación}) \quad [16]$$

si el valor de este cociente T esta dentro de ciertos límites que se consultan en las tablas estadísticas de la "t" de Student, considerando como grados de libertad ($g = n^o$ de puntos - n^o de parámetros) puede ser que el parámetro se anule; si por el contrario, el valor de T rebasa esos límites, entonces el valor del parámetro es distinto de cero. El programa *SIMFIT*

suministra automáticamente toda esta información mediante un parámetro de redundancia.

b) Programas de modelización molecular, *Hiperchem TM. V 3.0 for windows* (227).

Los cálculos de Mecánica y Dinámica Molecular de la estructura de los sustratos objeto de estudio en la presente Tesis Doctoral, se realizaron con el programa **HIPERCHEM**

El estudio por Dinámica Molecular se realizó a alta temperatura debido a la mayor eficacia para atravesar barreras de energía en el espacio conformacional multidimensional. Se eligió una temperatura de 100 °K como punto de partida, ya que permite a la molécula explorar un número de conformaciones separadas por barreras energéticas significativas. Para evitar el riesgo, inherente a toda simulación de Dinámica Molecular (D.M.) a alta temperatura de que la estructura encontrada corresponda a un mínimo local de alta energía se realizaron con cada uno de los conformeros obtenidos procesos de D.M. sucesivos de 1ps (T=450 °K); 10ps (T=350 °K); 12ps (T=300 °K).

Finalmente, la geometría de los conformeros de mínima energía obtenidos se analizaron por Mecánica Molecular (M.M.) mediante el uso del método MM+ como campo de fuerzas. Primeramente se analizó el algoritmo "steepest descent" de forma interactiva hasta un gradiente de 0.1 Kcal/mol Å. Una vez optimizada esta estructura se procedió a una nueva optimización utilizando el algoritmo "Fletcher-Reeves" con gradiente conjugado hasta un valor de 0.02 Kcal/mol Å, que permitió considerar los efectos de la conjugación de dobles enlaces, tan importante a priori, en las moléculas objeto de estudio.

III.2.- CARACTERIZACIÓN DEL PREPARADO COMERCIAL

III.2.1.- DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO PROTEICO DE LA α -QUIMOTRIPSINA COMERCIAL

Para la determinación del porcentaje de proteína presente en el preparado comercial se empleó el método del Microbiuret, (228) empleando el reactivo de Benedict, cuya preparación se detalla a continuación:

Se disuelven 86.5 g de citrato sódico cristalizado ($2\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 11\text{H}_2\text{O}$) y 50 g de

carbonato sódico anhidro en 250 ml de agua (se filtra si es necesario). Se añade con agitación continua una solución de 8.65 g de sulfato cúprico cristalizado disuelto en 50 ml de agua, y se diluye a 500 ml. La solución resultante debe quedar perfectamente transparente.

Posteriormente se preparó una solución de seroalbúmina bovina en tampón fosfato pH=6.0, 0.1 M, de una concentración de 0.8 mg/ml.

Las condiciones experimentales empleadas para la construcción de la recta de calibrado en la determinación de proteína por el método del Microbiuret se muestra en la **Tabla 11** (como referencia se empleó el contenido del blanco);

Tabla 11.- Cálculo de la cantidad de proteína presente en una disolución, empleando seroalbúmina bovina como patrón.

Tubo	NaOH (0.1M) (ml)	R. Benedict (ml)	Tampón fosfato pH=6.0 (0.1 M) (ml)	Disol. Albúmina (ml)	Albúmina (mg)	Abs. (330 nm) (D.O.)
Blanco	4.0	0.2	1.0	0.0	0.00	0.000
Blanco	4.0	0.2	1.0	0.0	0.00	0.000
1a	4.0	0.2	0.8	0.2	0.16	0.054
1b	4.0	0.2	0.8	0.2	0.16	0.051
2a	4.0	0.2	0.6	0.4	0.32	0.098
2b	4.0	0.2	0.6	0.4	0.32	0.092
3a	4.0	0.2	0.5	0.5	0.40	0.117
3b	4.0	0.2	0.5	0.5	0.40	0.105
4a	4.0	0.2	0.4	0.6	0.48	0.114
4b	4.0	0.2	0.4	0.6	0.48	0.121
5a	4.0	0.2	0.2	0.8	0.64	0.160
5b	4.0	0.2	0.2	0.8	0.64	0.164
6a	4.0	0.2	0.1	0.9	0.72	0.192
6b	4.0	0.2	0.1	0.9	0.72	0.190
7a	4.0	0.2	0.0	1.0	0.80	0.197
7b	4.0	0.2	0.0	1.0	0.80	0.202

El contenido de los tubos se agitó bien y se dejó reaccionar durante 1 h. a 25 °C de temperatura, para que se forme el complejo coloreado entre los iones Cu (II) y los restos amino y carboxilo de los enlaces peptídicos. Transcurrido ese tiempo se midió la absorbancia a 330 nm. En la cubeta de referencia se empleó el blanco que no contenía proteína, y con el cual se realizó el autocero.

Siguiendo esta metodología obtuvimos la siguiente recta de calibrado:

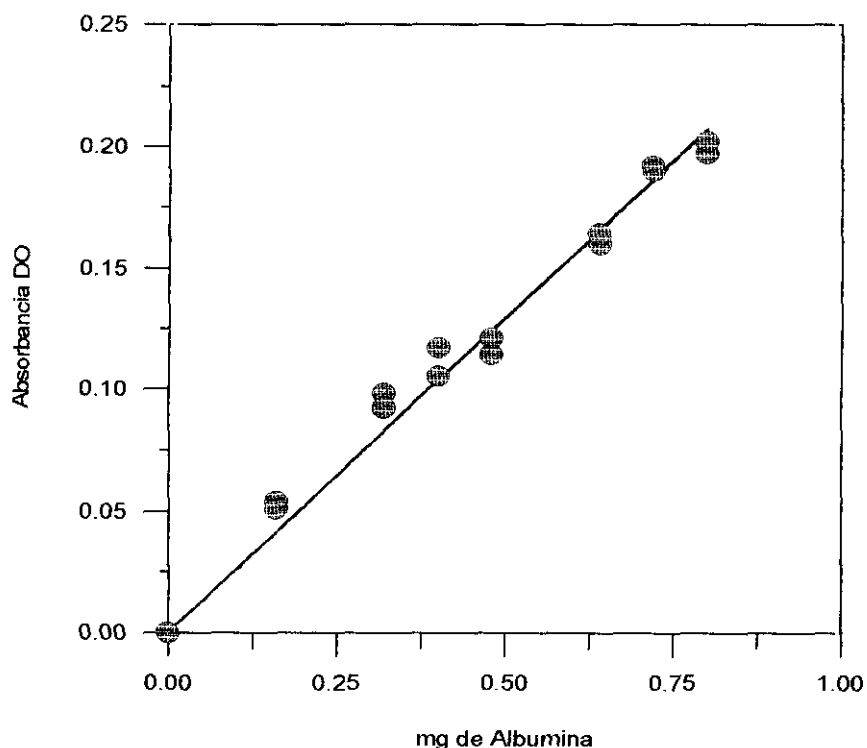


Figura 14.- Recta de calibrado para el cálculo de la cantidad de proteína presente en una disolución, empleando seroalbúmina bovina como patrón.

Los parámetros de esta recta son los siguientes:

-Pendiente= (0.245 ± 0.001) (D.O./mg de albúmina)

-Ordenada en el origen= (0.000 ± 0.001) , no es significativa según el test "t de Student" al 99% de certeza.

- $R^2=0.994$

El preparado comercial utilizado en la preste Tesis Doctoral posee un contenido en proteína de un $(83 \pm 4)\%$, calculado por el método del Microbiuret (228).

III.2.2.- MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE α -QUIMOTRIPSINA NATIVA

Para cuantificar la actividad hidrolítica de la enzima nativa, se empleó como reacción estándar, la hidrólisis del GpNA (229), cuantificando la cantidad de p-nitroanilina liberada por valoración espectrofotométrica a 410 nm. Para ello, a fin de calcular el coeficiente de extinción molar de la p-nitroanilina a esa longitud de onda, se realizó una curva patrón variando la concentración de p-nitroanilina según se muestra a continuación en la **Tabla 12** (como referencia se empleó el contenido del blanco):

Tabla 12.- Cálculo del coeficiente de extinción molar de la p-nitroanilina.

Tubo	Tampón ^a (ml)	Vol. pNA ^b (ml)	[pNA] ($\times 10^{-2}$ mM)	Abs. ^c (D.O.)
Blanco	5.0	0.0	0.00	0.000
1a	4.0	1.0	1.77	0.130
1b	4.0	1.0	1.77	0.132
1c	4.0	1.0	1.77	0.126
2a	3.0	2.0	3.53	0.254
2b	3.0	2.0	3.53	0.254
2c	3.0	2.0	3.53	0.256
3a	2.0	3.0	5.30	0.369
3b	2.0	3.0	5.30	0.374
3c	2.0	3.0	5.30	0.372
4a	1.0	4.0	7.07	0.492
4b	1.0	4.0	7.07	0.497
4c	1.0	4.0	7.07	0.495
5a	0.0	5.0	8.83	0.642
5b	0.0	5.0	8.83	0.643
5c	0.0	5.0	8.83	0.643

^a Tampón fosfato monopotásico/fosfato dipotásico pH=7.8 (0.1M).

^b Disolución madre de pNA (8.83×10^{-2} mM).

^c Absorbancia medida a 410 nm.

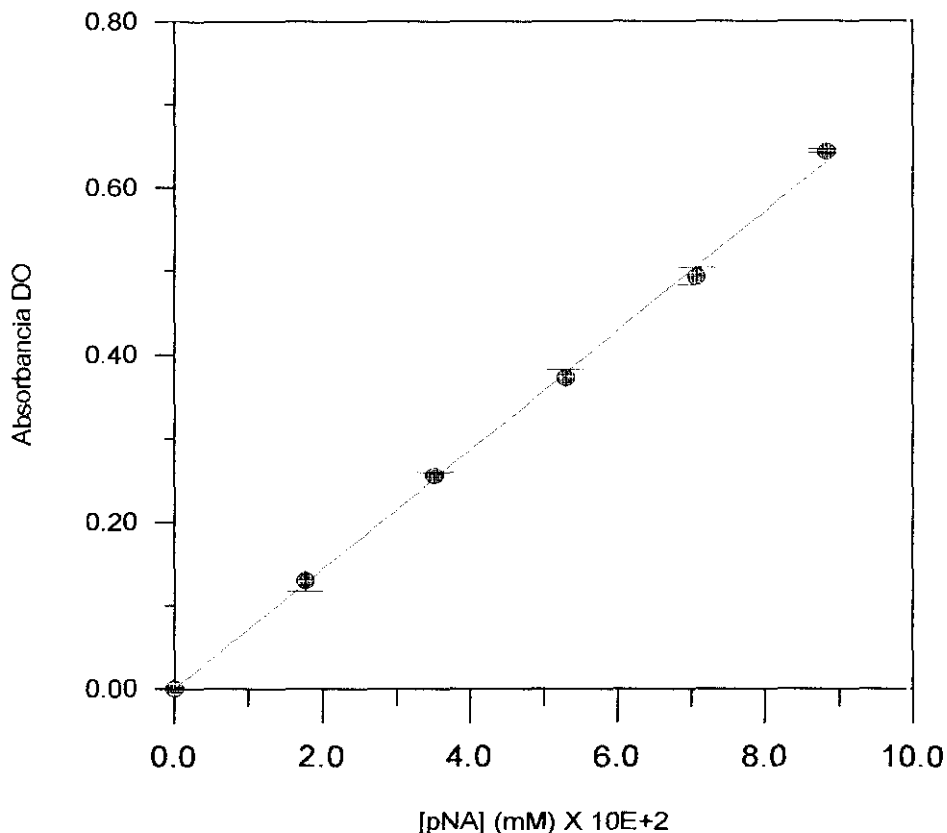


Figura 15.- Cálculo del coeficiente de extinción molar de la p-nitroanilina.

El valor de la pendiente de esta recta coincide con el coeficiente de extinción molar (ϵ), que resultó ser:

-Pendiente = $(0.0717 \pm 0.0003) \text{ (mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}\text{)}$.

-La ordenada en el origen no es significativa según el test "t de Student" al 99% de certeza .

- $R^2 = 0.999$.

Una vez llevada a cabo esta valoración espectrofotométrica, se cuantificó la actividad hidrolítica de la α -quimotripsina nativa, realizando diferentes ensayos de hidrólisis de GpNA (0.015 M en DMF) (229) empleando distintas cantidades de una disolución de α -quimotripsina comercial preparada en tampón fosfato pH=6.0, 0.1 M de una concentración de 1.37 mg/ml.

Así, se realizó un protocolo que aparece indicado en la siguiente **Tabla 13** (como

referencia se empleó el contenido del blanco):

Para calcular la velocidad inicial de reacción se cuantificó el incremento de absorbancia producido a 410 nm debido a la liberación de p-nitroanilina en un intervalo de tiempo de 25 minutos y una temperatura de 25 °C, el cual, mediante el empleo del coeficiente de extinción molar calculado anteriormente, pudimos transformar dicho valor en actividad hidrolítica, cuantificada como μ moles de p-nitroanilina liberada por minuto.

Para medir la actividad hidrolítica específica, esto es, expresando la actividad por unidad de cantidad de enzima, se procedió a la representación de la velocidad medida frente a la cantidad de preparado comercial presente en cada ensayo, obteniéndose así la representación que aparece indicada en la **Figura 16**.

Tabla 13.- Cálculo de la actividad hidrolítica específica.

Tubo	α -Quimotr.		Tampón ^a	GpNA	Abs. ^b	Actividad ^c
	(ml)	(mg)	(ml)	(ml)	(D.O.)	
Blanco	0.0	0.000	4.5	0.5	0.000	0.000
1a	0.1	0.137	4.4	0.5	0.141	0.788
1b	0.1	0.137	4.4	0.5	0.141	0.900
2a	0.2	0.274	4.3	0.5	0.247	1.382
2b	0.2	0.274	4.3	0.5	0.247	1.488
3a	0.3	0.411	4.2	0.5	0.441	2.466
3b	0.3	0.411	4.2	0.5	0.421	2.356
4a	0.4	0.548	4.1	0.5	0.545	3.048
4b	0.4	0.548	4.1	0.5	0.555	3.104
5a	0.5	0.685	4.0	0.5	0.666	3.726
5b	0.5	0.685	4.0	0.5	0.690	3.860

^a *Tampón fosfato monopotásico/fosfato dipotásico pH=7.8 (0.1M).*

^b *Absorbancia medida a 410 nm.*

^c *Actividad en (μ M pNA/min.).*

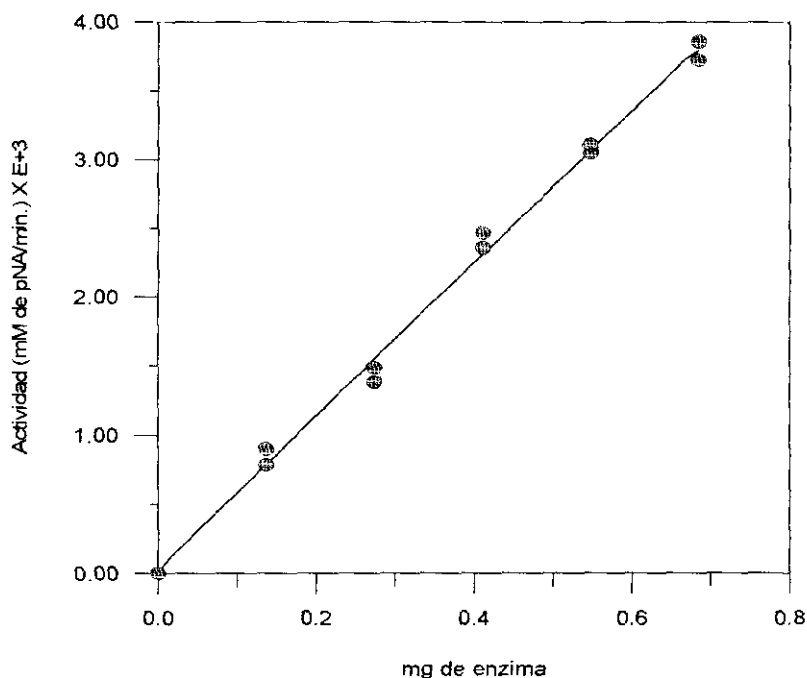


Figura 16.- Cálculo de la actividad hidrolítica específica de la α -quimotripsina comercial.

Así, la actividad hidrolítica específica de la α -quimotripsina comercial empleada en la presente Memoria coincide con el valor de la pendiente de la recta.

-Pendiente = $(2.54 \pm 0.04) \mu\text{M de pNA liberados min.}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de enzima,

-La ordenada en el origen no fue significativa según el test "t de Student" al 99% de certeza.

$-R^2 = 0.997$.

III.3.- SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS DERIVADOS α -QUIMOTRIPSINA INMOVILIZADA SOBRE COPOLÍMEROS DE INJERTO (PE/HEMA)

III.3.1- PREPARACIÓN DEL SOPORTE (PE/HEMA)

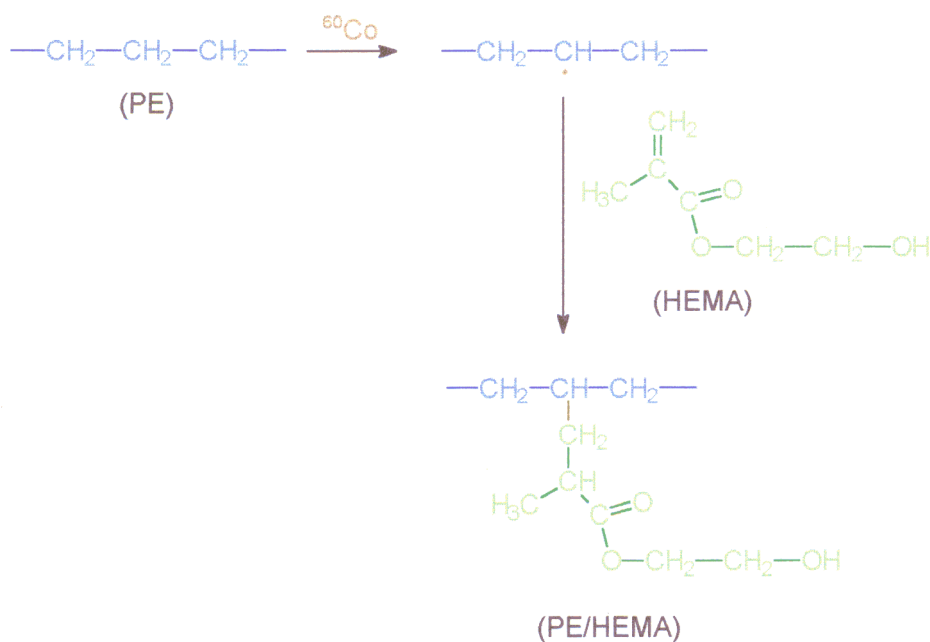
III.3.1.1.- Síntesis del copolímero (PE/HEMA)

El polietileno comercial primeramente fue purificado por extracción en soxhlet con

etanol absoluto durante 6 horas y posterior secado hasta peso constante a 40°C. Por otro lado, se preparó una solución de 30 ml de metacrilato de 2'-hidroxietilo en metanol (10% p/p). Posteriormente, se dispersaron 2g. de polietileno en los 30 ml de la solución anteriormente preparada y todo ello se irradió con ^{60}Co a 18 rad/seg durante 72 horas a 25°C de temperatura y en presencia de aire.

A continuación, se diluyó la mezcla con metanol hasta un volumen 6 veces mayor y se filtró, lavando el residuo sólido con metanol. Posteriormente, para arrastrar el metacrilato de 2'-hidroxietilo (HEMA) no unido al polietileno, se llevó a cabo una extracción en soxhlet con metanol y se secó a 40°C hasta peso constante.

Finalmente, se realizó otra extracción en soxhlet, esta vez con tolueno, durante 5.5 horas, con el fin de obtener el polietileno no injertado. Para medir el polietileno no injertado se dejó enfriar el volumen resultante de la extracción, con lo que se produjo la precipitación del polietileno no injertado. Se dejó secar el sólido hasta pesada constante.



Esquema 24.- Reacción de síntesis del copolímero (PE/HEMA)

El rendimiento del injerto se calculó según la ecuación [17], donde E_p representa la cantidad de HEMA presente en el copolímero en relación al polietileno existente en el mismo:

$$E_p = \frac{M_c - (M-F)}{(M-F)} * 100 \quad [17]$$

M_c = copolímero puro

M = polietileno inicial

F = polietileno extraído por el soxhlet

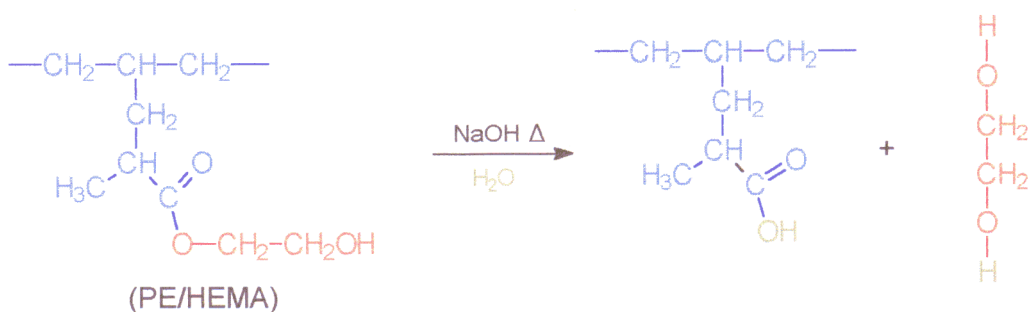
Para expresar el porcentaje de HEMA en función de la masa total del soporte empleamos la expresión [18], que nos parece más correcta al no superar nunca el 100% (esta segunda expresión es la que emplearemos para calcular el porcentaje de injerto a lo largo de esta memoria):

$$E = \frac{M_c - (M-F)}{M_c} * 100 \quad [18]$$

Donde E representa el porcentaje de HEMA en relación a la masa total de copolímero.

III.3.1.2.-Hidrólisis del copolímero formado

Se pesaron 2 g. de copolímero (PE/HEMA) y se añadieron a una solución de hidróxido sódico 1 M recientemente preparada (50 ml). Posteriormente, se adicionaron 2 ml de Tritón X 100 y se mantuvieron a reflujo durante 4 horas.



Esquema 25.- Hidrólisis del copolímero.

A continuación se lavó el copolímero sobre una placa de vidrio poroso con agua abundante hasta que la espuma desapareció y se lavó posteriormente el residuo sólido con HCl 1 M (50 ml) para neutralizar el hidróxido de sodio que pudiera quedar. Para finalizar, se realizó un segundo lavado del copolímero injertado e hidrolizado, con agua, y se dejó secar a 40 °C durante 24 h .

Para calcular el número de grupos carboxilo libres provenientes de la hidrólisis, se añadió un exceso de NaOH 0.05 M (10 ml) a un matraz que contenía 50 mg del copolímero de injerto hidrolizado y se mantuvo en agitación durante 24 h; pasado ese tiempo, se filtró el contenido y 5 ml del sobrenadante se diluyeron con agua hasta un volumen final de 25 ml, que posteriormente fueron valorados con HCl 0.01 M. La diferencia entre los moles de NaOH añadidos y los obtenidos en la valoración con HCl se corresponde con la concentración de restos carboxilato libres en el copolímero. De esta forma se obtuvieron unos soportes que se denominaron C1, C2 y C3, cuyas características diferenciales se comentarán más adelante en la **Sección (IV.1.1)**.

III.3.1.2.1.- Modificaciones del método de hidrólisis.

En el caso de los derivados con un 54.5% de injerto (respecto a la masa total de soporte) existen ciertas diferencias en el proceso de hidrólisis:

-Para obtener C4, se partió de 1 g de copolímero que se hidrolizó empleando una solución de NaOH 1 M (50 ml), 1 ml de Tritón X 100, y se dejó todo ello a reflujo durante 4 horas.

-En el caso del derivado C5, intentando aumentar el porcentaje de hidrólisis, se partió de 4 g de polímero los cuales se depositaron en el seno de una solución de NaOH 2 M (200 ml), añadiéndose a continuación 4 ml de Triton X 100, dejando la mezcla a reflujo durante 24 h.

Por otra parte, se suavizó el proceso de hidrólisis, empleando sólo 50 ml de NaOH (2 M) para 2 g de copolímero y 2 ml de Tritón X 100 durante 4 horas. Así se obtuvo el copolímero C6.

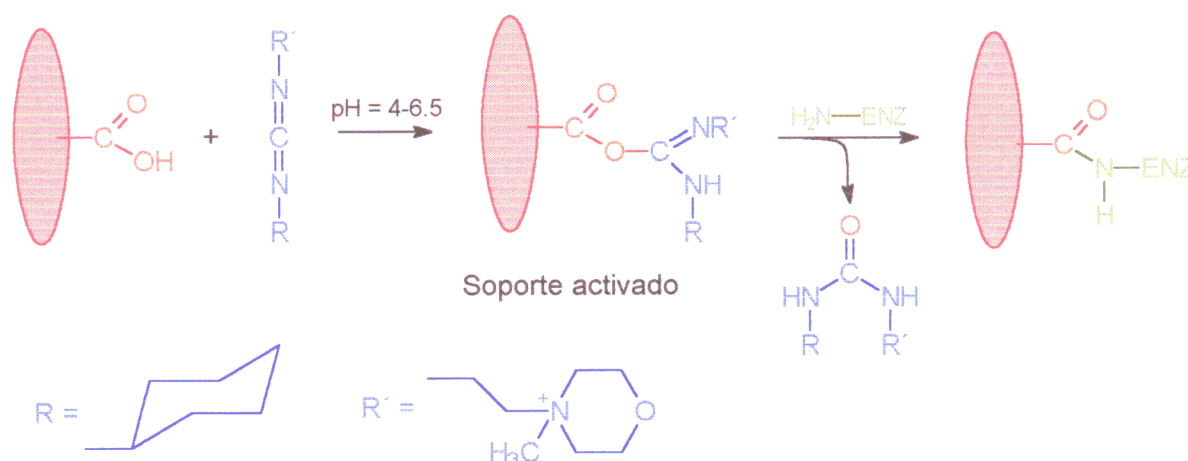
Los resultados de estas modificaciones junto con las propiedades de los copolímeros

C1, C2 y C3 anteriormente mencionados se recogen en la **Tabla 16** (Sección IV.1.1).

III.3.2.- INMOVILIZACIÓN COVALENTE DE LA α -QUIMOTRIPSINA SOBRE COPOLÍMEROS DE INJERTO (PE/HEMA).

Para llevar a cabo el proceso de inmovilización, se prepararon 100 ml de una solución de tampón fosfato de pH=6.0 (0.1 M), a la que se adicionaron 2 g. de copolímero (PE/HEMA) seco, 400 mg de enzima y 400 mg de CMC (N-ciclohexil-N'-(2-(metilmorfolino)etil)-carbodiimida-4-tolueno-sulfonato).

Se mezcló todo en un matraz Erlenmeyer y se mantuvo con agitación durante 18 horas a 4 °C, para que tuviera lugar la reacción de inmovilización, la cual se llevó a cabo mediante la unión de los grupos carboxilo del soporte, activados con la carbodiimida, y los restos ϵ -amino de grupos lísina de la proteína, tal y como aparece indicado en el **Esquema 26**:



Esquema 26.- Reacción de inmovilización de α -quimotripsina sobre copolímeros de injerto (PE/HEMA).

Posteriormente, se filtró el contenido del matraz para eliminar los restos de dialquileura y la enzima no unida covalentemente al soporte, llevando a cabo un posterior lavado con tampón fosfato de pH=6.0, 0.1 M (el mismo con el que se realizó la inmovilización) (2×50

ml).

En los líquidos de los filtrados se determinó la cantidad de enzima existente empleando el método del Microbiuret (228), tal y como se indica en la **Sección III.2**. Así, al conocer, la cantidad de enzima añadida inicialmente, por diferencia se puede calcular fácilmente la carga enzimática del derivado. Siguiendo esta metodología se obtuvieron los derivados **C1-CT**, **C2-CT**, **C3-CT**.

Para convertir los valores de absorbancia en unidades de concentración construimos una recta de calibrado empleando en vez de seroalbúmina bovina como patrón la enzima comercial ya caracterizada disuelta en tampón fosfato de pH=6.0 (0.1 M), resultando una concentración en el tubo madre de 1.76 mg de enzima/ml. Siguiendo el protocolo que se muestra en la **Tabla 14**, calculamos la carga enzimática de los derivados (como referencia, se empleó el blanco):

Tabla 14.- Cálculo de la cantidad de proteína presente en una disolución empleando α -quimotripsina como patrón.

Tubo	NaOH ^a (ml)	R. Benedict (ml)	Tampón ^b (ml)	Enzima (ml)	α -Quimot. (mg)	Abs. ^c (D.O.)
Blanco	4.0	0.2	1.0	0.0	0.000	0.000
Blanco	4.0	0.2	1.0	0.0	0.000	0.000
1a	4.0	0.2	0.8	0.2	0.352	0.080
1b	4.0	0.2	0.8	0.2	0.352	0.082
2a	4.0	0.2	0.6	0.4	0.704	0.155
2b	4.0	0.2	0.6	0.4	0.704	0.146
3a	4.0	0.2	0.5	0.5	0.880	0.190
3b	4.0	0.2	0.5	0.5	0.880	0.188
4a	4.0	0.2	0.4	0.6	1.056	0.231
4b	4.0	0.2	0.4	0.6	1.056	0.239
5a	4.0	0.2	0.2	0.8	1.408	0.309
5b	4.0	0.2	0.2	0.8	1.408	0.313
6a	4.0	0.2	0.1	0.9	1.584	0.347
6b	4.0	0.2	0.1	0.9	1.584	0.330
7a	4.0	0.2	0.0	1.0	1.760	0.382
7b	4.0	0.2	0.0	1.0	1.760	0.378

^a Solución de NaOH (0.1M)

^b Tampón fosfato monopotásico/fosfato dipotásico pH=6.0 (0.1 M)

^c Absorbancia medida a una longitud de onda de 330 nm.

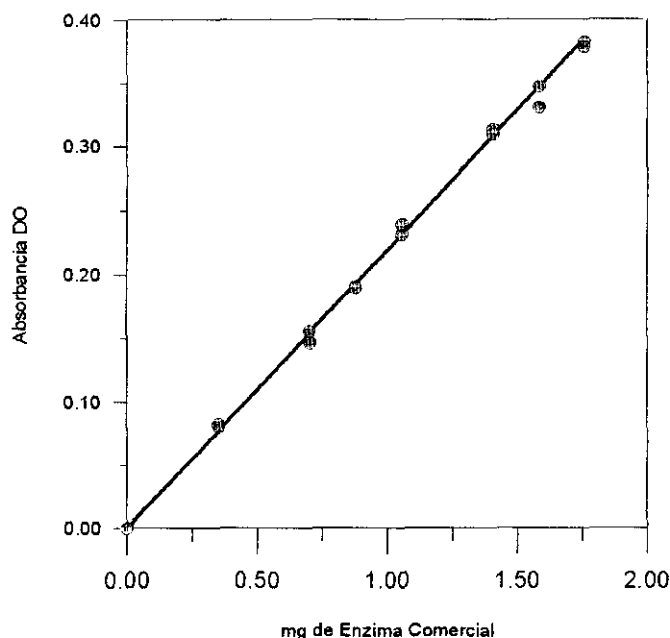


Figura 17.- Recta de calibrado para el cálculo de la cantidad de proteína empleando α -quimotripsina comercial, caracterizada, como patrón.

Los parámetros de esta recta resultaron ser :

-Pendiente= (0.215 ± 0.001) (D.O/mg de enzima)

-La ordenada en el origen no fue significativa según el test "t de Student" (99% de certeza)

- $R^2=0.999$

III.3.2.1.- Modificación del proceso de inmovilización

A fin de intentar mejorar el método de inmovilización y aumentar la carga enzimática, en el caso de los derivados de mayor porcentaje de injerto se introdujeron diferentes modificaciones en el proceso descrito en el apartado anterior:

a) Para favorecer los choques intermoleculares se redujo el volumen a la mitad.

b) Por otra parte y a fin de estudiar las posibles diferencias entre el método de inmovilización "one-pot" en un solo paso y una metodología secuencial, se puso en contacto la CMC con la solución de copolímero durante 24 h.; transcurrido ese tiempo, se añade la enzima y se deja reaccionar a 4 °C de temperatura durante otras 24 h. Con esto pretendemos

activar el soporte antes de reaccionar con la enzima al hacer reaccionar los restos carboxilato del soporte con la CMC evitando que esta reaccione con los grupos carboxilato de la enzima, y sí con los residuos ϵ -amino de lisina.

Siguiendo estas modificaciones se obtuvieron los derivados C4-CT, C5-CT, y C6-CT (ver **Tabla 16**, Sección IV.1.1).

III.3.3.- DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LOS DERIVADOS INMOVILIZADOS

Para determinar la actividad enzimática de los derivados inmovilizados, se realizó un ensayo similar al que se describe para la enzima nativa, empleando GpNA como sustrato. Para ello, se procedió a incubar 25 mg del derivado inmovilizado en 4.5 ml de tampón fosfato pH=7.8, 0.1 M a 25 °C, con 0.5 ml de una disolución de GpNA en DMF (229) de concentración 0.015 M.

Transcurridos 25 minutos, la reacción se detiene por filtración a través de una placa de vidrio Pyrex del n° 4, separando así el derivado sólido del resto de los componentes de la reacción. Posteriormente se midió la absorbancia a 410 nm originada por la p-nitroanilina liberada presente en los líquidos del filtrado, y por interpolación en las curvas de calibrado empleadas para la enzima comercial en la **Sección III.3 (Fig. 15 y 16)**, se obtuvieron los valores de actividad retenida de los derivados, expresada en comparación con la cantidad porcentual de enzima nativa que nos proporcionaría la misma actividad hidrolítica, (**Tabla 16**).

III.4.- DERIVADOS INMOVILIZADOS SOBRE GELES DE AGAROSA

Estos derivados fueron suministrados por el grupo del Dr. Guisán, para compararlos con los derivados obtenidos sobre copolímeros de injerto.

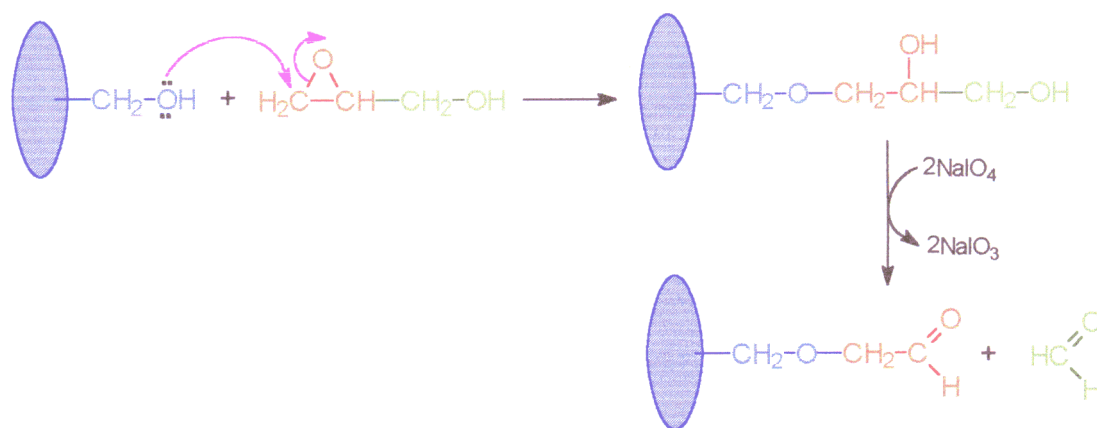
III.4.1.- ACTIVACIÓN DEL SOPORTE.

La activación de los geles de agarosa la realizaron siguiendo la metodología del

glicidol, (230, 231), que esencialmente se puede resumir en una primera reacción de los geles de agarosa (6% de entrecruzamiento) con glicidol (2,3-epoxipropanol) (**Esquema 27**), lo que condujo a la obtención de un intermedio glicidil-agarosa ($\text{Ag-O-CH}_2\text{-CH(OH)-CH}_2\text{OH}$), que seguidamente oxidaron con periodato sódico a $\text{pH}=7.0$, obteniendo de esta forma geles glioxil-agarosa ($\text{Ag-O-CH}_2\text{-CHO}$) con diferente grado de activación según la cantidad de glicidol empleada inicialmente (**Tabla 16 Sección IV.2.1**).

a) Para obtener soportes con poca activación emplearon simplemente los grupos aldehído provenientes de la oxidación del soporte. Así sobre 150 ml de gel suspendido en 30 ml de agua se añade periodato de sodio en una cantidad suficiente en cada caso para oxidar todos los grupos glicerilo existentes sobre el soporte y previamente valorados. Se agita suavemente a temperatura ambiente durante 3 h., lavándose a continuación con agua y empaquetándose para medir su volumen exacto. Siguiendo esta metodología se obtuvieron los soportes **AGU1** y **AGU2**.

b) En el caso de los soportes más activados, a 150 ml de gel empaquetado y suspendido en 30 ml de agua se añaden 50 ml de una solución de NaOH 1.7 N conteniendo 28.5 mg/ml de borohidruro de sodio. Sobre esta suspensión se añade el glicidol muy lentamente controlando la temperatura, manteniéndose todo en agitación suave durante 18 h. a temperatura ambiente. Seguidamente se lavan los geles abundantemente con agua. A continuación se añade periodato de sodio en cantidad suficiente para oxidar todos los grupos gliceril existentes sobre el soporte. De esta forma se obtuvo el soporte **AGM1**, con mayor cantidad de restos aldehído que los soportes **AGU1** y **AGU2**.



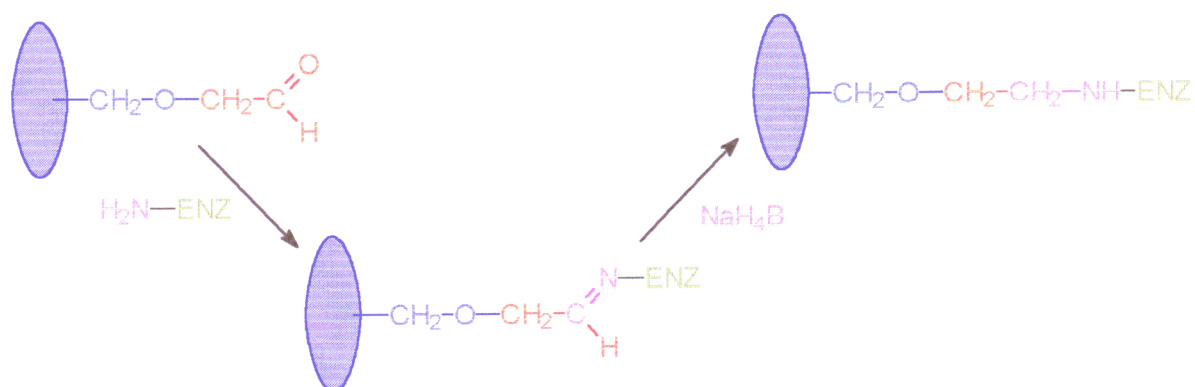
Esquema 27.- Reacción de activación de los geles de agarosa.

III.4.2.- INMOVILIZACIÓN DE LA ENZIMA.

La unión de la enzima fue llevada a cabo por el grupo del Dr. Guisán, según se describe en la bibliografía (230-233).

Se disuelve una cantidad de α -quimotripsina según la carga del derivado a obtener, (teniendo en cuenta que se inmoviliza toda la enzima ofrecida al soporte activado, siempre que la relación enzima/soporte no sea superior a 40 mg de enzima/ml de gel), en 40 ml de tampón borato, pH=10.0, 0.1 M, a la cual añadieron 40 ml de una suspensión de agarosa activada, que contenía 20 ml de gel. Esta mezcla se mantuvo en agitación muy ligera, a 25 °C, tomando a diferentes tiempos alícuotas tanto de la suspensión como del sobrenadante, y su actividad fue analizada espectrofotométricamente, empleando BTEE como sustrato, tal y como esta descrito (231).

Después de 3 horas, el derivado enzimático se redujo empleando borohidruro sódico y tampón borato de pH=10.0 0.1 M, siguiendo el procedimiento de los geles tripsina-agarosa (233). De esta forma:



Esquema 28.-Reacción de inmovilización de α -quimotripsina sobre geles de agarosa activados con glicidol.

III.5.- SÍNTESIS PEPTÍDICA CATALIZADA POR α -QUIMOTRIPSINA INMOVILIZADA EN MEDIOS ORGÁNICO-ACUOSOS

La reacción estándar de síntesis del dipéptido modelo Bz-*L*-Tyr-*L*-Leu-NH₂ se llevó a

cabo en un reactor tipo tanque agitado, de un volumen aproximado de 50 ml, el cual se introdujo en un baño termostático a 25 °C. Como medio acuoso se empleó tampón Tris/HCl 0.1M pH=9.0, 0.1 M y como codisolventes orgánicos se probaron: 1,1,1-tricloroetano, metilisobutilcetona, acetato de etilo, acetonitrilo, N,N-dimetilformamida, 1,4-butanodiol y etanol absoluto, en diferentes proporciones desde 10/90 hasta 99/1 (% , v/v), disolvente orgánico/tampón.

Los donadores de acilo utilizados fueron BTEE o APEE (10 mM), y como nucleófilo se emplearon H-L-Leu-NH₂, H-L-Ala-NH₂, H-L-Arg-NH₂, H-L-Met-NH₂, H-L-Ser-NH₂, H-L-Asp-NH₂, H-L-Gly-NH₂, (40 mM), (en forma de clorhidrato); el volumen final fue en todos los casos de 20 ml y, puesto que el nucleófilo estaba en forma de clorhidrato, se añadió una cantidad de trietilamina equimolecular respecto a la cantidad de HCl, a fin de lograr la perfecta solubilización de la muestra y no causar ninguna variación de pH.

Posteriormente, se procedió a agitar la muestra durante 30 minutos para lograr una buena disolución de todos los componentes, y realizar la toma de muestra correspondiente a tiempo cero. A continuación, se añadió la enzima libre o inmovilizada sobre los diferentes soportes, en concentraciones variables desde 0.48 mg de enzima/ml hasta 0.044 mg de enzima/ml. Una vez añadida la enzima, se fueron tomando muestras a diferentes tiempos de reacción que se analizaron por HPLC.

Por lo que respecta a la toma de muestras, ésta se llevó a cabo succionando desde la mezcla de reacción un volumen de 0.05 ml, que posteriormente fue diluido con 0.85 ml de una disolución de naftaleno en acetonitrilo (0.47 mM), que actúa de patrón interno y 0.1 ml de alcohol etílico con el fin de anular la actividad enzimática, obteniendo de esta forma un volumen final de 1 ml. Estas muestras se cromatografiaron inmediatamente empleando la técnica de HPLC, o bien se almacenaron en el congelador a -15 °C hasta su posterior análisis.

Las muestras se filtraron con un filtro tipo GV de la casa "Technokroma" de un diámetro de poro de 0.22 µm, con el fin de eliminar las partículas de derivado inmovilizado que pudieran obstruir las precolumnas del HPLC, pasando el contenido a un vial, para lograr la separación y cuantificación de los productos.

El análisis por HPLC se realizó con un cromatógrafo LDC empleando una columna C₈ Nucleosil 128 (LDM). El eluyente fue acetonitrilo/H₂O (55/45) (v/v). La longitud de onda

empleada fue de 270 nm en el caso de BTEE y 254 nm en el caso del APEE. Conociendo las cantidades iniciales de naftaleno y sustrato se pueden calcular los rendimientos a los diferentes tiempos de reacción empleando la técnica del patrón interno, con el cálculo del factor de respuesta "f" según las expresiones siguientes:

$$f = \frac{A_p}{A_n} * \frac{[n]}{[p]} \quad [19]$$

f=Factor de respuesta

A_p=Área del producto

A_n=Área del naftaleno

[n]=Concentración inicial de naftaleno

[p]=Concentración inicial de producto

$$[p]_{ti} = \frac{A_p}{A_n} * \frac{[n]}{f} \quad [20]$$

[p]_{ti}=Concentración de producto a un tiempo determinado

$$(\%P)_{ti} = \frac{[p]_{ti} * V_r * V_v}{V_e * M_t} * 100 \quad [21]$$

(%p)_{ti}= Tanto por ciento de producto en reactor

V_r=Volumen remanente

V_e=Volumen extraído

V_v=Volumen del vial (1 ml)

M_t=Moles totales de producto

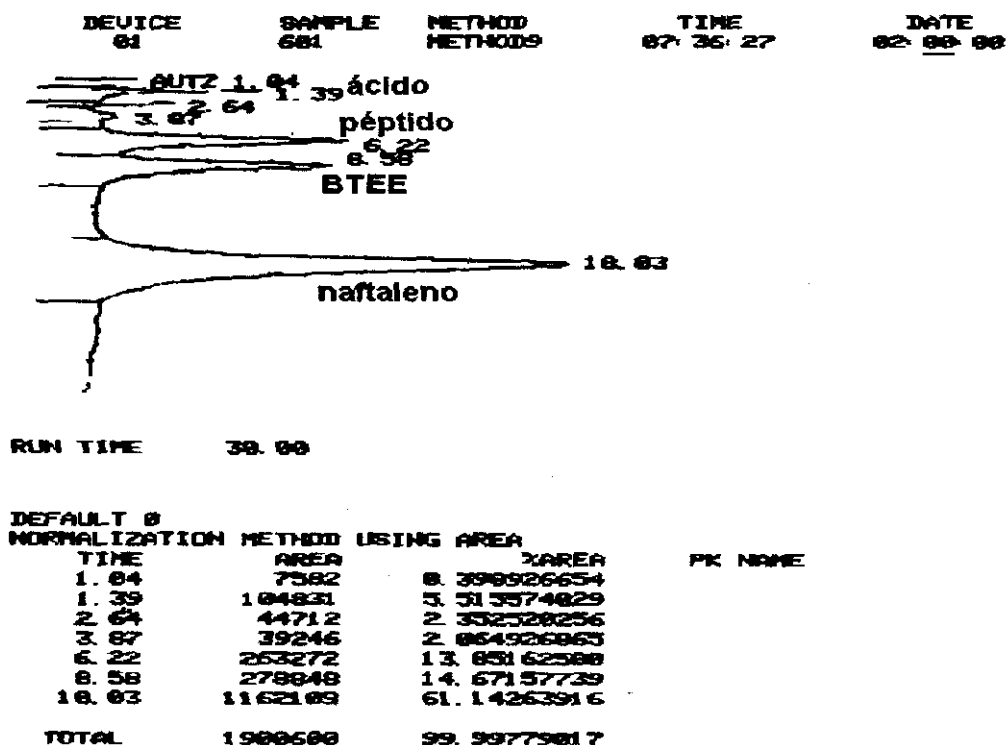


Figura 18.- Cromatograma de una muestra a un tiempo diferente de cero. Síntesis del dipéptido modelo Bz-L-Tyr-L-Leu-NH₂.

III.6.- ENSAYOS CON DERIVADOS DE α -QUIMOTRIPSINA INMOVILIZADA SOBRE COPOLÍMEROS DE INJERTO (PE/HEMA)

A fin de comprobar la estabilidad operacional de los derivados inmovilizados de α -quimotripsina sobre copolímeros de injerto PE/HEMA, se llevaron a cabo una serie de estudios fundamentales desde el punto de vista de Ingeniería Enzimática.

III.6.1.- ENSAYOS DE ESTABILIDAD ENZIMÁTICA

En primer lugar, se comprobó la variación de la estabilidad enzimática en condiciones de almacenamiento, y a diferentes temperaturas, tanto en condiciones de hidrólisis como de síntesis.

A) En condiciones de hidrólisis

Para comparar la estabilidad de nuestros derivados con la de la enzima libre se llevó a cabo un estudio similar para ambos sistemas.

1) Enzima libre

a) Actividad enzimática:

La actividad enzimática fue determinada espectrofotométricamente a 25 °C y a una longitud de onda de análisis de 410 nm) utilizando como sustrato N-benzoil-L-tirosin-p-nitroanilida (BTpNA) (4.39 mM en acetona) (258). Para definir el ensayo estándar de actividad se necesitaron:

- 2.6 ml de tampón Tris/HCl pH=8.0, 0.1 M.
- 25 μ l de BTpNA (4.39 mM en acetona).
- 0.275 ml de acetona.
- 0.1 ml de solución tampón (cubeta de referencia) ó 0.1 ml de solución de enzima (0.62 mg/ml) (cubeta de muestra) preparada en tampones: ác. cítrico/citrato sódico pH=3.0, 0.05 M; ác. bórico/NaOH pH=9.0, 0.05 M; y ác. bórico/NaOH pH=9.0 0.05 M con un 10% de N,N-dimetilformamida (v/v) .

Primeramente, se calculó el coeficiente de extinción molar (ϵ) de este sustrato, para obtener directamente las velocidades iniciales expresadas en (mmoles/min.), para lo cual se construyó una curva de calibrado de absorbancia frente a concentración de sustrato empleando una disolución madre de BTpNA en acetona (4.39 mM) y otra disolución de enzima en tampón de almacenamiento ác. cítrico/citrato de pH=3.0, (0.1M) muy concentrada (10 mg de enzima/ml), para hidrolizar rápidamente el sustrato y comprobar la variación de la absorbancia a 410 nm en función de la concentración de sustrato, según se describe en el siguiente protocolo, **Tabla 15**, (como referencia se empleo el contenido del blanco):

Tabla 15.- Cálculo del coeficiente de extinción molar del BTpNA.

Tubo	Tampón ^a (ml)	Acet. (ml)	Enz. ^b (ml)	BTpNA ^c (ml)	[BTpNA] (mM)	A ₀ ^d (D.O.)	A _∞ ^e (D.O.)	A _∞ ^e -A ₀ ^d (D.O.)
Blanco	2.6	0.300	0.1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
1	2.6	0.295	0.1	0.005	0.007	0.003	0.081	0.079
2	2.6	0.285	0.1	0.015	0.022	0.002	0.227	0.225
3	2.6	0.275	0.1	0.025	0.037	0.003	0.382	0.379
4	2.6	0.250	0.1	0.050	0.073	0.004	0.673	0.669
5	2.6	0.225	0.1	0.075	0.110	0.005	1.005	1.000
6	2.6	0.200	0.1	0.100	0.146	0.007	1.493	1.486
7	2.6	0.175	0.1	0.125	0.183	0.008	2.003	1.995
8	2.6	0.150	0.1	0.150	0.220	0.011	2.326	2.315

^a Tampón Tris/HCl pH=8.0, 0.1 M.

^b Disolución de enzima (1.0 mg/ml).

^c Disolución de BTpNA (4.39 mM).

^d Absorbancia a 410 nm debida al tampón, a la acetona, y al sustrato, antes de tener lugar su hidrólisis.

^e Absorbancia a 410 nm debida a p-nitroanilina liberada tras la hidrólisis enzimática del sustrato.

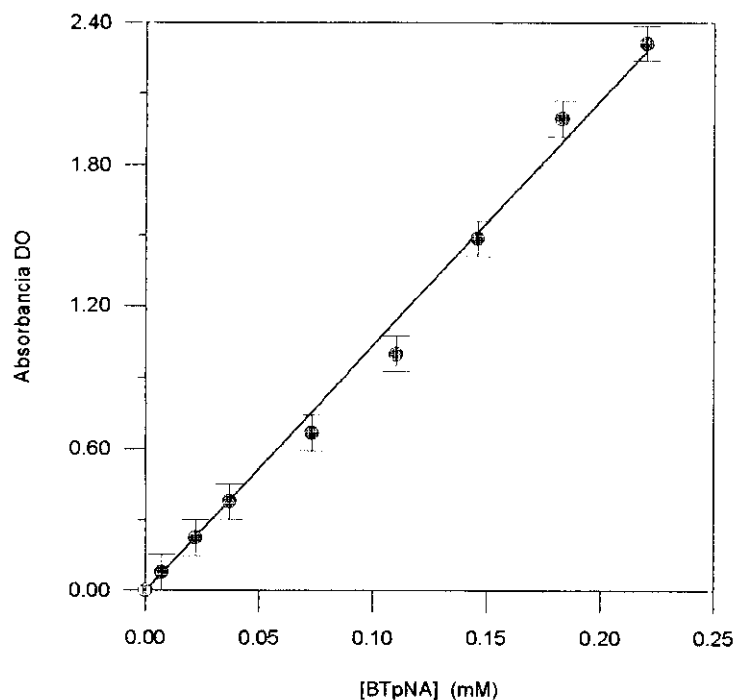


Figura 19.- Recta de calibrado para determinar el coeficiente de extinción molar del BTpNA.

Parámetros de la recta:

-Pendiente = $(10.6 \pm 0.2) \text{ (mM}^{-1}\text{)}$

-Ordenada en el origen es no significativa con un 99% de certeza, según el test "t de Student".

- $R^2 = 0.997$

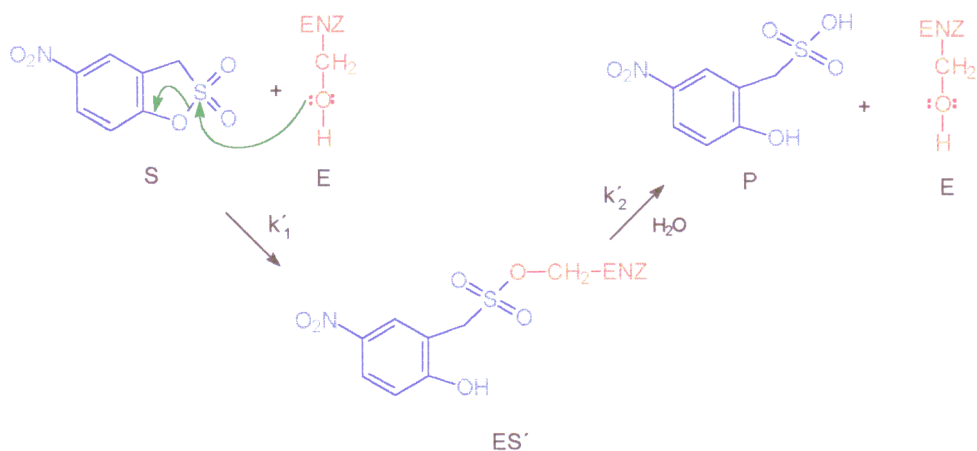
Así el valor de la pendiente de esta curva coincide con el coeficiente de extinción molar (ϵ), resultando $\epsilon = (10.6 \pm 0.2) \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$.

Para realizar el estudio de estabilidad térmica de la enzima libre se incubaron varios tubos de ensayo con soluciones de enzima (0.62 mg/ml) en los diferentes tampones anteriormente indicados, a 2, 25, 37 y 50 °C, de los cuales se fueron tomando muestras a diferentes tiempos para cuantificar la actividad enzimática remanente siguiendo el ensayo estándar. Considerando el valor inicial de actividad como el 100%, se estudió la estabilidad del catalizador en diferentes condiciones de pH y temperatura.

Conviene comentar que dentro del tubo de ensayo no existe agitación aunque el sistema termostator sí la presenta. Este dato puede ser interesante para luego comparar con sistemas bifásicos en agitación.

b) Medida de la concentración de centros activos en disoluciones enzimáticas:

Para conocer la concentración de centros activos se empleó como sustrato valorante la sulfona del ácido 2'-hidroxi-5'-nitrofenil-metanosulfónico (S) la cual reacciona con la enzima dando lugar a un compuesto coloreado (ES') (**Esquema 29**) cuya absorbancia a 390 nm es función de la concentración de centros activos que presenta la disolución (74).



Esquema 29.- Reacción de α -quimotripsina con la sulfona del ácido 2'-hidroxi-5'-nitrofenil-metanosulfónico

De esta forma se prepararon disoluciones de enzima de 5 mg/ml en tampones: ác. cítrico/citrato sódico pH=3.0 (0.05 M) y ác. bórico/borato sódico pH=9.0, 0.05 M, con un 10% de N,N-dimetilformamida (v/v), las cuales se incubaron a 2 y 25 °C para tomar alícuotas de 0.1 ml a diferentes tiempos y llevar a cabo el siguiente ensayo estándar, a una longitud de onda de 390 nm y a 25 °C de temperatura:

-Cubeta de referencia 3 ml de tampón Tris/HCl pH=7.5, 0.1 M.

-Cubeta de muestra 3 ml del mismo tampón, a la cual se añaden 0.1 ml de disolución enzimática preparada con los tampones anteriormente citados, y se cuantifica el aumento de absorbancia que causa la enzima (A_1). Posteriormente se añaden 0.05 ml de una disolución de la citada sultona (2.98 mM) en acetonitrilo originándose un incremento brusco en el valor de la absorbancia al reaccionar la enzima con el sustrato, para dar el complejo ES' (**Figura 20**) (A_2). Posteriormente, la absorbancia sigue aumentando debido a que la enzima continua con el proceso de hidrólisis del resto de las moléculas de sustrato (**Figura 20**).

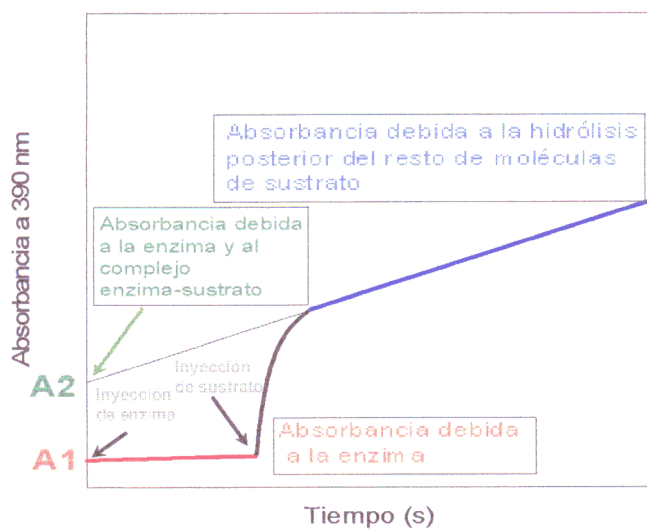


Figura 20.- Medida de la concentración de centros activos.

De esta forma se produce el fenómeno conocido como explosión ("burst"), ya comentado en la (Sección I.1.3.3), fenómeno que sucede cuando un intermedio unido a la enzima se acumula en el transcurso de la reacción. Así, el primer mol de sustrato reacciona rápidamente con la enzima para formar cantidades estequiométricas del intermedio unido a la enzima y del producto, y posteriormente el siguiente paso es más lento, pues depende de la ruptura del intermedio para liberar el catalizador.

Sí k_1 es mucho mayor que k_2 la formación del intermedio ES es fácilmente medible y con lo cual también es sencillo conocer la concentración (molaridad) de centros activos de la solución enzimática.

De esta forma con sustratos tales como el acetato de p-nitrofenilo (67), N-trans-cinamoil-imidazol (73) o la sultona (74), es posible medir de esta forma el número de centros activos presentes en la preparación enzimática.

Según esto empleando, la siguiente expresión extraída de la bibliografía (74) podemos obtener la concentración de centros activos de la disolución

$$M_E = \frac{31.5 * (A_2 - A_1)}{\epsilon_{ES}} \quad [6]$$

M_E = Molaridad de centros activos

A_1 = Absorbancia debida a la enzima en (D.O.)

A_2 = Absorbancia debida a la enzima y al complejo enzima-sustrato en (D.O.)

ϵ_{ES} = Coeficiente de extinción molar del complejo enzima sustrato, que a esa longitud de onda presenta un valor de $8564 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (74).

La proporción de centros activos del preparado comercial con respecto a la masa total de sólido, utilizado en la presente Memoria, calculada por este método y contrastada con los valores obtenidos en otros ensayos, empleando N-trans-cinamoil-imidazol (73) y acetato de p-nitrofenilo (71) como sustratos, resultó ser $(59 \pm 4)\%$.

2) Enzima inmovilizada

Los ensayos de estabilidad de la enzima inmovilizada se llevaron a cabo con los distintos derivados incubándolos en estado sólido, en condiciones de almacenamiento a una temperatura de 2 °C. Se fueron tomando cantidades alícuotas de 10 mg del derivado C6-CT cada cierto tiempo para realizar el ensayo estándar de actividad hidrolítica con GpNA (229), (descrito en el apartado de caracterización de los derivados inmovilizados (**Sección III.3.3**)). En lugar de emplear BTPNA, cuya hidrólisis es muy rápida, lo que proporcionaría un gran error en la medida de absorbancia al tener que filtrar el resultado de la reacción, tratando con derivados insolubles, es más conveniente emplear como sustrato GpNA, ya que su hidrólisis es mucho más lenta (229).

Al trabajar con este tipo de derivados insolubles, la reacción directa en la cubeta del espectrofotómetro es muy compleja siendo necesario un sistema de agitación dentro de la misma cubeta, apareciendo entonces el fenómeno de "scatering", debido a las variaciones de absorbancia causadas por la agitación del derivado insoluble.

B) En condiciones de síntesis

1) Enzima libre

Se realizaron varios ensayos de estabilidad en condiciones generales de síntesis (**Sección III.5**) para estudiar la influencia del medio orgánico y de la temperatura en una hipotética desnaturalización de la enzima en dichos procesos. Para ello, se añadieron 20 ml de medio AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 97/3, (v/v) en un reactor tipo tanque agitado. Posteriormente, se adicionaron 1.5 mg de enzima libre (0.075 mg de enzima libre/ml), dejando incubar la mezcla a diferentes temperaturas 25, 37 y 50 °C, durante cierto tiempo. Transcurrido este, se incorporan al reactor 0.1334 g de *L*-Leu-NH₂, 112 µl de trietilamina, y 0.0627 g. de BTEE. Todo esto se termostató a 25 °C durante 24 h. y se tomaron muestras del reactor a diferentes tiempos para analizarlas por HPLC, como en el proceso general de síntesis descrito anteriormente (**Sección III.5**). Aunque la enzima se incubó a diferentes

temperaturas, el ensayo estándar de síntesis de péptidos se repitió en todos los casos a 25 °C, obteniéndose la velocidad inicial de conversión a péptido, la cual nos servirá para construir las curvas de desactivación enzimática, a partir del tiempo cero al cual consideraremos el 100% de actividad como valor obtenido de velocidad inicial.

2) Enzima inmovilizada

Se realizaron los mismos ensayos que en el caso de la enzima libre, salvo que en esta ocasión se empleó el derivado C6-CT (1.3 mg. de derivado/ml que equivalen a 0.113 mg de enzima/ml).

III.6.2.- ENSAYOS DE ABRASIÓN

Estos ensayos se llevaron a cabo con el fin de comprobar si existe parte de enzima no unida covalentemente al soporte, o bien para observar si en los procesos a los que se somete al derivado inmovilizado se produce alguna separación física de la enzima con respecto del soporte. De producirse estos fenómenos tendríamos resultados erróneos en el proceso estudiado. Según estos planteamientos se llevaron a cabo dos tipos de ensayos:

a) Ensayo en condiciones de síntesis.

Se tomaron 6 reactores tipo tanque agitado, a los que se les añadió 10 ml de medio AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M 97/3, (v/v), se dejaron agitando 15 minutos, pasado ese tiempo, se introdujeron 50 mg del derivado C5-CT en tres de ellos y otros 50 mg del derivado C6-CT en cada uno de los tres restantes, manteniéndose en agitación durante 24 h. Pasado ese tiempo se filtró el contenido a través de una placa vidrio Pyrex del nº 4.

1) 1 ml del filtrado se utilizó para llevar a cabo el estudio de la cantidad de proteína presente en el mismo, utilizando el método del Microbiuret descrito anteriormente (228) en el Apartado III.2.1.

2) 5 ml también del filtrado se adicionaron a 15 ml del mismo medio, junto con 0.0627 g de BTEE (10 mM), 0.1334 g de H-L-Leu-NH₂ (40 mM), y 112 μl de trietilamina, para comprobar la existencia o no de actividad en síntesis de la enzima presente la fase líquida, siguiendo la metodología descrita en el **Apartado III.5**.

b) Ensayo en condiciones de hidrólisis.

Para estudiar la influencia del medio acuoso en los posibles procesos de desorción de la enzima en condiciones de hidrólisis, se operó de manera análoga al caso anterior salvo que en esta ocasión el medio empleado fue tampón KH₂PO₄/K₂HPO₄, pH=7.8 (0.1 M) (10 ml), en ausencia de un co-disolvente orgánico.

Transcurridas 24 h de incubación se filtró el contenido del reactor y se realizaron:

1) El ensayo de cantidad de proteína presente en la fase líquida, con 1 ml del filtrado, empleando para ello, el método del Microbiuret (228) (**Sección III.2.1**).

2) El ensayo de actividad enzimática tuvo lugar en condiciones de hidrólisis con 4.5 ml del filtrado y 0.5 ml de GpNA (0.015 M en DMF) durante 25 minutos a 25 °C de temperatura, (como se describe en la **Sección III.3** al hablar de la actividad de la enzima comercial) (229).

III.6.3.- HIDRÓLISIS DE BTEE

III.6.3.1.- Estudio cinético del proceso de hidrólisis

Se llevó a cabo en las mismas condiciones en las que realizaríamos posteriormente los procesos de síntesis empleando como medio de reacción AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 2/1, (v/v). Como ejemplo se tomó el biocatalizador C5-CT (1.3 mg de derivado/ml, equivalente a 0.053 mg de enzima/ml) y a diferencia de los procesos de síntesis no se utilizó nucleófilo, solamente donador de acilo, (BTEE), cuya concentración se fue aumentando desde 5 hasta 90

mM.

El avance de la reacción se analizó por HPLC de la misma forma que se describe para los procesos de síntesis en la **Sección III.5**, cuantificando ahora la desaparición del sustrato (BTEE) con el tiempo.

III.6.3.2.- Influencia de la proporción de acetato de etilo/medio acuoso

Para conocer el comportamiento de nuestros derivados en los procesos de hidrólisis en función de la cantidad de agua presente en el medio se llevaron a cabo ensayos de hidrólisis empleando la misma cantidad de derivado con una concentración de donador de acilo 10 mM en reactor (0.0627 g) y el medio empleado fue diferente en cada caso, variando la relación AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, desde 99/1 hasta 10/90, (v/v). El progreso de la reacción se siguió como en el caso de los procesos sintéticos por HPLC empleando también el naftaleno como patrón interno.

III.6.4.- REACCIONES DE SÍNTESIS DE PÉPTIDOS CINÉTICAMENTE CONTROLADAS

III.6.4.1.- Variación de la concentración de enzima

Con la finalidad de estudiar el comportamiento en procesos de síntesis en el seno de disolventes orgánicos de los derivados preparados, sobre copolímeros de injerto primeramente centramos nuestro interés en determinar el intervalo de concentración de catalizador en el cual este presenta una actividad óptima para la síntesis de péptidos. Así variamos la concentración de los derivados C1-CT y C2-CT, desde 0.48 mg de enzima/ml hasta 0.044 mg de enzima/ml, para un volumen total de 20 ml. El medio empleado fue AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1M, en proporción 2/1, (v/v). Como donador de acilo se empleó BTEE (10 mM) y como nucleófilo H-L-Leu-NH₂ (40 mM).

Empleando estas condiciones llevamos a cabo las reacciones de síntesis a 25°C de temperatura siguiendo el esquema general descrito en la **Sección III.5**.

III.6.4.2.- Ensayos con diferentes sustratos

Como donadores de acilo se estudiaron el éster etílico de la N-benzoil-*L*-tirosina (BTEE), el éster etílico de la N-acetil-*L*-fenilalanina (APEE) y como nucleófilos *L*-leucinamida (H-*L*-Leu-NH₂) y *L*-alaninamida (H-*L*-Ala-NH₂) (en forma de clorhidrato por lo que también añadimos una cantidad equimolecular de trietilamina necesaria para neutralizar el HCl procedente del nucleófilo y no modificar el pH); la relación donador de acilo/nucleófilo empleada fue 1/4, (10 y 40 mM en reactor respectivamente). Estas reacciones tuvieron lugar en el seno de un sistema bifásico formado por AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, en proporciones 2/1, (v/v) usando como catalizador el derivado C1-CT (E=38.0% de injerto) (2.75 mg de derivado/ml, 0.24 mg de enzima/ml).

Para conocer la influencia del porcentaje de injerto con respecto a la reactividad de la enzima se realizó el mismo ensayo que en el párrafo anterior empleando como derivado C5-CT (E=54.5% de injerto), (1.3 mg de derivado/ml, equivalente a 0.053 mg de enzima/ml) y como medio AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 99/1, (v/v).

Además de estas reacciones se realizaron otras empleando el derivado C4-CT, (1.3 mg de derivado/ml, 0.24 mg de enzima/ml) como catalizador, BTEE (10 mM) como donador de acilo y como nucleófilos (40 mM): H-*L*-Leu-NH₂, H-*L*-Met-NH₂, H-*L*-Ser-NH₂, H-*L*-Gly-NH₂, H-*L*-Asp-NH₂, H-*L*-Arg-NH₂. El medio fue AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 97/3, (v/v).

El proceso se siguió como se detalla en la **Sección III.5.**

III.6.4.3.- Ensayos con diferentes disolventes

Para conocer el comportamiento de nuestros derivados y de la enzima libre frente al $\log P$ del disolvente (234), se llevaron a cabo reacciones en el seno de diferentes disolventes, tales como: 1,1,1-tricloroetano ($\log P=2.49$), acetato de etilo ($\log P=0.73$), etanol ($\log P= -0.32$), acetonitrilo ($\log P= -0.34$), 1.4-butanodiol ($\log P= -0.92$), N,N-dimetilformamida ($\log P= -1.01$), empleando BTEE (10 mM) como donador de acilo, H-*L*-Leu-NH₂ (40 mM) como nucleófilo y como catalizadores: a) C1-CT (2.75 mg de derivado/ml equivalente a 0.24 mg de enzima/ml) 99/1, (v/v), disolvente orgánico/Tris pH=9.0, 0.1 M, b) C5-CT (1.3 mg

de derivado/ml equivalente a 0.053 mg de enzima/ml) 97/3, (v/v), disolvente orgánico/Tris pH=9.0, 0.1 M, c) y la α -quimotripsina libre (0.075 mg de enzima/ml) 97/3, (v/v), disolvente orgánico/Tris pH=9.0, 0.1 M. El resto de condiciones son las mismas que las descritas en el **Apartado III.5**.

III.6.4.4.- Variación del porcentaje de disolvente

Es ampliamente reconocida la importancia de la cantidad de agua presente en el seno de la reacción para conseguir una buena relación péptido/ácido. Así, para profundizar en este aspecto se realizaron experimentos con los derivados: C1-CT, C2-CT, C3-CT y C4-CT (0.24 mg de enzima/ml) empleando diferentes proporciones de medio desde 99/1 hasta 2/1 (v/v), AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, y con el derivado C5-CT (0.053 mg de enzima/ml) siendo en este caso las proporciones de medio objeto de estudio; 99/1, 1/1, (v/v) y tampón Tris pH=9.0 0.1 M saturado con acetato de etilo.

En todos los casos los sustratos empleados fueron BTEE como donador de acilo y H-L-Leu-NH₂ como nucleófilo, en concentración 10 y 40 mM respectivamente. El resto de condiciones coincidieron con las del apartado anterior.

III.6.4.5.- Síntesis de péptidos a diferentes temperaturas

Se llevo a cabo la síntesis del dipéptido modelo Bz-L-Tyr-L-Leu-NH₂, empleando BTEE (10 mM) y H-L-leu-NH₂ (40 mM), como medio AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 99/1, (v/v). El derivado empleado en todas las reacciones fue C4-CT (1.3 mg de derivado/ml equivalente a 0.24 mg de enzima/ml), y el parámetro que se modificó en cada caso fue la temperatura de la reacción, realizando ensayos a 4, 25 y 37 °C, analizándose los resultados por HPLC como en los experimentos anteriores.

III.6.4.6.- Variación de la concentración de donador de acilo

Se realizó según se describe en la Sección III.5, teniendo en cuenta que en esta ocasión el parámetro que se modificó fue la concentración de donador de acilo (BTEE) desde 5 hasta 20 mM, manteniendo constante la concentración de nucleófilo (H-L-Leu-NH₂) en 40 mM. El derivado elegido fue C5-CT (1.3 mg de derivado/ml o lo que es lo mismo 0.053 mg de enzima/ml) en un medio AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 97/3 (v/v).

El progreso de las reacciones se siguió por HPLC según se describe en la Sección III.5.

III.6.4.7.- Variación de la concentración de nucleófilo

Para conocer la afinidad del nucleófilo por el complejo acil-enzima a lo largo del proceso, se llevó a cabo la síntesis del dipéptido modelo Bz-L-Tyr-L-Leu-NH₂, partiendo de BTEE (10 mM) y concentraciones crecientes de nucleófilo H-L-Leu-NH₂ desde 5 mM hasta 50 mM, como sustratos. Como medio se empleó AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 97/3, (v/v). El derivado que catalizó estas reacciones fue C5-CT (1.3 mg de derivado/ml equivalente a 0.053 mg de enzima/ml, en todos los casos).

El avance de las reacciones se siguió por HPLC según se describe en la Sección III.5.

III.6.5.- REACCIONES DE SÍNTESIS DE PÉPTIDOS TERMODINÁMICAMENTE CONTROLADAS

Estos ensayos se realizaron como los anteriores, empleando el derivado C5-CT (1.3 mg de derivado/ml equivalente a 0.053 mg de enzima/ml), el medio de reacción fue AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, y como donador de acilo se utilizó la N-acetil-L-tirosina en forma de ácido (10 mM), y como nucleófilo L-leucinamida en forma de clorhidrato (50 mM). Se aumenta la cantidad de nucleófilo para favorecer este tipo de reacciones.

III.6.6.- REACIONES MÚLTIPLES DE SÍNTESIS DE PÉPTIDOS Y POSTERIOR PURIFICACIÓN DE LOS MISMOS

III.6.6.1.- Reutilización de los derivados de α -quimotripsina inmovilizada sobre copolímeros

La forma más práctica para conocer si un derivado posee buenas propiedades mecánicas consiste en realizar ensayos de reutilización en las condiciones generales de síntesis, (Sección III.5) empleando los derivados C1-CT, C2-CT (0.24 mg de enzima/ml) en una proporción de disolvente orgánico, 4/1, (v/v) AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1M, y el derivado C4-CT (0.24 mg de enzima/ml) utilizando como medios de reacción; AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, y 1,1,1-tricloroetano/Tris pH=9.0, 0.1 M, 99/1, (v/v). Tras un primer ciclo de síntesis, se filtró a través de una placa de vidrio Pyrex del nº 4 el contenido del reactor, quedando el péptido y el derivado en la parte superior y pasando a los líquidos de lavado el resto de los componentes; el residuo sólido se lava con 50 ml de disolvente 3 veces, y posteriormente se vuelve a lavar con 50 ml de tampón otras 3 veces con el fin de eliminar al máximo el péptido y disolvente que pueda retener el derivado, para que continúe siendo activo en reacciones posteriores.

La toma de muestras y el avance de la reacción se siguió por HPLC como se describe en la Sección III.5.

III.6.6.2.- Síntesis consecutivas dentro del mismo reactor

A fin de conocer la posibilidad de reutilizar el catalizador sin necesidad de separarlo del seno de la reacción se diseñó una estrategia para llevar a cabo reacciones consecutivas dentro del mismo reactor. Así, la primera síntesis se realizó siguiendo la metodología general de síntesis, empleando como medio AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M 97/3, (v/v) V=20 ml, una relación donador de acilo (BTEE ó APEE)/nucleófilo (H-L-Leu-NH₂ ó H-L-Ala-NH₂) de 1/4, una cantidad de derivado C4-CT de 0.0253 g, (0.113 mg de enzima/ml) y 112 μ l de trietilamina, siguiendo el progreso de la reacción por HPLC. Una vez consumido todo el donador de acilo, en ese mismo reactor se adicionó la misma cantidad de donador de acilo

empleada en la primera síntesis; por otro lado, de nucleófilo se añadió la cuarta parte que en la primera síntesis para mantener la relación donador de acilo/nucleófilo en 1/4, y por lo tanto sólo se adicionaron 28 μ l de trietilamina, analizándose por HPLC el progreso de la reacción. Este ciclo consecutivo se repitió hasta 11 veces en el caso del dipéptido Bz-L-Tyr-L-Ala-NH₂.

III.6.6.3.- Purificación del péptido obtenido en las síntesis consecutivas

El péptido obtenido de la forma descrita en el apartado anterior es relativamente insoluble en el acetato de etilo, estando este disolvente casi saturado con un 3% de (Tris/HCl pH=9.0, 0.1 M) (el acetato de etilo saturado con ese tampón admite un $(3.91 \pm 0.05 \%)$ (v/v) de fase acuosa, medido por el método Karl-Fisher, en un aparato ATI ORIÓN AF8).

Primeramente, se añaden 50 ml de tampón (Tris/HCl pH=9.0, 0.1 M) a una ampolla de decantación que contiene el crudo de la reacción. La mezcla se agita varias veces y se separan las dos fases, repitiendo este proceso dos veces más; de esta forma, a la fase acuosa pasan las sales del ácido fruto de las reacciones secundarias de hidrólisis, el exceso de nucleófilo que no reacciona y el clorhidrato de trietilamina. En la fase orgánica se encuentran tanto el dipéptido como el derivado inmovilizado, ambos suspendidos, más algunas trazas de éster (soluble en acetato de etilo) sin reaccionar que se eliminan lavando otras tres veces con acetato de etilo y filtrando a través de una placa de vidrio Pyrex del n° 4.

Para separar el dipéptido del derivado enzimático, se añaden 25 ml de DMF y se filtra lentamente. Esta operación se repite otras dos veces, y así conseguimos separar el dipéptido del derivado enzimático, ya que este último no es soluble en DMF. Para eliminar el disolvente la mezcla se concentra a vacío a 50 °C con la ayuda de tolueno, que forma un azeótropo con DMF. Posteriormente, el sólido de color blanquecino se congela y se liofiliza durante 48 horas.

III.7.- ENSAYOS REALIZADOS CON DERIVADOS DE α -QUIMOTRIPSINA INMOVILIZADA SOBRE GELES DE AGAROSA

III.7.1.- HIDRÓLISIS DE BTEE

III.7.1.1.- Estudio cinético del proceso de hidrólisis

Se realizaron exactamente los mismos ensayos que con los derivados inmovilizados sobre copolímeros de injerto descritos en la **Sección III.6.3.1**, salvo que en esta ocasión los catalizadores fueron AGU2-CT y AGM1-CT (8.85 mg de derivado/ml, equivalentes a 0.076 mg de enzima/ml en reactor, en ambos casos). También, al igual que ocurría anteriormente con el otro grupo de derivados, se empleó BTEE como sustrato, variando su concentración desde 5 hasta 90 mM en reactor.

III.7.1.2.- Influencia de la proporción de medio acetato de etilo/medio acuoso

Para conocer el comportamiento de los derivados preparados empleando como soporte geles de agarosa en los procesos de hidrólisis, en función de la cantidad de agua presente en el medio, se emplearon 0.177 g de los derivados AGU2-CT y AGM1-CT (0.076 mg de enzima/ml) en cada reacción y la concentración de donador de acilo empleada fue 10 mM en reactor (0.0627 g de BTEE). En este tipo de reacciones, de hidrólisis, obviamente no se empleó nucleófilo y el medio usado fue diferente en cada caso, variando la relación AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M desde 99/1 hasta 10/90 (v/v). El progreso de la reacción se siguió como en el caso de los procesos sintéticos por HPLC empleando también el naftaleno como patrón interno.

III.7.2.-REACCIONES DE SÍNTESIS DE PÉPTIDOS CINÉTICAMENTE CONTROLADAS. EFECTO DE DIVERSAS VARIABLES.

III.7.2.1.- Variación de la cantidad de enzima añadida

Para estudiar la influencia en el proceso de síntesis de la concentración de catalizador se realizaron varios ensayos con el derivado AGU1-CT, en los que la cantidad de enzima presente en el reactor varió desde 0.48 mg de enzima/ml hasta 0.044 mg de enzima/ml (desde 0.354 g hasta 0.031 g de derivado), para un volumen total de 20 ml. El medio empleado fue AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1M en proporciones 2/1, (v/v). Como donador de acilo se empleó BTEE (10 mM) y como nucleófilo H-L-Leu-NH₂ (40 mM).

Empleando estas condiciones se llevaron a cabo las reacciones de síntesis a 25°C de temperatura siguiendo el esquema general descrito en la **Sección III.5**.

III.7.2.2.- Ensayos con diferentes sustratos

Como donadores de acilo se emplearon el éster etílico de la N-benzoil-L-tirosina (BTEE), el éster etílico de la N-acetil-L-fenilalanina (APEE) y como nucleófilos L-leucinamida (H-L-Leu-NH₂) y L-alaninamida (H-L-Ala-NH₂) en forma de clorhidrato, por lo que también añadimos una cantidad equimolecular de trietilamina para neutralizar el HCl procedente del nucleófilo y no variar el pH. La relación donador de acilo/nucleófilo empleada fue (1/4), 10 y 40 mM en reactor respectivamente.

Los disolventes utilizados en estos experimentos fueron 1,1,1-tricloroetano y la metilisobutilcetona en proporciones 99/1, (v/v) disolvente orgánico/Tris pH=9.0, 0.1 M.

El derivado empleado en todos los casos fue AGU1-CT (8.85 mg de derivado/ml equivalentes a 0.24 mg de enzima/ml). El desarrollo del proceso sigue el esquema general (**Sección III.5**)

III.7.2.3.- Ensayos con diferentes disolventes

También como en el caso de los derivados obtenidos con copolímeros de injerto el disolvente habitual fue acetato de etilo ($\log P=0.73$), empleando como medio acuoso tampón (Tris/HCl pH=9.0, 0.1 M), en proporción disolvente orgánico/tampón de 99/1, (v/v), aunque también se han empleado puntualmente para estudiar la influencia del $\log P$; 1,1,1-tricloroetano ($\log P=2.49$), metilisobutilcetona ($\log P=1.38$), 1,4-butanodiol ($\log P= - 0.92$), N,N-dimetilformamida ($\log P= - 1.01$), (234), empleando BTEE (10 mM) como donador de acilo y H-L-Leu-NH₂ (40 mM) como nucleófilo, el derivado utilizado fue AGU1-CT (8.85 mg de derivado/ml, o lo que es lo mismo 0.24 mg de enzima/ml) como catalizador del proceso. El resto de condiciones son las mismas que las descritas en la **Sección III.5**.

III.7.2.4.- Variación del porcentaje de disolvente

Se han llevado a cabo por un lado reacciones con el derivado AGU1-CT empleando diferentes concentraciones de derivado (1.6, 3.6, 8.85 mg de derivado/ml, o lo que es lo mismo, 0.044, 0.097, 0.24 mg de enzima/ml), utilizando como medio de reacción AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M en distintas proporciones 99/1, 4/1, 2/1 y 1/1, (v/v); los sustratos empleados fueron BTEE como donador de acilo y como nucleófilos H-L-Leu-NH₂ y H-L-Ala-NH₂ en concentración 10 mM (donador de acilo) y 40 mM (nucleófilo).

Por otro lado, empleando los derivados AGU2-CT y AGM1-CT (8.85 mg de derivado/ml equivalentes a 0.076 mg de enzima/ml en todos los casos), se realizaron experimentos similares en los que el medio fue AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M en distintas proporciones 97/3, 1/1, (v/v) y tampón Tris/HCl pH=9.0, 0.1 M saturado con acetato de etilo, utilizando como sustratos BTEE (10 mM) y H-L-Leu-NH₂ (40 mM).

El resto de condiciones coincidieron con las del **Apartado III.5**.

III.7.2.5.- Variación de la concentración de donador de acilo

Se realizó siguiendo las directrices de la **Sección III.5** modificando en esta ocasión la

concentración de donador de acilo (BTEE) desde 5 mM hasta 20 mM, manteniendo constante la concentración de nucleófilo (H-L-Leu-NH₂) en 40 mM. Los derivados empleados también fueron AGU2-CT y AGM1-CT (8.85 mg de derivado/ml o lo que es lo mismo 0.076 mg de enzima/ml), y como medio se utilizó AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M 97/3 (v/v).

III.7.2.6.- Variación de la concentración de nucleófilo

Como en el caso de los derivados de α -quimotripsina inmovilizada sobre copolímeros de injerto se varió la concentración de nucleófilo (H-L-Leu-NH₂) desde 5 mM hasta 50 mM, manteniendo constante la concentración de donador de acilo BTEE (10 mM).

Como medio se empleó AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 97/3, (v/v). Los derivados que catalizaron estas reacciones fueron AGU2-CT y AGM1-CT (8.85 mg de derivado/ml, 0.076 mg de enzima/ml, en todos los casos).

El avance de las reacciones se siguió por HPLC según se describe en la **Sección III.5.**

III.7.3.- REACCIONES DE SÍNTESIS DE PÉPTIDOS TERMODINÁMICAMENTE CONTROLADAS

Estos ensayos se realizaron con los derivados AGU2-CT y AGM1-CT (8.85 mg de derivado/ml, 0.076 mg de enzima/ml), empleando como medio de reacción AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 97/3, (v/v), como donador de acilo se utilizó la N-acetil-L-tirosina (Ac-L-Tyr-OH) (10 mM), y como nucleófilo L-leucinamida en forma de clorhidrato (50 mM). La cantidad de nucleófilo es mayor que la empleada en las reacciones que transcurren bajo control cinético ya que aumentando la concentración de uno de los sustratos se obtienen mejores rendimientos (235).

III.8.- REACCIONES CON SUSTRATOS NO NATURALES

III.8.1.- SÍNTESIS QUÍMICA DE LOS ÉSTERES, SUSTRATOS DE LAS REACCIONES ENZIMÁTICAS

a) Los sustratos fueron los siguientes ésteres: N-(4-clorobutanoil)-L-triptofanato de metilo, N-(3-indolilmetil)glicinato de etilo, (*Cis* 1,3) 1-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1H- β -carbolina-3-carboxilato de metilo, que fueron suministrados por el grupo de la Dra. Avendaño.

b) Los ésteres etílicos racémicos de los ácidos: ác. (\pm)-2-fenilbutírico, ác. (\pm)-3-fenilbutírico, ác. (\pm) tetrahydrofurano-2-carboxílico, ác. (\pm) tetrahydrofurano-3-carboxílico y el ác. (\pm) 1,2,3,4-tetrahydroisoquinolina-3-carboxílico, fueron sintetizados siguiendo el siguiente protocolo general:

A una suspensión de 0.6 moles del correspondiente ácido en 200 ml de etanol se adiciona, a temperatura ambiente, gota a gota y con agitación, 0.12 moles de cloruro de tionilo. La mezcla se refluje durante 12 horas; pasado este tiempo, se concentra a sequedad y se añaden 200 ml de cloroformo saturado en amoníaco. La agitación se mantiene durante 2 horas, para a continuación filtrar a través de un filtro de pliegues. La concentración a sequedad del filtrado conduce a la obtención de los ésteres etílicos de los ácidos correspondientes, que se purifican redisolviendo el contenido sólido resultante de la concentración, en diclorometano (50 ml), a los que se adicionaron otros (3×50) ml de una solución alcalina de bicarbonato potásico (1 M), agitando cada vez convenientemente. Posteriormente se dejó reposar, para lograr la separación de ambas fases y así decantar a continuación. A la fase orgánica resultante de la tercera decantación, en la cual se encuentran los ésteres, se la sometió otra vez a la acción del rotavapor, para obtener el éster puro que se liofilizó, para someterle a las pruebas de análisis.

c) Los ésteres (*R*) mandelato de etilo, (*S*) mandelato de etilo, (*R,S*) mandelato de etilo, (*R,S*) mandelato de bencilo y (*R,S*) mandelato de isoamilo, fueron suministrados por el grupo del Dr. Guisán.

III.8.2.- HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA EMPLEANDO SUSTRATOS NO CONVENCIONALES

Los dos primeros grupos de ésteres del apartado anterior se intentaron hidrolizar empleando enzima nativa y los derivados inmovilizados, sometiéndolos a dos metodologías de hidrólisis diferentes:

a) Condiciones de hidrólisis similares a las descritas por Salvador *y cols.* (209) en la hidrólisis del éster etílico de la N-benzoil-L-tirosina, con la enzima libre y con derivados de α -quimotripsina inmovilizada sobre agarosa.

Las reacciones se llevaron a cabo a 25 °C, en un reactor tipo tanque agitado empleando:

- 10 ml de DMF.
- 10 ml de tampón Tris/HCl pH=9.0 0.1 M.
- 10 mM de sustrato.
- 5 mg de α -quimotripsina libre.

El avance de la reacción se siguió por HPLC, como en el caso general de síntesis (**Apartado III.5**). A diferencia de lo descrito en esa Sección la muestra (200 μ l) fue recibida en un vial que contenía solamente 800 μ l de acetonitrilo. La absorbancia fue leída a una longitud de onda de 220 nm, en el caso de los derivados de los ácidos del tetrahydrofurano, el resto de sustratos, que si poseen algún resto aromático, se analizaron a 254 nm, de forma similar a la metodología estándar.

El porcentaje de hidrólisis se calculó a partir del área del pico de éster a tiempo cero, (antes de añadir la enzima), que representa el 100% del sustrato.

b) En busca de mejores resultados se utilizaron condiciones más drásticas, aumentando el porcentaje de agua presente en la reacción, empleando como disolvente orgánico acetato de etilo.

1) Enzima libre

Las condiciones de reacción fueron:

- 50 mM de sustrato.

- 20 ml de Tris/HCl pH=9.0 0.1 M saturado con acetato de etilo (el agua pura saturada con acetato de etilo admite hasta un 8% (v/v) (236).

- 5 mg de α -quimotripsina libre.

Para el análisis del curso de la reacción se siguió el esquema anterior.

Como los resultados mejoraron se empleó este segundo método con el grupo de los mandelatos y con los derivados inmovilizados sobre copolímeros y geles de agarosa.

2) Enzima inmovilizada

Los ensayos se realizaron exactamente igual que en el caso de la enzima libre, a diferencia del catalizador; empleando el derivado C5-CT (1.3 mg de derivado/ml equivalentes a 0.053 mg de enzima/ml) como derivado inmovilizado sobre copolímeros de injerto y AGM1 (8.85 mg de derivado/ml equivalentes a 0.076 mg de enzima/ml), como representante de los derivados inmovilizados sobre geles de agarosa.

IV.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1.- ENSAYOS CON LOS DERIVADOS DE α -QUIMOTRIPSINA SOBRE COPOLÍMEROS DE INJERTO.

IV.1.1- CARACTERÍSTICAS DE LOS DERIVADOS DE α -QUIMOTRIPSINA INMOVILIZADA SOBRE COPOLÍMEROS.

Siguiendo las pautas para la obtención de derivados de α -quimotripsina inmovilizada sobre copolímeros, descritas en la Parte Experimental en las Secciones III.3, se han logrado sintetizar varios derivados (Tabla 16) empleando los soportes de (PE/HEMA) con diferente porcentaje de injerto (referido a la masa total de copolímero) y con características de carga enzimática, activación del soporte, porcentaje de hidrólisis y actividad retenida muy dispares entre sí, lo que nos proporcionará la posibilidad de un estudio de la influencia de estos parámetros en las propiedades catalíticas de nuestros derivados.

En la Tabla 16 aparecen las propiedades de los soportes y de los derivados ordenados según su porcentaje de injerto y de hidrólisis.

Tabla 16.- Características de los derivados de α -quimotripsina inmovilizada sobre copolímeros.

	En.	Der.	PROPIED. DEL SOPORTE			PROPIED. DEL DERIVADO		
			% In. ^a	% Hid.	Act. ^b	Carga ^c	Act. R. ^c	Act. Esp. ^f
I	1	C2-CT	32.1	89.0	2.20	33.3 ^c	1.2	(0.36 ± 0.06)
	2	C1-CT	38.0	41.6	1.21	87.2 ^c	14.8	(4.26 ± 0.04)
	3	C3-CT	49.2	15.3	0.58	38.7 ^d	41.1	(2.28 ± 0.02)
II	4	C5-CT	54.5	68.0	2.80	42.0 ^d	40.0	(4.2 ± 0.1)
	5	C4-CT	54.5	28.6	1.20	189.2 ^d	34.0	(2.10 ± 0.06)
	6	C6-CT	54.5	14.3	0.60	89.4 ^d	60.2	(3.72 ± 0.02)

^a Calculado en función de la masa total de soporte $(\text{HEMA}/(\text{HEMA}+\text{PE})) \times 100$. Otros autores emplean: $(\text{HEMA}/\text{PE}) \times 100$ (218, 219). Nosotros pensamos que la primera forma induce menos a error.

^b mmol COOH g⁻¹ copolímero.

^c mg proteína g⁻¹ copolímero (determinado por el método de Lowry) (237).

^d mg proteína g⁻¹ copolímero (determinado por el método del Microbiuret). (228)

^e (mg de enzima activa/mg de enzima unida) $\times 100$, en hidrólisis de GPNA (229).

^f Actividad específica calculada por el método del GpNA, ($\mu\text{M min.}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de enz.).

I) Derivados obtenidos por inmovilización en un solo paso "one pot", (Sección III.3.2).

II) Derivados obtenidos por inmovilización de forma secuencial, (Sección III.2.1).

Analizando los datos expuestos en esta **Tabla 16** podemos afirmar que se ha obtenido uno de los derivados con mayor carga enzimática descritos actualmente en la bibliografía, por el grupo de la Dra. Gil sobre este tipo de polímeros (2.2-8.8 mg de enzima/g de copolímero) (218, 219). Asimismo hemos superado la carga enzimática descrita por Alcántara y cols para los geles acrílicos (0.6 mg de α -quimotripsina/ml de gel) (238). Por lo que se refiere al tradicional método de inmovilización sobre agarosa también superamos los resultados descritos por Nilsson y Mosbach (160) (70-89 mg de enzima/g de gel), e incluso es mayor que la que presentan los derivados descritos por Guisán y cols (230), los cuales consiguieron aproximadamente 160 mg de enzima/g de gel de agarosa al 10% de entrecruzamiento, mientras que nosotros hemos logrado inmovilizar 189.2 mg de enzima/g de copolímero en el caso del derivado C4-CT (entrada 5).

La α -quimotripsina tiene un radio de Stokes de aproximadamente 20-22 Å, así se le puede suponer un área externa de 6000 Å², con lo que cada molécula de enzima puede sólo contactar con el soporte activado (superficie plana) a través de un 10-20% de su superficie (por ejemplo, 1200 Å²). Así los 189.2 mg de enzima/g de copolímero del derivado C4-CT ocuparían aproximadamente 55 m² (232), siendo este valor superior a la superficie específica del polímero 0.12 m². Esto indicaría una unión en multicapa tal y como se ve en la foto de microscopia electrónica que aparece en la **Figura 25d**.

A la luz de los resultados mostrados en la **Tabla 16** y **Figuras 21** y **22**, podemos obtener las siguientes conclusiones:

1) Parece existir un valor óptimo de activación, en torno a 1.2 mmoles de grupos COOH g^{-1} de copolímero, para ambas series de derivados (metodología en un solo paso (entradas 1-3), que se corresponden con porcentajes de injerto inferiores al 50%, y metodología secuencial (entradas 4-6))

2) Para valores semejantes de activación, derivados con un mayor porcentaje de injerto conducen a cargas enzimáticas mayores. Esto es lógico, habida cuenta de que al aumentar el porcentaje de injerto, se incrementa la cantidad de grupos HEMA en el conjunto del soporte y se eleva la hidrofilia del derivado, con la consiguiente facilidad de acercamiento de la proteína al soporte.

3) La metodología en un solo paso conduce a derivados con menor actividad retenida que los obtenidos empleando la vía secuencial, para valores similares de activación, tal y como se observa en la **Figura 21**.

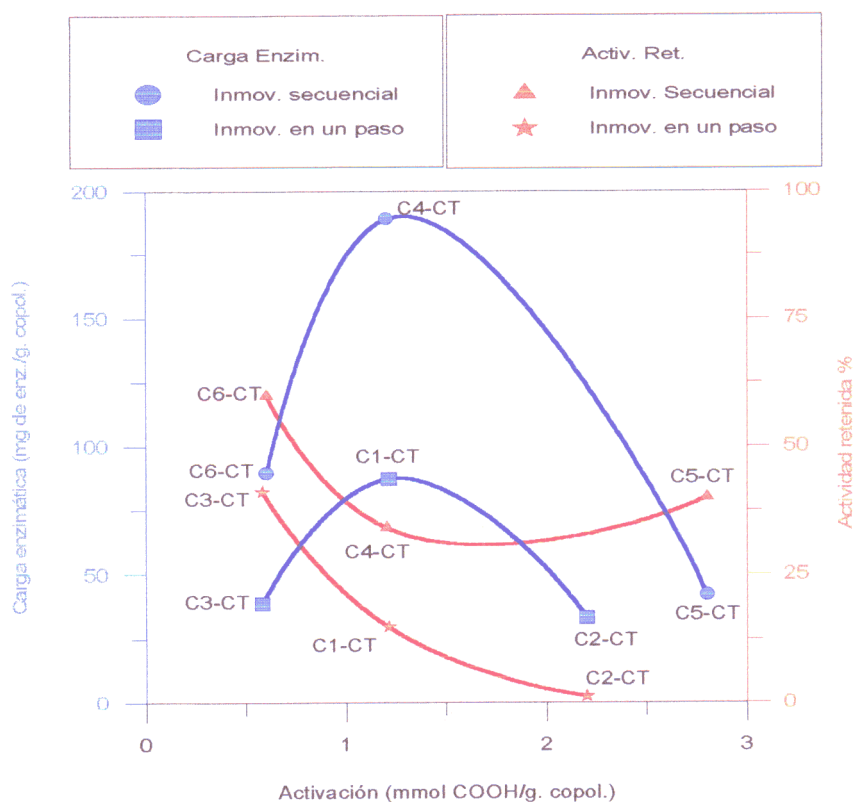


Figura 21.- Influencia de la activación de los soportes y de la actividad retenida sobre la carga enzimática para ambas metodologías de inmovilización (en un solo paso y secuencial).

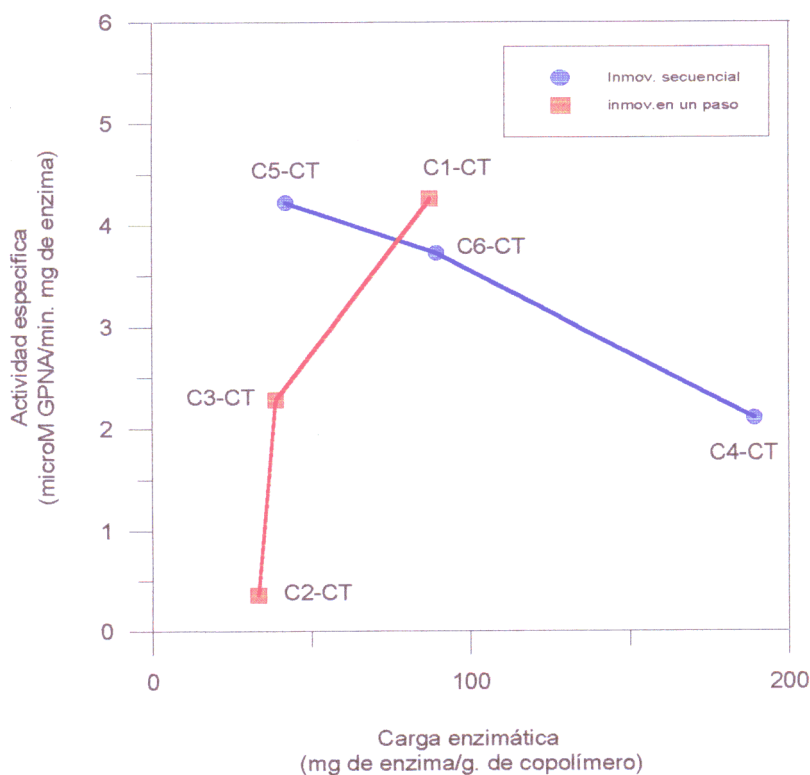


Figura 22.- Influencia de la carga enzimática sobre la actividad específica para ambas metodologías de inmovilización (en un solo paso y secuencial).

4) A medida que aumenta la activación, disminuye la actividad retenida, para ambas series (Figura 21). Este hecho podría atribuirse al aumento en la rigidez enzimática como consecuencia de una mayor densidad de grupos activos (-COOH), y por tanto capaces de llevar a cabo interacciones multipuntuales enzima-soporte tal y como se ha descrito para derivados de α -quimotripsina inmovilizada sobre geles de agarosa (232).

5) Para los derivados obtenidos por la metodología en un solo paso (Tabla 16, entradas 1-3), se observa que a medida que aumenta la carga enzimática, la actividad específica aumenta, mientras que se observa un efecto contrario para el caso de los derivados obtenidos de forma secuencial (entradas 4-6), donde un incremento de la carga enzimática se traduce en una disminución de la actividad específica, coincidiendo los valores para los casos de C1-CT y C6-CT (Figura 22).

Los resultados obtenidos para los derivados originados vía inmovilización secuencial nos están indicando la existencia de problemas difusionales, en aquellos derivados altamente

cargados (C4-CT), de manera que no toda la enzima soportada está actuando catalíticamente, lo que podría llevar a pensar en interacciones proteína-proteína (proceso de agregación o aglomeración). Por contra, para los derivados obtenidos en un solo paso, estos problemas no parecen ser tan drásticos.

Dado que no se apreciaban unas gradaciones claras en las propiedades de los catalizadores (**Tabla 16**), pensamos que esto podría deberse a la presencia de diferentes micromorfologías en los derivados.

6) La actividad enzimática retenida (**Tabla 16**) es claramente superior a la descrita previamente por el grupo de la Dra. Gil (2.2-4.1)% (218, 219), y por el grupo del Dr. Mosbach (11-13)% (160), si bien menor que la descrita por el grupo del Dr. Guisán (85-100)% (230) a lo que contribuye de forma fundamental la composición del soporte, geles de agarosa (hidrófilo), que facilitan la actividad hidrolítica frente a uno hidrófobo como el nuestro tal y como veremos más adelante.

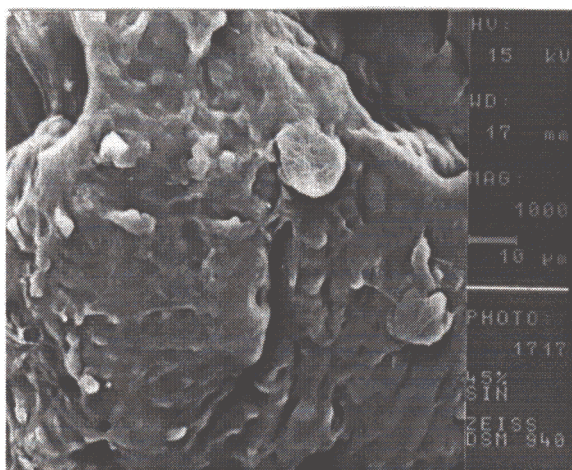
Para conocer el aspecto micromorfológico de estos derivados se realizaron fotografías de microscopía electrónica, las cuales aparecen ordenadas según el porcentaje de injerto del soporte en las **Figuras 23, 24 y 25**.

En ellas podemos apreciar como:

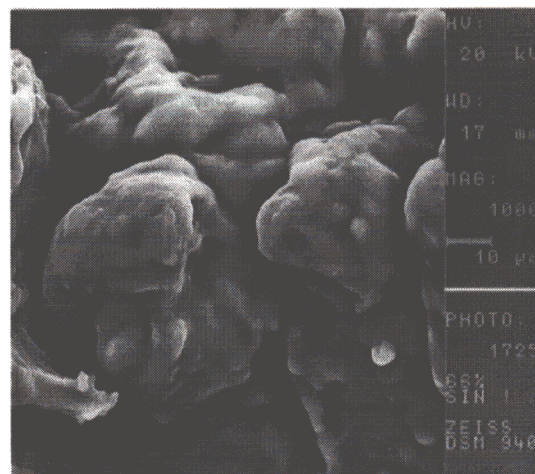
a) El proceso de hidrólisis cambia ostensiblemente la morfología del soporte, induciendo la aparición de estructuras con mayor superficie, ya que con la hidrólisis (**Sección III.3.1.2**) aparecen grupos cargados negativamente (COO^-) dentro del soporte, originándose fuerzas de repulsión entre estos grupos y las cadenas hidrofóbicas de polietileno, (**Figuras 23 y 24**).

b) Por otra parte, a medida que aumenta el porcentaje de injerto aparecen estructuras menos compactas ya que se separan las cadenas de polietileno, pues se incrementan los grupos que originan el entrecruzamiento, dando lugar a una clara estructura reticular (Fotografía del derivado C4-CT) (**Figura 25d**).

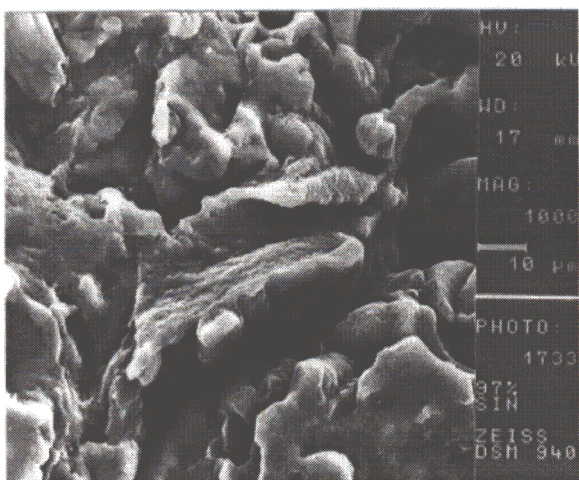
c) En la **Figura 25** se observan claramente los agregados de moléculas de enzima que aparecen señaladas con una flecha, presentando esta una estructura esférica. Estos agregados en multicapa presentan mayor tamaño, lógicamente, en aquellos derivados con mayor carga enzimática



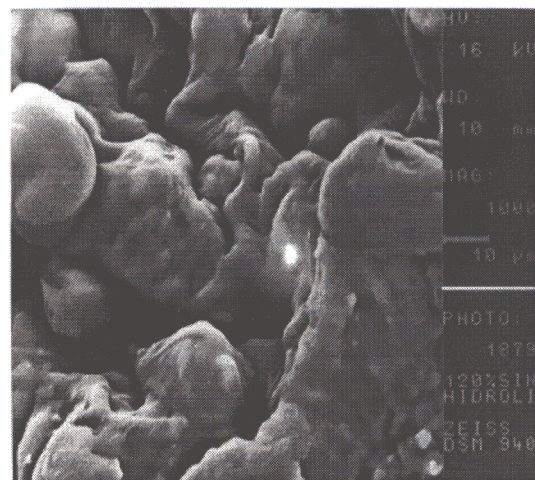
a)



b)

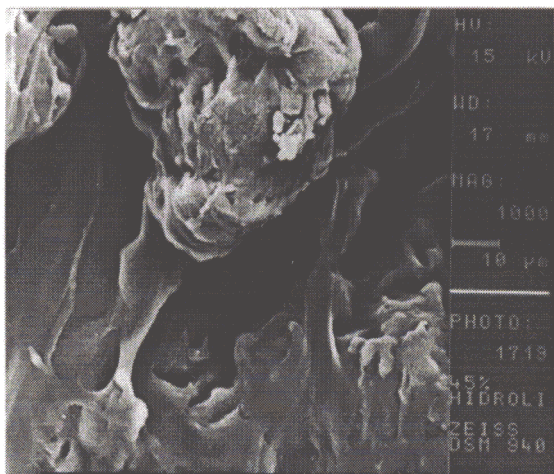


c)

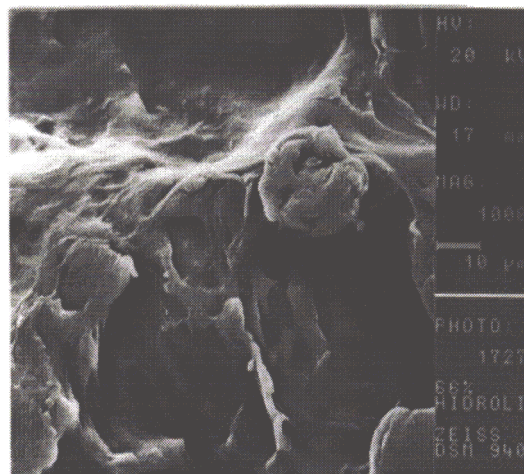


d)

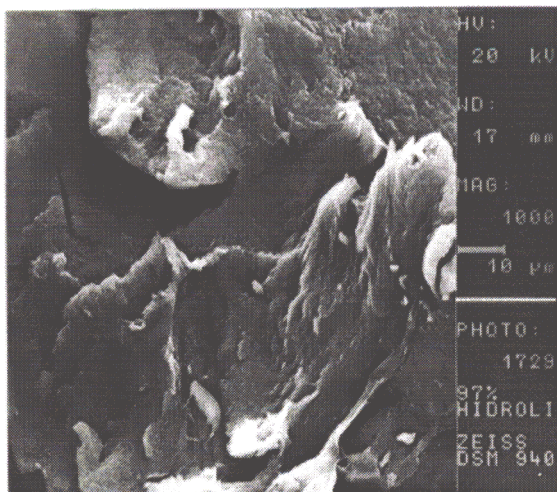
Figura 23.- Fotografías de microscopia electrónica a 1000 aumentos de los soportes sin hidrolizar. a) 32.1% de injerto; b) 38.0% de injerto; c) 49.2% de injerto; d) 54.5% de injerto.



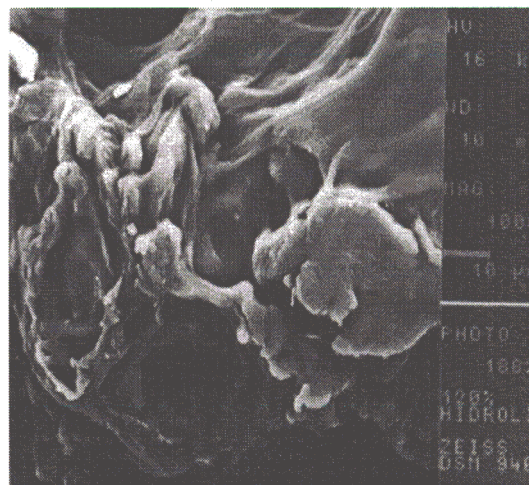
a)



b)



c)



d)

Figura 24.- Fotografías de microscopia electrónica a 1000 aumentos de los soportes hidrolizados. a) 32,1% de injerto; b) 38,0% de injerto; c) 49,2% de injerto; d) 54,5% de injerto.

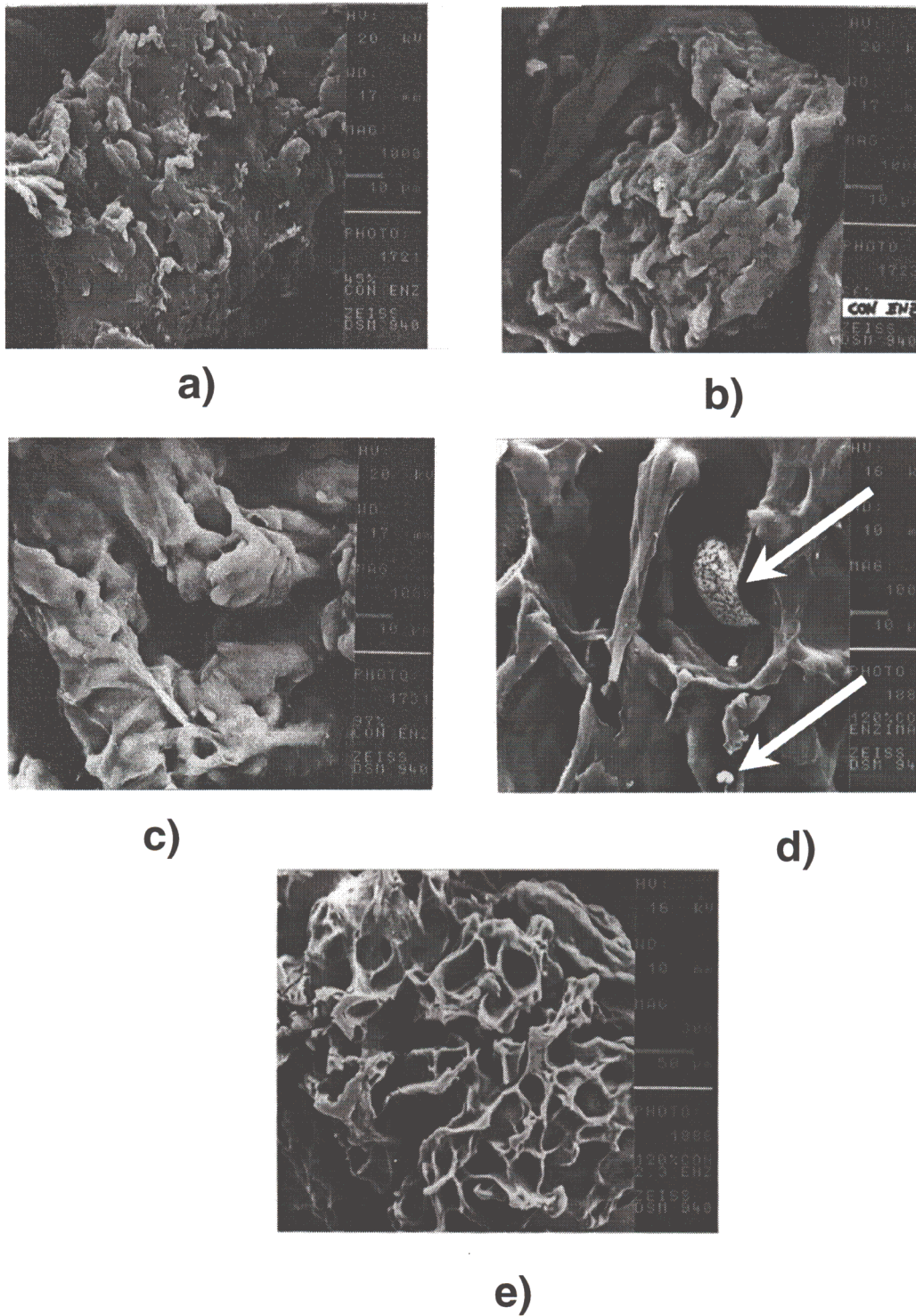


Figura 25.- Fotografías de microscopia electrónica a 1000 aumentos de los derivados inmovilizados sobre copolímeros de injerto. a) C2-CT; b) C1-CT; c) C3-CT; d) C4-CT; e) C5-CT (300 aumentos).

A la vista de todas estas fotografías podemos concluir que estos soportes no presentan una morfología homogénea, a diferencia de lo que sucede con otros derivados (Novozym 435) (239), que presentan una estructura esférica perfecta. Este hecho hace que no se obtengan gradaciones claras de propiedades. En general se puede afirmar que los derivados inmovilizados sobre copolímeros (PE/HEMA) presentan una estructura mas o menos reticular, siendo esta más clara cuando el porcentaje de injerto es elevado. Ello explica las diferentes propiedades obtenidas en los catalizadores objeto de estudio.

IV.1.2.- ESTUDIO DE LA RESISTENCIA A LA DESACTIVACIÓN

IV.1.2.1.- Estudio en condiciones de hidrólisis en sistemas sin agitación.

Estos ensayos se realizaron en primer lugar con la enzima libre (que se tomó como referencia) para posteriormente llevar a cabo estudios semejantes con los derivados inmovilizados:

a) Enzima libre

Se han realizado estudios de la estabilidad de la enzima libre almacenada en diferentes tampones:

- 1) ác. citrato/citrato sódico 0.05 M pH=3.0.
- 2) ác. bórico/NaOH 0.05 M pH=9.0.
- 3) ác. bórico/NaOH 0.05 M pH=9.0 con un 10% de N,N-dimetilformamida (v/v).

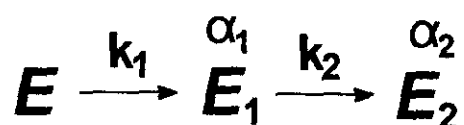
Las temperaturas empleadas fueron 2, 25, 37 y 50 °C, tal y como se recoge en la **Sección III.6.1.**

En las **Figuras 26 y 27** se muestra el comportamiento de la α -quimotripsina en las condiciones arriba citadas. Estas se eligieron al ser las condiciones normales de almacenamiento (pH=3.0) y las condiciones generales de síntesis de péptidos (pH=9.0). Dado que la DMF es un disolvente miscible con agua, comúnmente empleado en síntesis de péptidos (209, 233, 240, 241), se analizó también el efecto que produce un 10% de DMF en la

estabilidad de la enzima.

En todos los casos, la enzima se almacenó en el medio sin agitación, aspecto este de gran importancia a la hora de estudiar la estabilidad de la α -quimotripsina (242), sobre el que profundizaremos posteriormente. La actividad enzimática se midió cuantificando la hidrólisis del BTpNA (Parte Experimental Sección III.6.1), como reacción estándar.

Henley y Sadana (243) han descrito numerosos modelos (14 casos) de desactivación enzimática, considerando el siguiente esquema general, en el que la enzima puede desactivarse a través de un estado intermedio:



donde k_1 y k_2 son las constantes de cinéticas de desactivación; E, E_1 y E_2 representan la actividad específica de la enzima y de los intermedios que aparecen en la desactivación; α_1 y α_2 son las relaciones entre las actividades específicas E_1/E y E_2/E respectivamente. Estos autores asumen que la actividad enzimática, A, a un tiempo determinado t es el promedio de las actividades específicas de cada estado (ecuación [23]), siendo E_0 la actividad inicial a tiempo $t=0$.

$$A = \frac{(E) + (E_1 \times \alpha_1) + (E_2 \times \alpha_2)}{E_0} \quad [23]$$

Esta actividad puede escribirse en función de los parámetros iniciales como en la expresión [24], ecuación en la que se asumen decrecimientos exponenciales para describir la desactivación y donde α_1 y α_2 se expresan en tanto por ciento:

$$A = \alpha_2 + \left[100 + \frac{\alpha_1 \times k_1 - \alpha_2 - k_2}{k_2 - k_1} \right] \times e^{-k_1 t} + \left[\frac{\alpha_2 \times k_1 - \alpha_1 - k_1}{k_2 - k_1} \right] \times e^{-k_2 t} \quad [24]$$

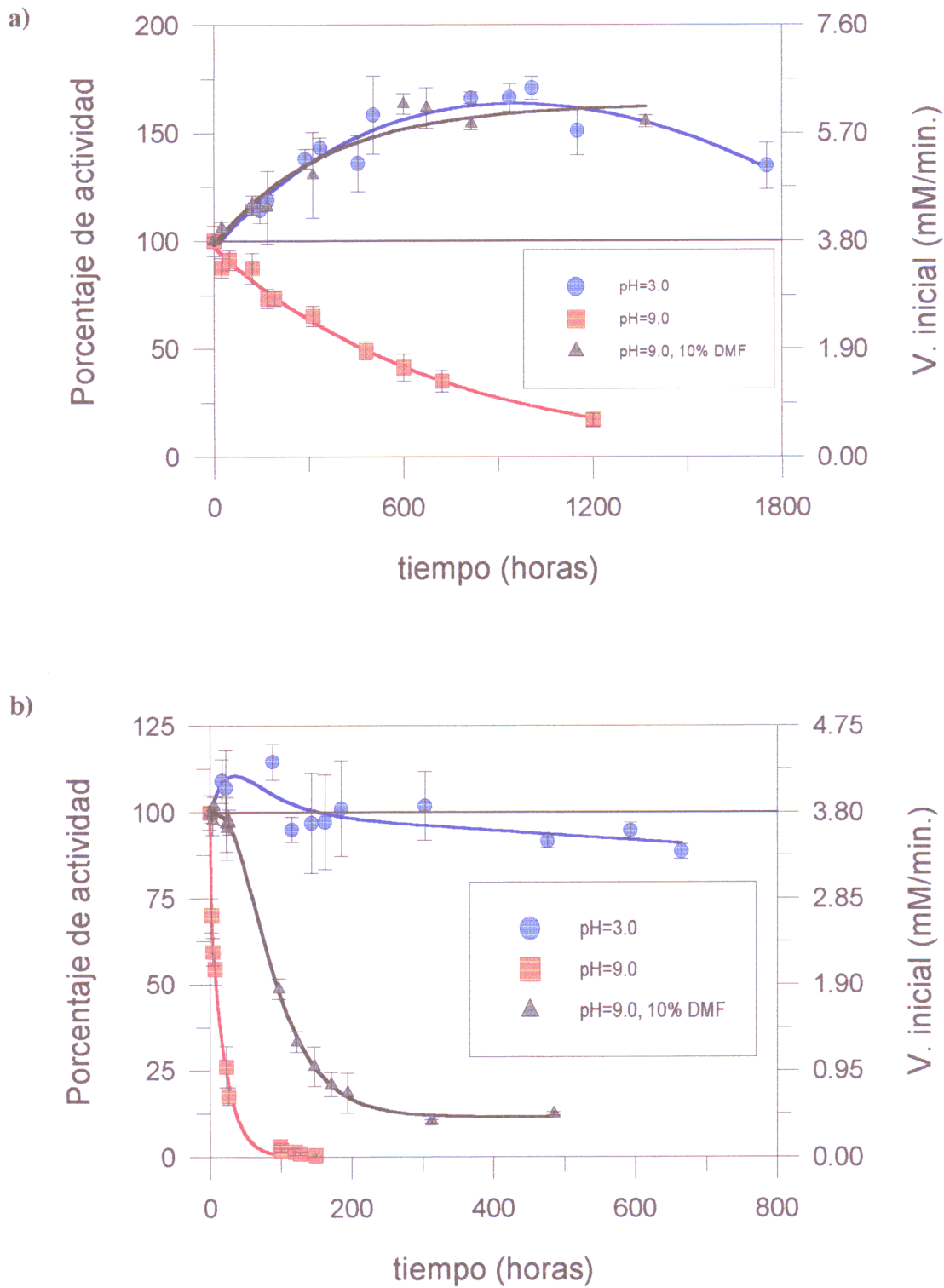


Figura 26.- Estabilidad de la enzima libre, en sistemas sin agitación. a) 2 °C; b) 25 °C.

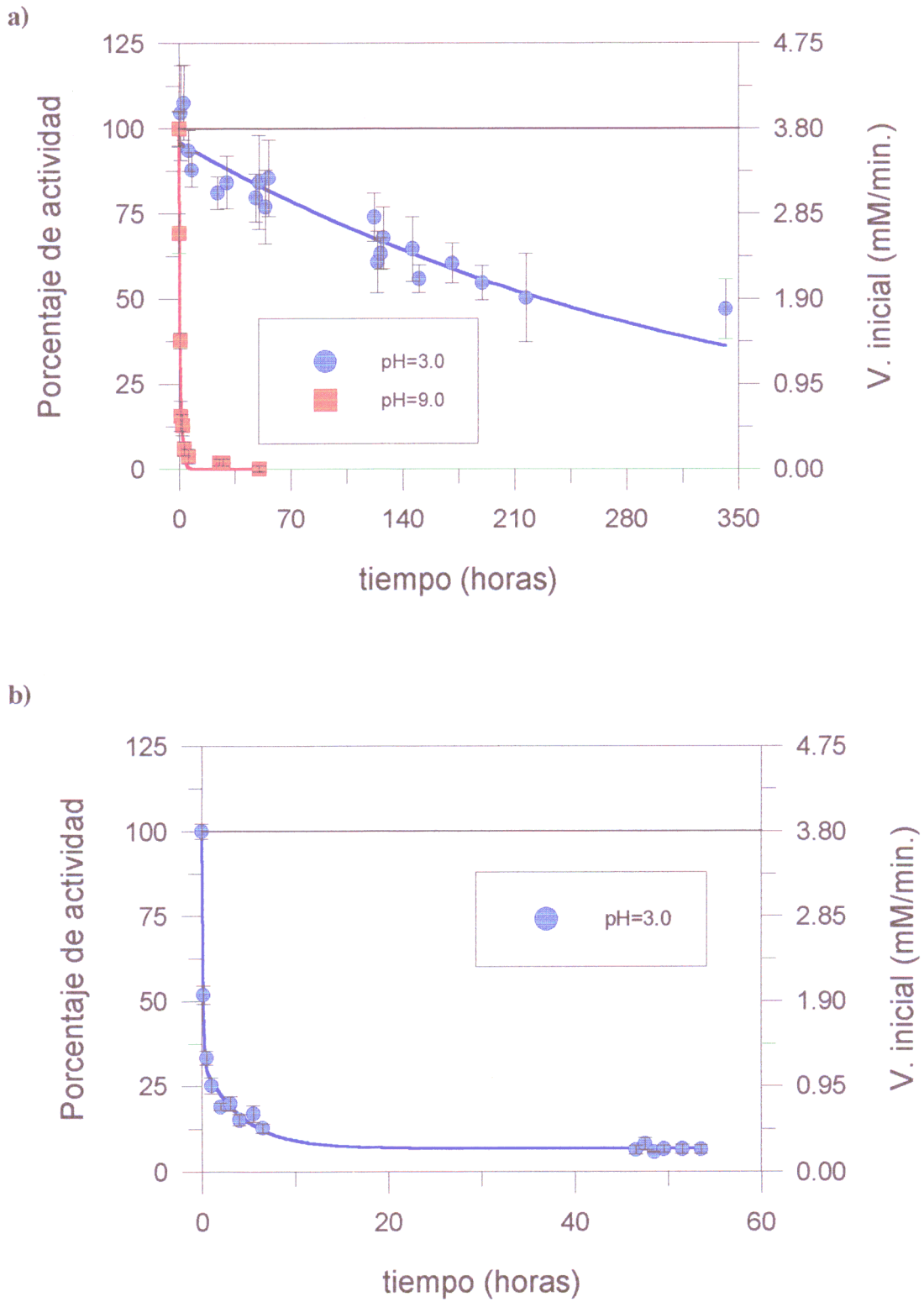


Figura 27.- Estabilidad de la enzima libre, en sistemas sin agitación. a) 37 °C; b) 50 °C.

Las curvas de desactivación obtenidas con los datos experimentales se ajustaron mediante la utilización del programa *EXFIT* integrado dentro del paquete informático *SIMFIT* (226).

Como se puede ver, la enzima libre almacenada a 2 °C de temperatura y pH=3.0 así como para pH=9.0 (10% de DMF, v/v), describe curvas de estabilidad que corresponden a sistemas con más de una exponencial, en las cuales hay un aumento de actividad superior al inicial, llegando a valores aproximados al 160%, lo que indica que la actividad específica del estado de transición (E_t) es mayor que la del inicial (E) comportandose como el modelo teórico definido por Henley y Sadana con el número 12 (en el cual $\alpha_1 > 100$ y $\alpha_2 > 100$), (243). Este hecho también ha sido observado por Mozahev y cols (244). Por el contrario, el almacenamiento a pH=9.0 en ausencia de DMF da una curva de desactivación típica. De ello cabe deducir que la enzima es más estable almacenada a pH=3.0, tal y como esta descrito y que la presencia de un disolvente orgánico polar como la DMF estabiliza la enzima (245).

Este incremento de actividad (> 100%) se puede explicar atendiendo a dos teorías:

1) Una primera, basada en la activación de moléculas de quimotripsinógeno procedentes del extracto de páncreas bovino del que se obtiene la enzima, y presentes en el extracto comercial, que serían hidrolizadas a α -quimotripsina por la propia proteína o bien por restos de tripsina que tuviese el preparado comercial.

2) La segunda teoría lo explicaría a través de posibles cambios conformacionales de la enzima al encontrarse en disolución produciendose un aumento de actividad, ya que la presencia de iones puede modificar la actividad enzimática y su estabilidad térmica tal y como se ha descrito para el caso de las lipasas (246)

Como comentaremos más adelante la primera teoría es la válida en nuestro caso.

Según aumenta la temperatura, el máximo de actividad disminuye con lo que el perfil de desactivación pasa de un modelo 12 de Henley y Sadana (243) a un modelo 10 u 11, (subida inicial ($\alpha_1 > 100$) y posterior decaimiento por debajo del 100% ($\alpha_2 < 100$)) (pH=3.0 a 25 °C). En cambio a 25 °C y a pH=9.0 se observa un perfil de desactivación en el que no existe un aumento de la actividad específica por encima del valor inicial ($E > E_t$) aunque la presencia de un 10% de DMF parece aportar un ligero efecto estabilizante (modelo 6 ó 7 de Henley y Sadana). A temperaturas mayores (37 y 50 °C) independientemente del pH el proceso viene

definido por una ecuación exponencial de decaimiento simple ($E_1=0$) o doble ($E_1 \neq 0$), pero en todos estos casos ($E > E_1$).

Comparando las **Figuras 26 y 27** entre sí, vemos como se produce una disminución de la estabilidad a medida que aumenta la temperatura siendo este efecto mucho más notorio cuando el pH es básico y no existe ningún codisolvente. Ello confirma que la autólisis de la proteína se favorece a pHs alcalinos y temperaturas altas. Asimismo se constata el efecto estabilizante de la DMF disminuyendo la protólisis a pH alcalino, datos que están de acuerdo con los publicados recientemente por Iborra y cols (245), los cuales han estudiado la estabilidad inducida por algunos disolventes miscibles sobre la enzima, según estos autores, la enzima presenta el siguiente orden de estabilización: dimetilsulfóxido (DMSO) > N,N-dimetilformamida (DMF) > acetonitrilo (AcN) > acetona (AC) > tetrahidrofurano (THF).

Profundizando más en el estudio de la estabilidad de la enzima se midió el número de centros activos presentes en la disolución en las condiciones de almacenamiento en las que se producía un aumento inicial de actividad (pH=3.0 y pH=9.0, 10% de DMF, (v/v) a 2 y 25 °C), para así poder conocer si el aumento de actividad se debe a un cambio conformacional de la enzima o al aumento del número de moléculas de enzima activa (debido al paso de quimotripsinógeno a α -quimotripsina).

Para medir el número de centros activos se empleó el método de la Sultona descrito en la Parte Experimental (**Sección III.6.1**) (74). Los resultados se reflejan en la **Figura 28**.

De estas curvas podemos deducir que el aumento de actividad puede correlacionarse con un incremento en el número de centros activos, lo cual se explicaría por la hidrólisis del quimotripsinógeno a α -quimotripsina. La desactivación enzimática observada también parece estar relacionada con un descenso en el número de centros activos útiles para la catálisis como se puede comprobar cuando aumentamos la temperatura y empleamos un pH alcalino (pH=9.0, con un 10% de DMF (v/v) a 25 °C) (**Figuras 26 y 28**), lo cual implica una disminución del número de moléculas de enzima activas, si bien no podemos decir si por autólisis o por cambio conformacional.

Este estudio nos indica claramente que existe una relación entre el número de centros activos y la medida macroscópica de variación de actividad de la enzima incubada en diferentes condiciones, aunque no podemos descartar la posibilidad de cambios conformacionales que

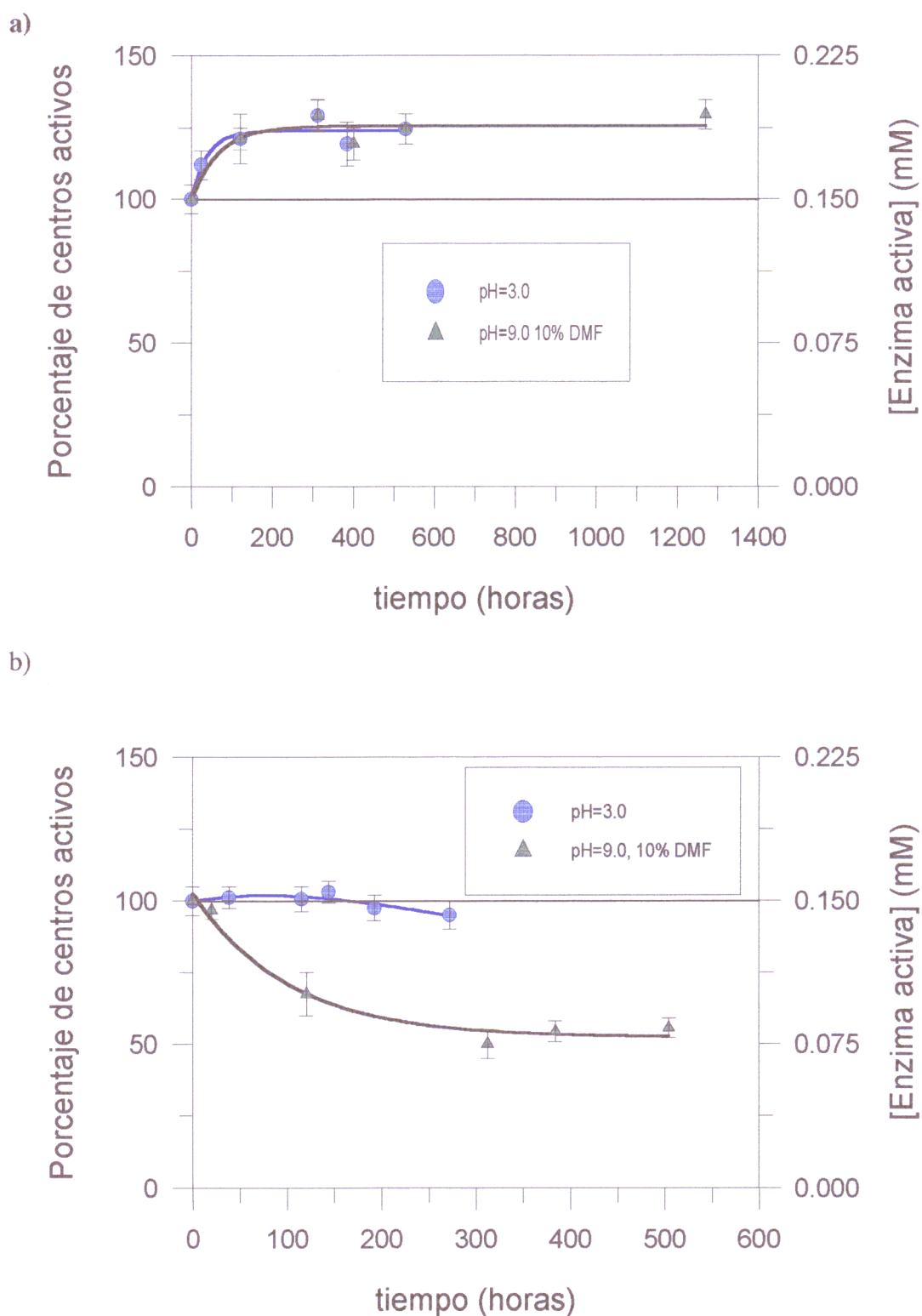


Figura 28.- Medida del número de centros activos de las disoluciones de enzima comercial (5 mg/ml) en tampón ác. cítrico/citrato sódico, pH=3.0, 0.05 M y ác. bórico/NaOH, pH=9.0, 0.05 M, con un 10% de DMF (v/v), empleando sultona como sustrato. a) Enzima incubada a 2 °C; b) enzima incubada a 25 °C.

pueden influir en la actividad enzimática, mejorando o empeorando la calidad de los ya existentes, haciéndolos más funcionales, ya que el incremento de actividad que reflejan las curvas de estabilidad a 2 °C, no se corresponde en porcentaje con el incremento que experimentan el número de centros activos (**Figuras 26 y 28**), y exactamente igual sucede a 25 °C, donde la disminución de centros activos numéricamente no coincide con el descenso en la actividad, aunque el perfil general de las curvas es congruente entre sí.

b) Enzima inmovilizada

El objetivo principal de este ensayo fue el estudio de la desactivación del catalizador inmovilizado en las condiciones de almacenamiento a 2 °C para poder comparar los ensayos realizados en diferentes fechas. Para ello, se fue midiendo la actividad hidrolítica del derivado C6-CT, almacenado sin agitación en estado sólido liofilizado a 2 °C, empleando como sustrato GpNA (229), en lugar de BTPNA ya que, como comentamos en la Parte Experimental, la hidrólisis de este último es casi instantánea, lo que dificulta el análisis empleando derivados insolubles.

Los valores de actividad obtenidos a lo largo del tiempo se pueden ajustar a una recta (**Fig. 29**) cuyos parámetros son:

-Pendiente = $(- 4 \pm 5) \times 10^{-4}$ (porcentaje de actividad/días).

-Ordenada en el origen = (0.673 ± 0.009) (porcentaje de actividad)

- $R^2 = 0.503$

Así, con un 95% de confianza se puede decir que la pendiente es no significativa, no existiendo desactivación durante el tiempo objeto de estudio, (**Figura 29**). Por lo tanto, estos derivados pueden ser almacenados, al menos durante 90 días a 2 °C (liofilizados en estado sólido), sin que se observe desactivación enzimática. Por último, debemos decir que el hecho de que no se observe aumento en la actividad enzimática del derivado inmovilizado (**Fig. 29**) tal y como ocurría con la enzima, libre a pH=3.0 a esa misma temperatura, es lógica consecuencia de la inmovilización que:

- impediría los cambios conformacionales postulados para la enzima en disolución;
- impediría el proceso de sobreactivación por hidrólisis de las moléculas de quimotripsinógeno inmovilizadas por acción de la propia enzima.

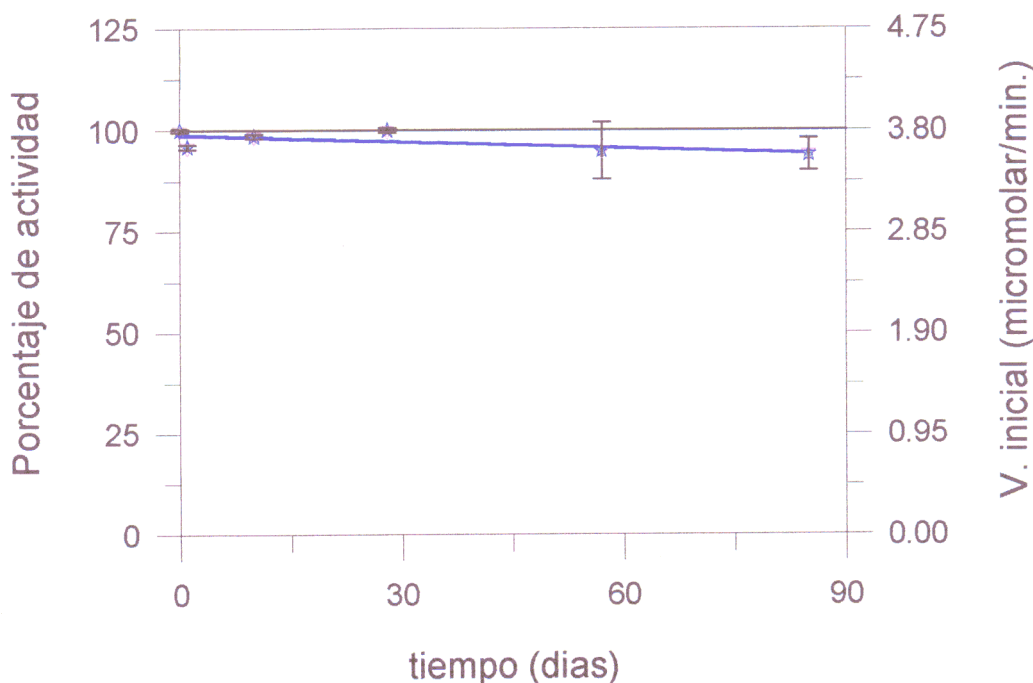


Figura 29.- Estabilidad del derivado C6-CT en condiciones de almacenamiento, liofilizado en estado sólido a 2°C de temperatura.

IV.1.2.2.- Ensayos de estabilidad enzimática en condiciones de síntesis en sistemas con agitación.

Se han realizado experimentos en condiciones generales de síntesis; medio AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 97/3 (v/v) a diferentes temperaturas 25, 37 y 50 °C tanto con la enzima libre como con el derivado C6-CT, con la finalidad de estudiar comparativamente el comportamiento de los derivados y de la enzima libre en sistemas bifásicos con agitación.

Los resultados aparecen recogidos en las Figuras 30 y 31 y las constantes que caracterizan la desactivación en la Tabla 17.

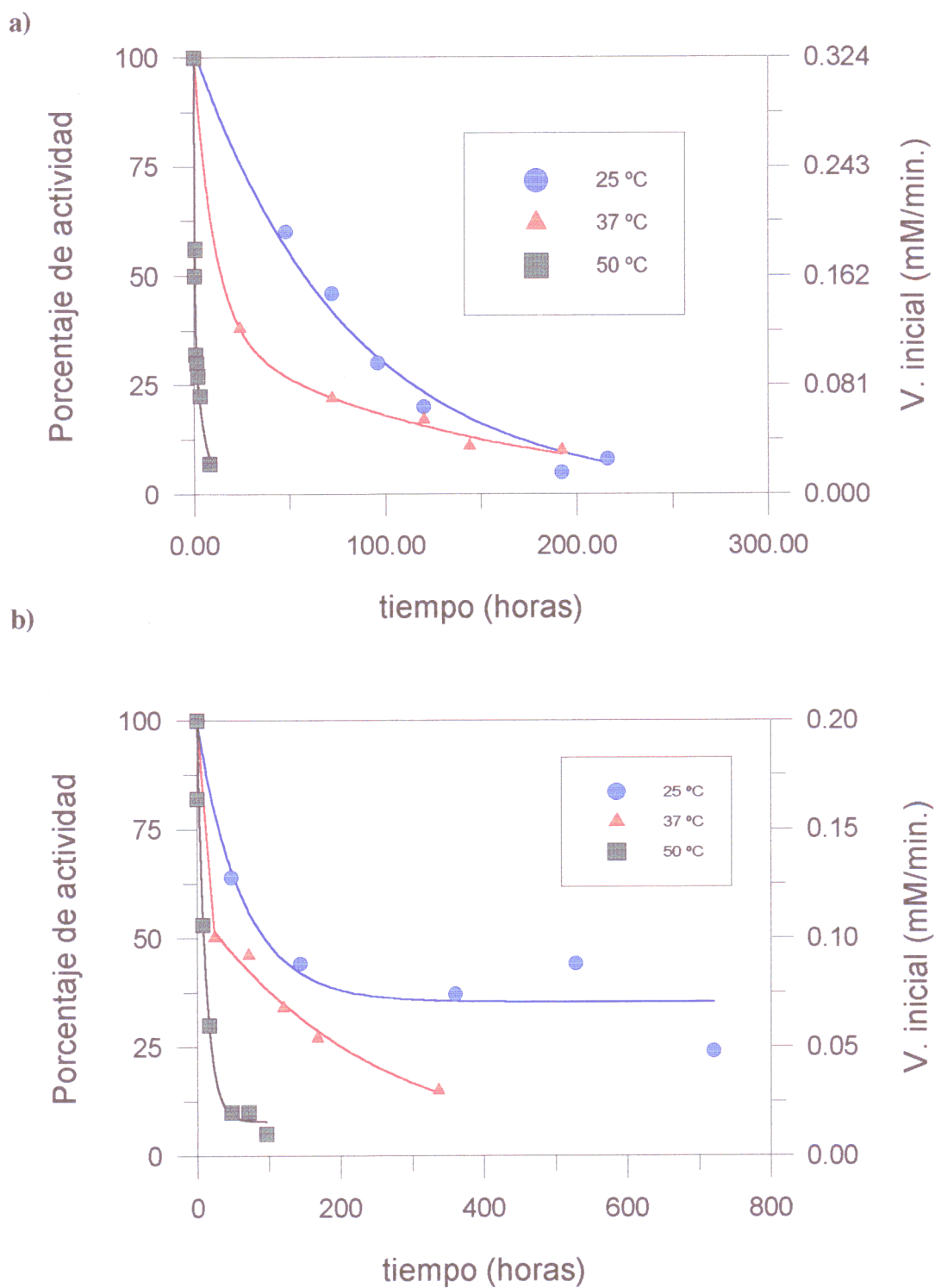


Figura 30.- Estabilidad térmica en sistemas bifásicos con agitación AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 97/3 (v/v).
 a) Enzima libre (0.075 mg/ml); b) Derivado C6-CT (1.3 mg de derivado/ml equivalentes a 0.113 mg de enzima/ml).

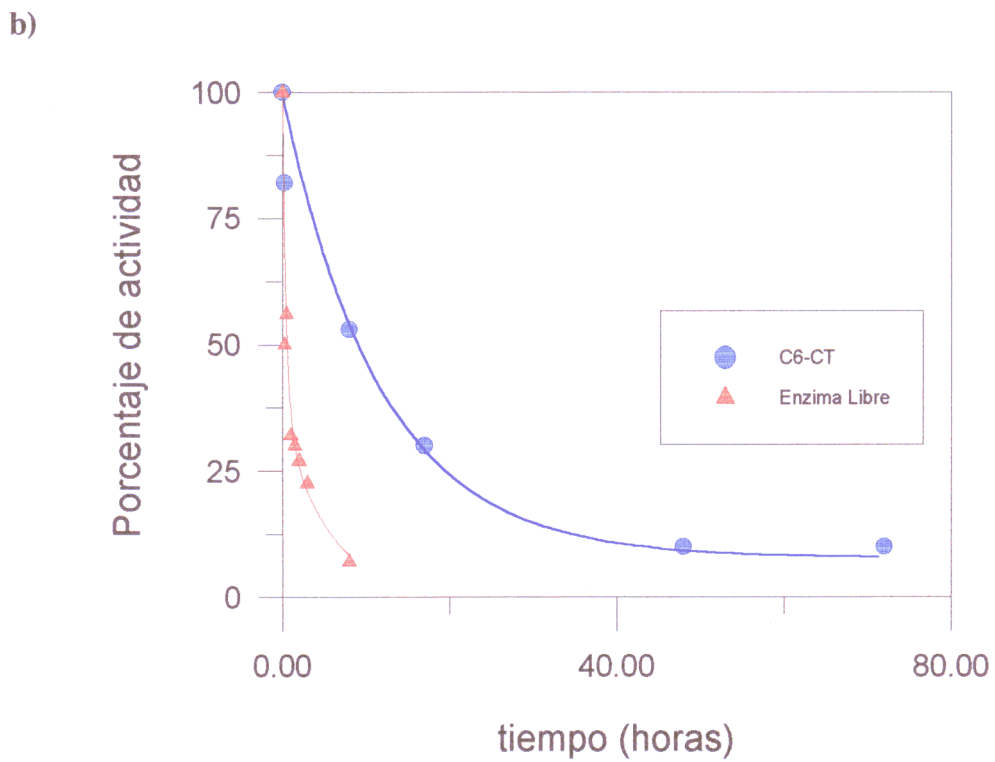
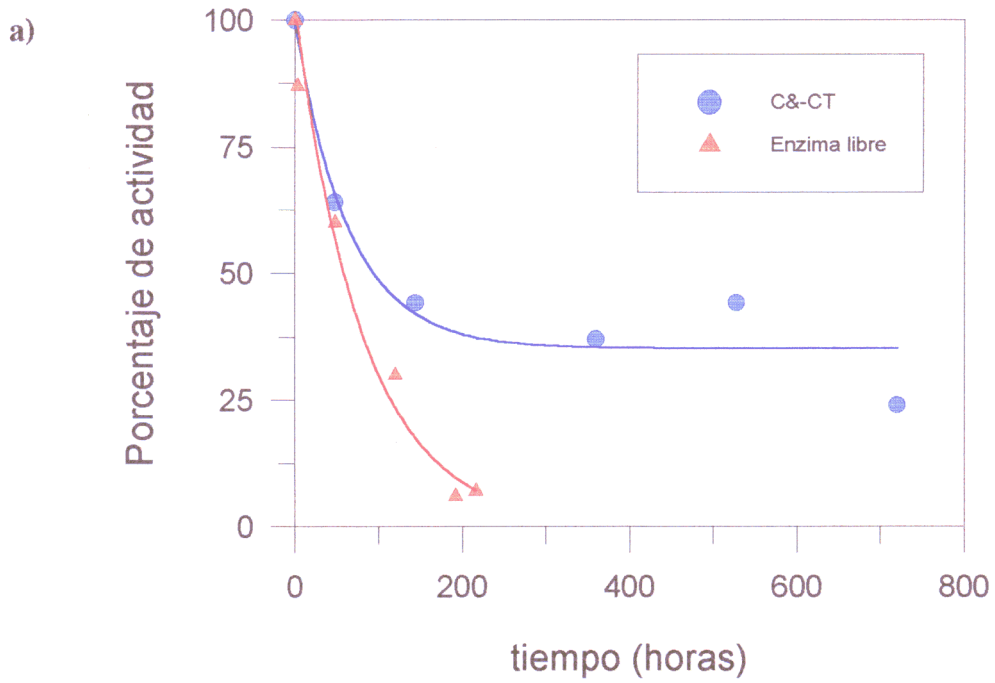


Figura 31 .- Diferencias en la desactivación térmica de la enzima libre (0.075 mg/ml) y del derivado C6-CT (1.3 mg de derivado/ml equivalentes a 0.113 mg de enzima/ml) en sistemas bifásicos con agitación AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 97/3 (v/v). a) 25 °C; b) 50 °C.

Tabla 17.- Desactivación enzimática de la enzima libre y del derivado C6-CT a diferentes temperaturas.

Ent.	T (°C)	Cataliz.	A ₁ ^a	k ₁ (h ⁻¹)	α ₁	t _{1/2} (h)	F ^b
1	25	Enz. lib.	102 ± 9	1.2 ± 0.2	0	59 ± 9	
2	37	Enz. lib.	93 ± 20	2.4 ± 0.7	0	26 ± 7	
3	50	Enz. lib.	93 ± 12	77 ± 4	0	0.8 ± 0.2	
4	25	C6-CT	64 ± 10	1.6 ± 0.6	35 ± 8	92 ± 15	1.6
5	37	C6-CT	70 ± 15	3 ± 1.2	20 ± 10	34 ± 9	1.3
6	50	C6-CT	91 ± 8	8 ± 1.2	7 ± 4	9 ± 1	11.2

^a Tanto por ciento de actividad referido al valor inicial.

^b Factor de estabilización (t_{1/2} del derivado/t_{1/2} de la enzima libre).

De estos datos se deduce que la α-quimotripsina soluble es mucho menos estable en un sistema bifásico con agitación que en presencia estática de sistemas monofásicos (Fig. 26 y 27), (242). Este hecho puede ser debido a las interacciones perjudiciales del enzima con las interfases AcOEt/H₂O o a las interacciones en la interfase aire-fase líquida, que resultan claramente negativas para la estabilidad del catalizador, como han descrito Guisán y cols (247).

Este efecto desnaturalizante que causa la agitación en sistemas bifásicos, junto con el empleo de una fase acuosa de pH alcalino (anteriormente indicada como claramente perjudicial para la enzima libre en sistemas sin agitación) van a ser los responsables de la rápida desactivación que sufren tanto la enzima libre como los derivados inmovilizados en las condiciones generales de síntesis (a la luz de los perfiles de desactivación, obtenidos) (Figuras 30 y 31).

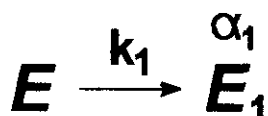
En nuestro grupo también se ha estudiado la estabilidad de derivados de lipasa de *Candida rugosa* inmovilizada sobre geles hidrofílicos de agarosa y sobre un soporte hidrofóbico como es la sílice. Así, los primeros resultan ser más estables debido a su mayor carácter hidrofílico, que les permite fijar al soporte las moléculas de agua presentes en el

medio antes que choquen contra la enzima, causando su desnaturalización, lo que no ocurre con el soporte hidrófobo que rechaza las moléculas de agua con lo que estas interaccionan con la enzima (247, 248).

Por tanto, los soportes hidrofílicos parecen conferir un microentorno más estable para la enzima que los soportes hidrofóbicos frente a los medios orgánico/acuosos. El mecanismo principal de estabilización de los primeros es, por tanto, la protección del contacto directo de la enzima con la interfase, evitando que el disolvente y/o el agua penetre en el centro activo de la enzima. Nuestros derivados, debido a su carácter hidrofóbico, son más sensibles a la desactivación que aquellos derivados sobre soportes porosos hidrofílicos, comportándose los primeros de forma muy similar a la enzima modificada con metoxipolietilenglicol (249), ya que ambos presentan un acusado carácter hidrofóbico.

Por otra parte, cuando se comparan los perfiles de desactivación obtenidos para la enzima nativa y el derivado inmovilizado sobre copolímeros de injerto en las condiciones de síntesis (**Figuras 31**) puede observarse una cierta estabilización, por efecto de la inmovilización.

En esta ocasión, los parámetros del proceso de desactivación difieren enormemente de los obtenidos en condiciones de hidrólisis ya que el biocatalizador se desactiva en un solo paso, por lo tanto, $E_2=0$, con lo que el esquema general quedaría como sigue:



Pero mientras que para la enzima libre el proceso de desactivación se ajusta a una ecuación exponencial de decaimiento simple (ecuación [25]):

$$A = A_1 e^{-k_1 t} \quad [25]$$

en la que el catalizador no posee actividad residual, correspondiendo éste con el modelo 1 de Henley y Sadana, que implica que; k_2 , α_1 y α_2 son cero. El derivado inmovilizado se ajusta a una exponencial de decaimiento simple más una constante (ecuación [26]):

$$A = A_1 e^{-k_1 t} + C \quad [26]$$

lo que supone que $k_2=0$, $\alpha_2=0$ y $\alpha_1 \neq 0$, por lo tanto, la enzima conserva una actividad residual transcurrido cierto tiempo, lo que indica la existencia de un estado intermedio de estabilización transitoria aunque al final se desactiva totalmente $\alpha_2=0$, coincidiendo con las consideraciones expuestas en el caso 3 por Henley y Sadana (243). Esta resistencia a la desactivación causada por el proceso de inmovilización también se puede observar de forma directa a través del factor de estabilización F (relación entre los tiempos de semidesactivación de la enzima inmovilizada y de la enzima libre) que es siempre > 1 . A temperaturas elevadas este factor aumenta, lo que supone una mayor estabilidad del derivado inmovilizado frente a la enzima libre (**Figura 31**).

Para ambos catalizadores un incremento en la temperatura acelera el proceso de desactivación, aumentando, por tanto, el valor de k_1 (**Tabla 17**).

El valor de $t_{1/2}$ (tiempo de semidesactivación para ambos catalizadores, (tiempo al cual la enzima conserva el 50% de su actividad) a 25, 37 y 50 °C de temperatura viene reflejado en la **Tabla 17**, donde podemos observar que el derivado es más estable que la enzima libre.

IV.1.3.-ENSAYOS DE ABRASIÓN

Estos ensayos se realizaron para comprobar si realmente la enzima está unida covalentemente al soporte o si, por el contrario, se encuentra adsorbida en la superficie, ocluida dentro de la matriz del soporte (Ver **Fig. 23, 24 y 25**), o simplemente retenida por fuerzas de tipo iónico. Es de sobra conocido (250) el hecho de que los derivados inmovilizados por simple adsorción física de la enzima al soporte sufren procesos de desorción cuando se emplean en medios fundamentalmente acuosos.

Por estos motivos planteamos el estudio de la posible desorción por abrasión de nuestros derivados, en un medio acuoso (tampón (K_2HPO_4/KH_2PO_4) pH=7.8, 0.1 M, condiciones de hidrólisis de GpNA) y en las condiciones en las que realizaríamos los ensayos de síntesis empleando un elevado porcentaje de medio orgánico; AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 97/3, (v/v), (**Sección III.6.2**).

Los resultados obtenidos en este estudio se encuentran reflejados en la **Tabla 18**. En

todos los casos, resultó negativa la presencia de proteína en los líquidos de filtrado (Microbiuret) (228). También fue negativo el ensayo de actividad enzimática (bien en la hidrólisis de GpNA (229), bien en la síntesis del dipéptido Bz-L-Tyr-L-Leu-NH₂) llevado a cabo con los líquidos del filtrado, siguiendo las metodologías descritas en la Sección III.6.2.

Tabla 18,- Resultados de los ensayos de abrasión, con los derivados de α -quimotripsina inmovilizada sobre copolímeros de injerto.

Naturaleza del medio (v/v)	Derivado (mg)	Proteína inicial (mg)	Proteína desorbida (mg)	Activ. ^a
(97/3) AcOEt/tampón pH=9.0	C5-CT, 50	2.1	0	0
(97/3) AcOEt/tampón pH=9.0	C6-CT, 50	4.5	0	0
Tampón (K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄) pH=7.8	C5-CT, 50	2.1	0	0
Tampón (K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄) pH=7.8	C6-CT, 50	4.5	0	0

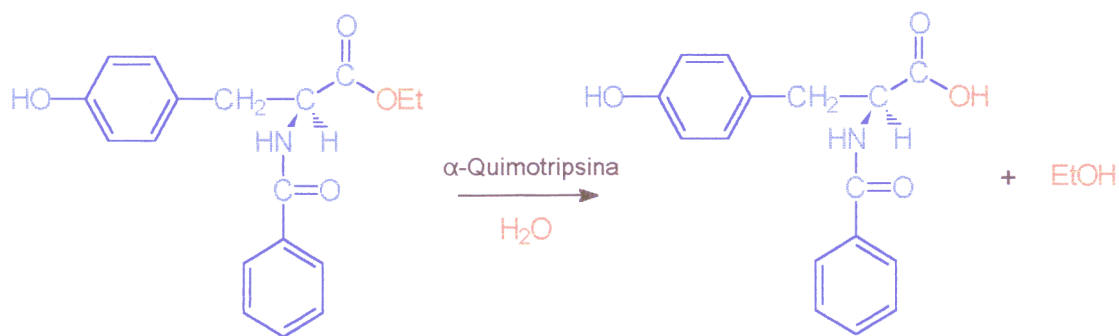
^a Actividad en los líquidos del filtrado tanto en hidrólisis (μ mol de pNA/min.) como en procesos de síntesis (mmoles de péptido/min.).

Estos resultados demuestran que la unión enzima-soporte es fuerte y estable en las condiciones en las que se llevaron a cabo los ensayos de abrasión, que son las mismas en las que hemos realizado nuestros ensayos posteriores. Por tanto, podremos afirmar que la actividad que muestran nuestros derivados es únicamente debida a la enzima inmovilizada de forma covalente y no a la enzima liberada del soporte, adsorbida u ocluida.

IV.1.4.- REACCIONES DE HIDRÓLISIS

Antes de analizar los procesos de síntesis peptídica se procedió a estudiar la actividad enzimática de los derivados inmovilizados en la reacción de hidrólisis del éster (BTEE)

(Esquema 30) utilizado como donador de acilo posteriormente en reacciones de síntesis.



Esquema 30.- Reacción de hidrólisis del N-benzoil-L-tirosinato de etilo (BTEE).

IV.1.4.1.- Estudio cinético del proceso de hidrólisis

Primeramente realizamos un estudio cinético del proceso de hidrólisis empleando un medio, AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 2/1, (v/v) en el que la elevada cantidad de agua presente en el reactor es suficiente para llevar a cabo este tipo de reacciones (Figura 32).

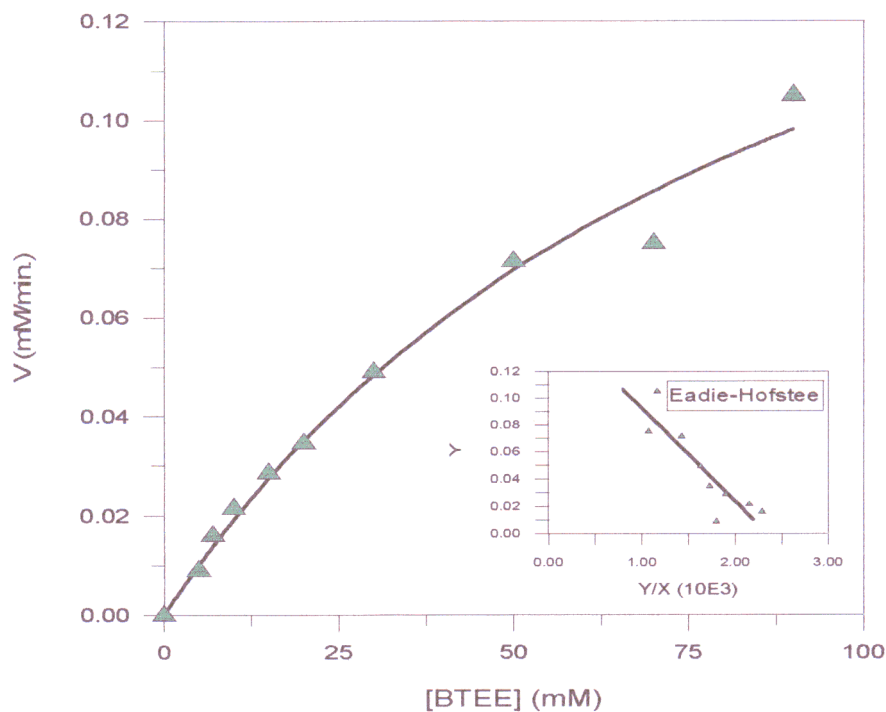


Figura 32.- Estudio cinético del proceso de hidrólisis, empleando el derivado C5-CT (1.3 mg derivado/ml equivalentes a 0.053 mg de enzima/ml).

Como se puede observar en la **Figura 32**, al representar las velocidades iniciales de hidrólisis frente a las diferentes concentraciones de BTEE empleadas (entre 5 y 90 mM) el proceso sigue una clásica cinética de tipo michaeliano con unos valores de v_{\max} , K_m y k_{cat} de (0.20 ± 0.03) mM/min., (95 ± 25) mM y (94 ± 15) min.⁻¹ respectivamente, ($R^2 = 0.973$).

IV.1.4.2.- Influencia del porcentaje de medio acuoso

Un factor fundamental en estos procesos hidrolíticos es el estudio de la influencia del porcentaje de agua en el seno del reactor, puesto que esta debe repartirse entre el disolvente, el soporte y la enzima, como ya comentamos en la Introducción (**Sección I.4.3.5**).

Así, se llevaron a cabo una serie de reacciones de hidrólisis de BTEE empleando diferentes medios en los cuales el porcentaje de fase acuosa varió desde 1 hasta el 90%, empleando el derivado C5-CT. Los resultados obtenidos al representar la velocidad inicial de hidrólisis frente a la proporción de tampón Tris/HCl pH=9.0, 0.1 M, aparecen en la **Figura 33**, donde se puede comprobar como dicha velocidad inicial crece de forma lineal con el porcentaje de fase acuosa hasta aproximadamente un 80%, valor a partir del cual se produce un incremento brusco.

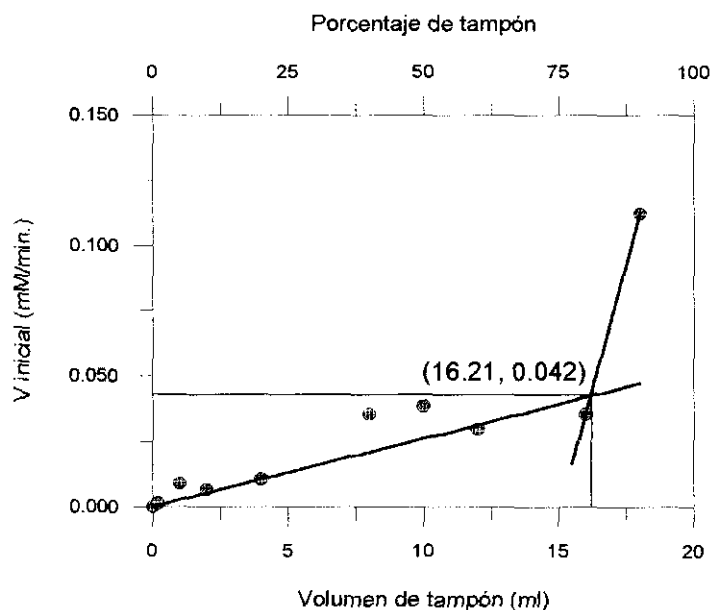


Figura 33.- Influencia del porcentaje de tampón en los procesos de hidrólisis llevados a cabo con el derivado C5-CT (1.3 mg de derivado/ml equivalentes a 0.053 mg de enzima/ml).

Estos hechos nos indican que a partir de dicho valor debe existir ya suficiente agua libre no retenida o por el soporte, o por el disolvente o por la enzima) como para elevar de forma considerable la velocidad de hidrólisis, al disponer de más cantidad de nucleófilo (agua). Este hecho podría explicarse porque, dada la naturaleza hidrofóbica de los soportes, el microentorno de la α -quimotripsina inmovilizada es también hidrofóbico (AcOEt) y rechaza el agua. Es necesaria una gran cantidad de agua para eliminar el AcOEt del microentorno de la enzima y facilitar la reacción de hidrólisis.

El perfil de la **Figura 33**, se asemejan al que presentan las isoterms de adsorción de agua (Introducción, **Fig 11**, **Sección I,3,4,5**). Si comparamos ambas curvas, el punto de *despegue* de la velocidad inicial de hidrólisis corresponde al punto de adsorción de agua por el biocatalizador en monocapa y en multicapa. En esta zona el agua es libre para actuar como nucleófilo por hallarse en exceso.

IV.1.5.- REACCIONES DE SÍNTESIS DE PÉPTIDOS CINÉTICAMENTE CONTROLADAS

Este tipo de reacciones se analizaron detenidamente en la Introducción, **Sección I.4**, donde aparece recogido el esquema general del proceso (**Figura 9**).

IV.1.5.1.- Influencia de la cantidad de enzima

El primer estudio llevado a cabo estuvo encaminado a determinar el intervalo de concentraciones de enzima en el cual la conversión a péptido era máxima y mínima la cantidad de ácido producida por la hidrólisis del donador de acilo.

Para ello se utilizó como medio AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 2/1, (v/v), y como sustratos BTEE y H-L-Leu-NH₂ (10 y 40 mM en reactor respectivamente) y, siguiendo el procedimiento general de síntesis (ver Parte Experimental; **Sección III.5**), se sintetizó el dipéptido modelo, variando la concentración de enzima desde 0.043 hasta 0.48 mg de enzima/ml, en reactor, con los derivados C1-CT y C2-CT. Los resultados aparecen en las **Figuras 34 y 35** y en la **Tabla 19 y 20**.

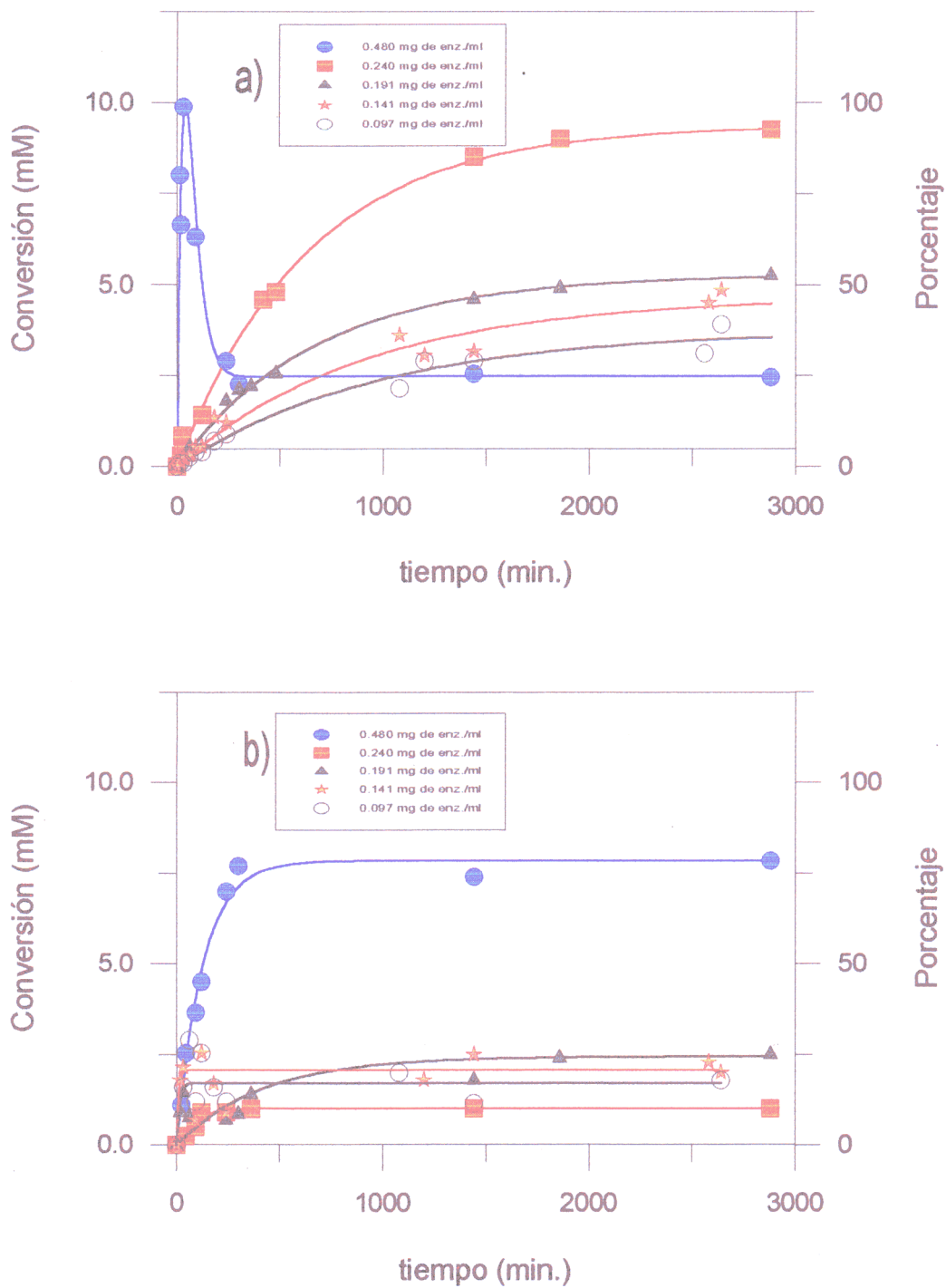


Figura 34.- Influencia de la variación en la concentración de enzima, derivado C1-CT, en la síntesis del dipéptido Bz-L-Tyr-L-Leu-NH₂, empleando como medio AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 2/1, (v/v). a) Péptido; b) ácido.

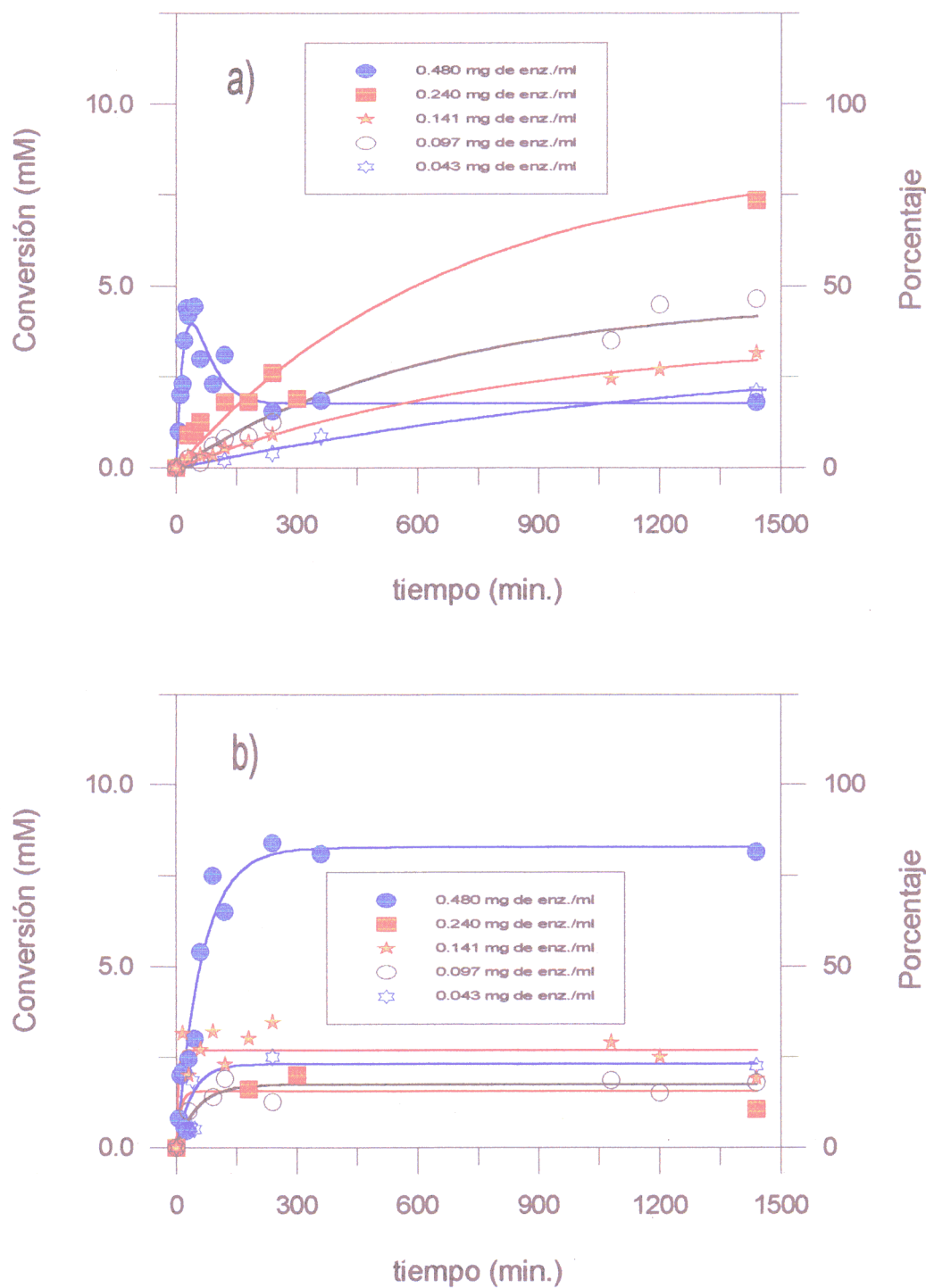


Figura 35.- Influencia de la variación en la concentración de enzima, derivado C2-CT, en la síntesis del dipéptido Bz-L-Tyr-L-Leu-NH₂, empleando como medio AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 2/1, (v/v). a) Péptido; b) ácido.

En las **Tablas 19 y 20**, que recogen los principales parámetros estudiados, tales como el tiempo en que se alcanza el máximo porcentaje de péptido o la mayor relación péptido/ácido. .

En el caso del derivado C1-CT (**Fig. 34**) se aprecia más claramente que para una concentración elevada (0.48 mg de enzima/ml ó 5.5 mg de derivado C1-CT/ml, **Tabla 19** entrada 1), se alcanza rápidamente la máxima conversión a péptido (94% de péptido, en 30 minutos), si bien inmediatamente comienza a apreciarse la actividad amidásica del catalizador (ver **Figura 9, Sección I.4**), lo que conduce a un elevado porcentaje de ácido a largos tiempos de reacción (**Fig. 34b**). Así pues, si se pretende llevar a cabo síntesis a cortos tiempos de reacción deben utilizarse concentraciones de enzima relativamente elevadas, pues a medida que disminuye la cantidad de biocatalizador empleado, la conversión máxima a péptido descende, de igual manera que disminuye la relación péptido/ ácido. No obstante, en ninguno de los demás casos (entradas 2 a 5) se observa la presencia de la acción amidásica de la enzima, lo cual nos permitiría llevar a cabo dichos procesos sin pérdida del producto formado.

Tabla 19.- Síntesis del péptido Bz-L-Tyr-L-Leu-NH₂, con el derivado C1-CT en AcOEt/Tris pH=9.0. 0.1 M, 2/1 (v/v), a 25°C de temperatura.

Entr.	mg C1-CT/ml	mg de α -CT/ml	t (h.)	% Péptido	% Ácido	Pep./Ac.
1	5.50	0.480	0.5*	94	6	15.7
2	2.75	0.240	24	90	10	9.0
3	2.20	0.191	48	88	20	2.8
4	1.60	0.141	48	45	20	2.3
5	1.05	0.097	48	32	20	1.6

*A partir de ese tiempo aparece la actividad amidásica

Los resultados obtenidos son mejores que los descritos por Clapés y cols (251) que utilizando 120 mg de α -quimotripsina adsorbida sobre celite y acetato de etilo saturado con agua como medio de reacción han logrado un 93% de péptido, en 72 h. Asimismo, pueden

considerarse mejores que los obtenidos con derivados de α -quimotripsina inmovilizada sobre agarosa, suministrados por el grupo del Dr. Guisán, en estas condiciones de AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M 2/1, (v/v) (no superando casi en ningún caso el 50%, como se verá en la Sección IV.2.3.1).

En la Figura 35 se muestra la influencia de la cantidad de enzima en la síntesis del dipéptido modelo empleando el derivado C2-CT, donde puede apreciarse que, al igual que ocurría en el caso anterior, aunque a menor escala, (debido a la menor actividad específica y actividad retenida de este derivado) (Tabla 16), cantidades de enzima superiores a 0.24 mg de α -quimotripsina/ml (7.25 mg de derivado C2-CT/ml) en reactor dan origen a la aparición de la actividad amidásica. No obstante puede apreciarse, al comparar ambos derivados (Figuras 34 y 35 y las Tablas 19 y 20), que las máximas conversiones a péptido obtenidas con el derivado C2-CT son inferiores a las conseguidas con el derivado C1-CT, y que en el caso C2-CT la relación péptido/ácido no aumenta con la concentración de enzima, siendo máxima cuando empleamos 0.24 mg de enzima/ml (péptido/ácido = 4.9). Posiblemente los efectos difusionales interparticulares explican la menor actividad lograda para la mayor concentración de enzima (14.5 mg de C2-CT/ml).

Tabla 20. Síntesis del péptido Bz-L-Tyr-L-Leu-NH₂, con el derivado C2-CT en AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 2/1, (v/v), a 25°C de temperatura.

Entr.	mg de C2-CT/ml	mg de α -CT/ml	t (h.)	% Péptido	% Ácido	Pep./ac.
1	14.50	0.480	0.5*	45	35	1.3
2	7.25	0.240	48	83	17	4.9
3	4.30	0.141	24	30	30	1.0
4	2.80	0.097	24	42	51	0.8
5	1.30	0.043	24	22	13	1.7

*A partir de ese tiempo aparece la actividad amidásica

Considerando la aparición de la actividad amidásica como una reacción indeseable

desde el punto de vista sintético, y con la predisposición de inclinarnos hacia el ahorro de catalizador, factor muy importante desde el punto de vista industrial, decidimos tomar como concentración óptima 0.24 mg de α -quimotripsina/ml para los próximos ensayos.

IV. 1.5.2.- Influencia de los sustratos en los procesos de síntesis de péptidos

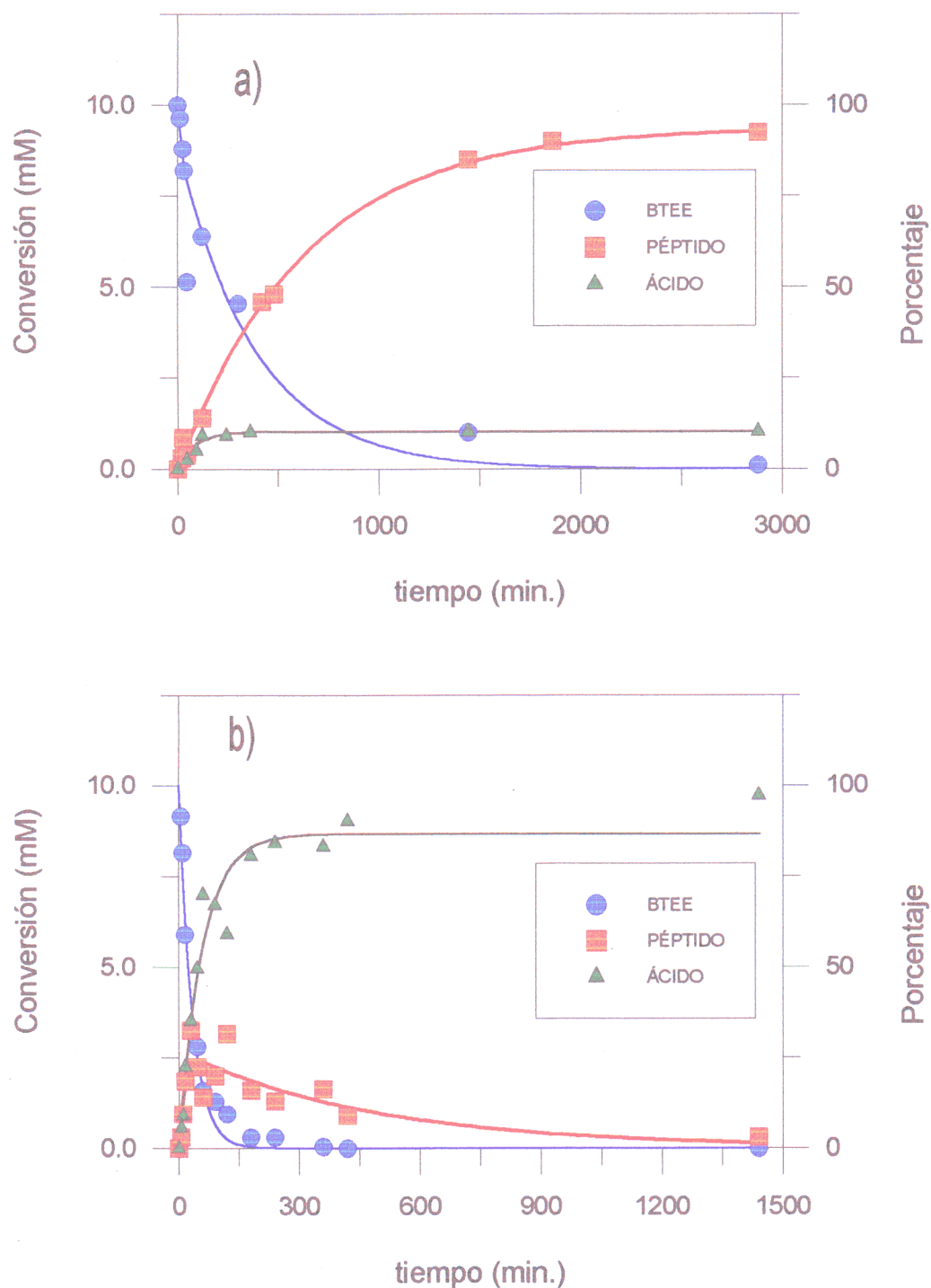
Empleando las condiciones óptimas del ensayo anterior con el derivado C1-CT (2.75 mg de derivado/ml, equivalentes a 0.24 mg de α -quimotripsina/ml, en reactor) se procedió a sintetizar los dipéptidos: Bz-L-Tyr-L-Leu-NH₂, Bz-L-Tyr-L-Ala-NH₂, Ac-L-Phe-L-Leu-NH₂ y Ac-L-Phe-L-Ala-NH₂, para comprobar la posible alteración de la selectividad por efecto de la inmovilización. Los resultados obtenidos aparecen reflejados en las **Figuras 36 y 37**. Examinando estas figuras se observa que las mejores conversiones se obtienen en la síntesis de los dipéptidos Bz-L-Tyr-L-Leu-NH₂ y Ac-L-Phe-L-Leu-NH₂, lo que indica que la H-L-Leu-NH₂ es mucho mejor nucleófilo que la H-L-Ala-NH₂ para este derivado, en estas condiciones.

Por lo que se refiere al donador de acilo, también la Bz-L-Tyr-OEt es mejor que la Ac-L-Phe-OEt, al igual que ocurre con la enzima libre o inmovilizada sobre agarosa (132, 252).

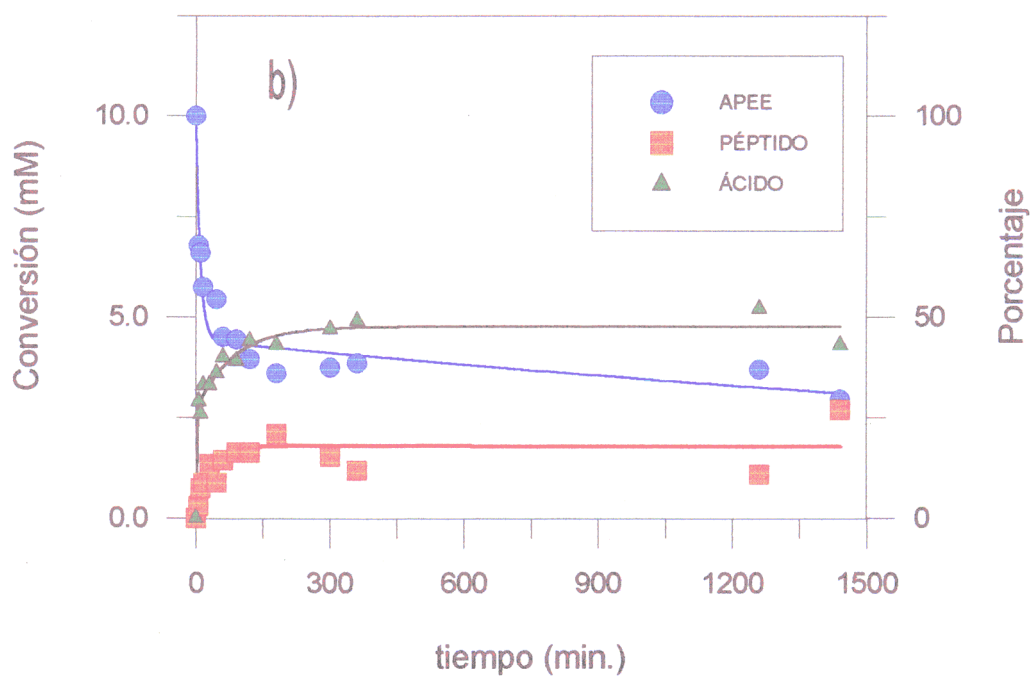
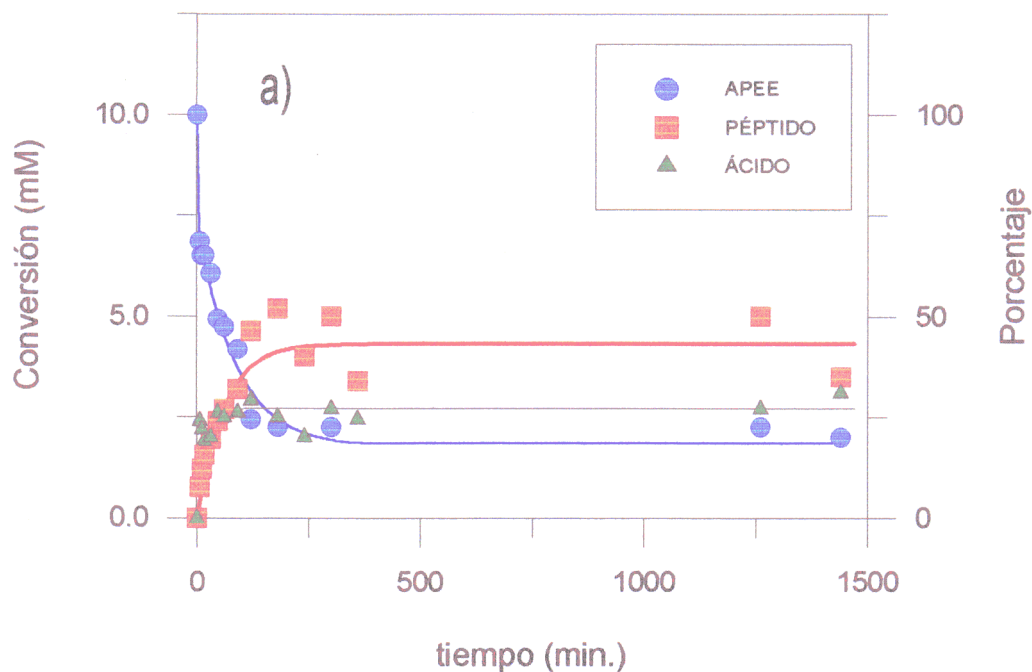
Estas conclusiones quedan patentes en la **Tabla 21**, donde vemos que la relación péptido/ácido es mayor de uno en el caso de H-L-Leu-NH₂ y menor de uno en el caso de la H-L-Ala-NH₂.

Una posible explicación se ha de buscar en el tipo de soporte, que al ser una mezcla de dos sustancias, una hidrofóbica mayoritaria (PE) y otra relativamente hidrofílica minoritaria (HEMA), presenta un carácter general hidrofóbico, lo que induciría problemas de transferencia de masa en función de la lipofilia de los sustratos. Cuanto más lipóide sea el nucleófilo mayor debe ser su concentración en el microentorno de la enzima inmovilizada (H-L-Leu-NH₂ es más lipóide que H-L-Ala-NH₂) (159, 252), por eso el porcentaje de ácido es mayor en el caso de la H-L-Ala-NH₂.

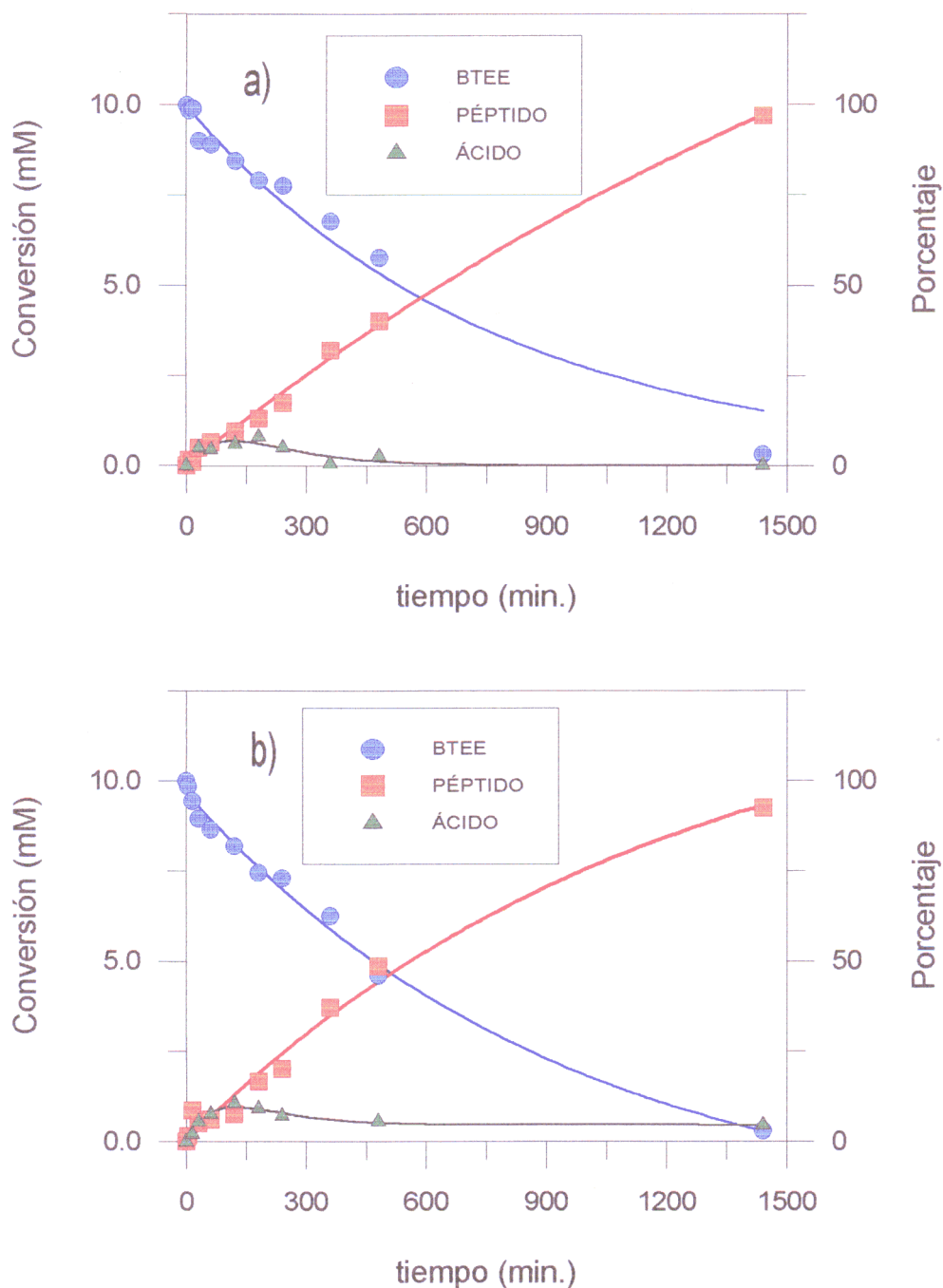
Además por lo que se refiere a la naturaleza del donador de acilo la tirosina se encuentra benzoilada frente a la fenilalanina acetilada resultando este último más polar que el primero, por lo que teniendo en cuenta las especificaciones anteriores el sustrato más lipóide debería "acercarse" mejor al microentorno enzimático, y por ello se obtienen mejores



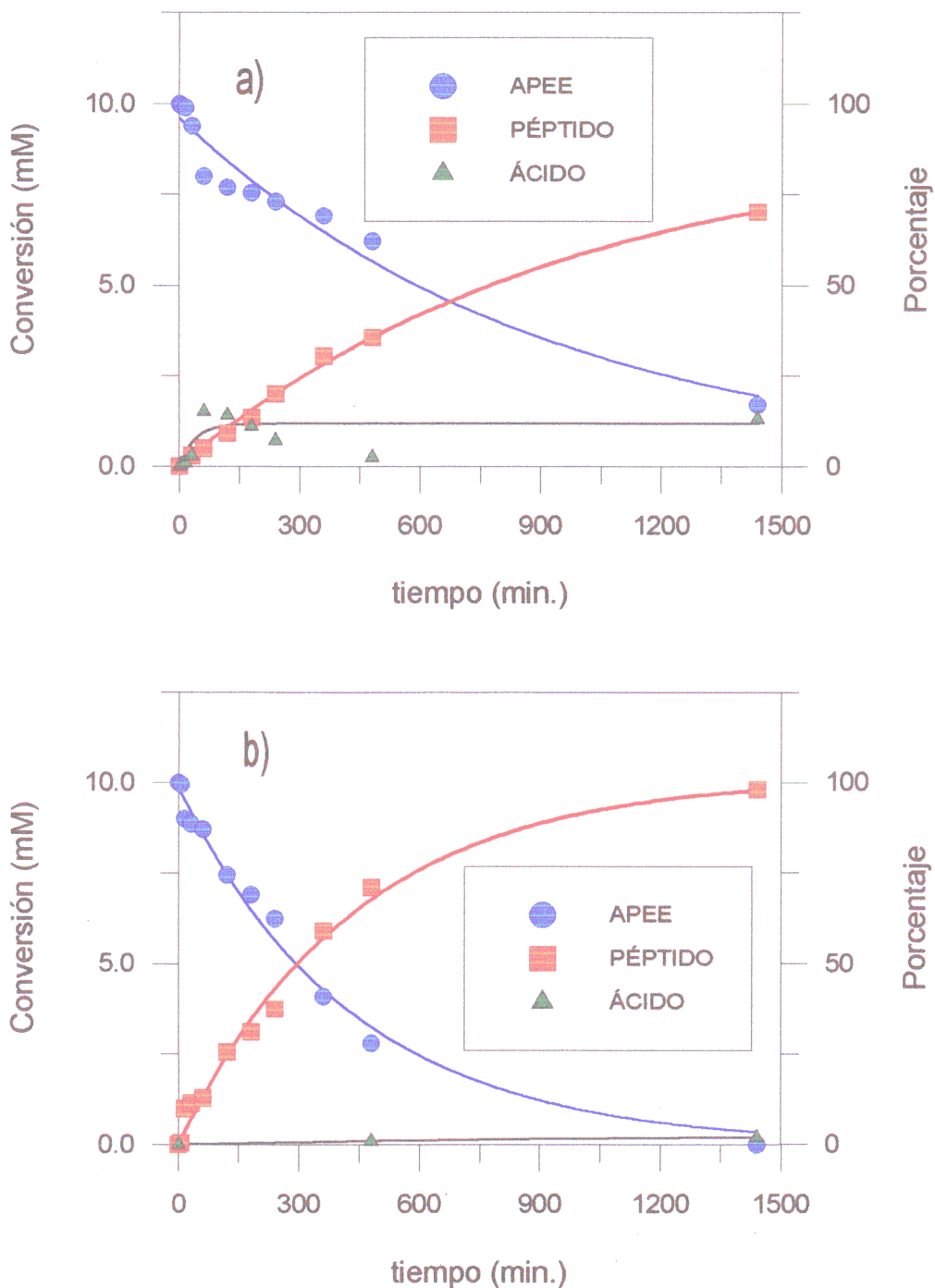
Figuras 36.- Influencia de la naturaleza del nucleófilo en la síntesis de péptidos empleando AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 2/1, (v/v) y C1-CT (2.75 mg de derivado/ml equivalentes a 0.24 mg de enzima/ml) como catalizador y Bz-L-Tyr-OEt (10 mM) como donador de acilo. a) Síntesis de Bz-L-Tyr-L-Leu-NH₂; b) Síntesis de Bz-L-Tyr-L-Ala-NH₂.



Figuras 37.- Influencia de la naturaleza del nucleófilo en la síntesis de péptidos empleando AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 2/1, (v/v) y C1-CT (2.75 mg de derivado/ml equivalentes a 0.24 mg de enzima/ml) como catalizador y Ac-L-Phe-OEt (10 mM) como donador de acilo. a) Síntesis de Ac-L-Phe-L-Leu-NH₂; b) Síntesis de Ac-L-Phe-L-Ala-NH₂.



Figuras 38.- Influencia de la naturaleza del nucleófilo en la síntesis de péptidos empleando AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 97/3, (v/v) y C5-CT (1.3 mg de derivado/ml, equivalentes a 0.053 mg de enzima/ml) como catalizador y Bz-L-Tyr-OEt (10 mM) como donador de acilo. a) Síntesis de Bz-L-Tyr-L-Leu-NH₂; b) Síntesis de Bz-L-Tyr-L-Ala-NH₂.



Figuras 39.- Influencia de la naturaleza del nucleófilo en la síntesis de péptidos empleando AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 97/3, (v/v) y C5-CT (1.3 mg de derivado/ml, equivalentes a 0.24 mg de enzima/ml) como catalizador y Ac-L-Phe-OEt (10 mM) como donador de acilo. a) Síntesis de Ac-L-Phe-L-Leu-NH₂; b) Síntesis de Ac-L-Phe-L-Ala-NH₂

conversiones con BTEE que con APPE.

Además, la presencia del -OH fenólico en la tirosina ayuda al reconocimiento enzimático del sustrato en el subsitio " ρ_2 " del centro activo de la enzima (252b), tal y como se ha descrito en la bibliografía.

Tabla 21.- Síntesis de diferentes dipéptidos realizadas empleando (2.75 mg de derivado C1-CT/ml equivalentes a 0.24 mg de α -quimotripsina/ml), en AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 2/1, (v/v) como medio de reacción y termostatizadas a 25 °C de temperatura.

Dipéptido sintetizado	t (h.)	% Péptido	% Ácido	Pep./Ac.	V. inicial *
Bz-L-Tyr-L-Leu-NH ₂	24	90	10	9.00	0.01
Bz-L-Tyr-L-Ala-NH ₂	0.5*	28	30	0.93	0.21
Ac-L-Phe-L-Leu-NH ₂	5	40	25	1.60	0.09
Ac-L-Phe-L-Ala-NH ₂	5	18	42	0.43	0.06

* Velocidad inicial de síntesis de péptidos expresada en mM/min.

* A partir de ese tiempo comienza la actividad amidásica.

Todas estas razones justifican el mejor resultado obtenido empleando *L*-leucinamida como nucleófilo y BTEE como donador de acilo para este derivado en estas condiciones.

Si comparamos los resultados obtenidos con el derivado C1-CT con los consegidos con otro derivado de mayor porcentaje de injerto como es el derivado C5-CT, pero con igual actividad específica (Tabla 16) y que aparecen reflejados en las Figuras 38 y 39 y en la Tabla 22, en un medio AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M 97/3, (v/v) (Sección III.6.4.2), se observaron comportamientos completamente diferentes (Fig. 36-39). En el caso del derivado C5-CT se obtienen mejores conversiones a péptido y una mejor relación péptido/ácido (Tablas 21 y 22), aunque la velocidad inicial de síntesis es mucho menor.

Al igual que ocurría con el derivado anterior la tirosina es mucho mejor donador de acilo, en general, que la fenilalanina, pero no existen las grandes diferencias observadas con el derivado C1-CT. Es decir, parece como si C5-CT tuviera una menor especificidad por el donador de acilo que C1-CT.

La menor velocidad de síntesis obtenida con C5-CT respecto a C1-CT pueden atribuirse a la menor carga enzimática (Tabla 16) del derivado, y a la mayor rigidez de las moléculas de enzima en este derivado donde habría poca unión en multicapa, abundante en C1-CT.

Tabla 22. Síntesis de péptidos realizadas con el derivado C5-CT, 0.053 mg de α -quimotripsina/ml (1.3 mg de derivado/ml), en AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M 97/3, (v/v) y a una T=25° C.

Dipéptido sintetizado	t (h.)	% Péptido	% Ácido	Pep./Ac.	V. inicial *
Bz-L-Tyr-L-Leu-NH ₂	24	97	1	97.0	0.009
Bz-L-Tyr-L-Ala-NH ₂	24	92	5	18.4	0.011
Ac-L-Phe-L-Leu-NH ₂	24	70	13	5.4	0.010
Ac-L-Phe-L-Ala-NH ₂	24	98	2	46.0	0.023

* Velocidad inicial de síntesis de péptidos expresada en mM/min.

Los buenos resultados logrados con H-L-Ala-NH₂ comparados con los conseguidos con el derivado C1-CT, pueden atribuirse al mayor porcentaje de injerto del derivado C5-CT (54.5%) respecto al (38%) del derivado C1-CT (Tabla 16), que aumenta la cantidad de HEMA presente en el soporte, creando un microentorno alrededor la enzima más hidrófilo, resultando más fácil el acceso de la H-L-Ala-NH₂, más hidrófilo, al centro activo del catalizador, a diferencia de lo que ocurría con la enzima libre, que en todos los casos reconoce mejor a la L-leucinamida frente a la L-alaninamida. Por tanto, este es un claro ejemplo en el que la naturaleza del soporte modifica el patrón de reconocimiento enzimático, no debido a un cambio estructural en la enzima, sino a una alteración del microentorno original de la enzima, modificando la difusión de los sustratos al centro activo del catalizador.

Por último, se ha estudiado la influencia de la naturaleza de nucleófilo en la actividad del derivado C4-CT (1.3 mg de derivado/ml, equivalentes a 0.24 mg de enzima/ml), empleando en todos los casos BTEE (10 mM) como donador de acilo (Tabla 23). Con ello se pretende ver el comportamiento del derivado más cargado (189.2 mg de enzima/g de copolímero), y así comprobar las aseveraciones anteriores. Este derivado condujo a la máxima conversión en péptido a tiempos menores que C1-CT y que C5-CT. De lo que se deduce que

la carga enzimática del derivado condiciona la velocidad con la que se llega al máximo de conversión en péptido. Asimismo, se aprecia que este catalizador hidrofobo no conduce a la hidrólisis del éster.

Todos los aminoácidos utilizados como nucleófilos permiten obtener buenos resultados en estas condiciones salvo aquellos que presentan cargas tanto positivas como negativas en su cadena lateral (entradas 5 y 6). Estos datos son muy similares a los descritos empleando derivados de α -quimotripsina modificada con distintas cantidades de MPEG (metoxipoli(etilenglicol)). Así, Sinisterra y Puigserver (253) observaron que el grado de modificación no afecta la actividad sintética, pero que el hecho de la modificación sí acentúa la hidrofobicidad del microentorno de la enzima, evitando que estos aminoácidos cargados ocupen el subsitio " ρ_3 " destinado al nucleófilo (subsitio "n"), no teniendo lugar la reacción de síntesis.

Tabla 23.-Influencia en la estructura del nucleófilo en la síntesis del péptido Bz-L-Tyr-AA empleando el derivado C4-CT, 0.24 mg de α -quimotripsina/ml (1.3 mg de derivado/ml), a una T=25° C.

Nucleófilo	% Pep.	tiempo (h.)	AcOEt/(Tris/HCl)
H-L-Leu-NH ₂	>99	6	99/1
H-L-Met-NH ₂	>99	6	99/1
H-L-Ser-NH ₂	>99	6	99/1
H-L-Gly-NH ₂	>99	21	99/1
H-L-Arg-NH ₂	---	24	99/1
H-L-Asp-NH ₂	---	24	4/1

Otros autores explican este efecto que presenta la enzima modificada químicamente y liofilizada mediante interacciones que hacen menos accesibles al sustrato los residuos Asp₃₄ y Asp₆₄, que se encuentran en el subsitio " ρ_3 " (252a), no reconociendo al nucleófilo en el centro lipóide.

Por otro lado, los autores arriba citados consiguieron rendimientos mucho mejores para los aminoácidos cargados empleando como catalizador un derivado mucho más hidrófilo de α -quimotripsina inmovilizada sobre agarosa (253). Esto se explica en base a la cantidad de

agua en el microentorno de la enzima que aumenta la concentración del nucleófilo cargado, próximo al centro activo, y pensamos que puede ser debido a la disminución de las interacciones con los citados los residuos Asp₃₄ y Asp₆₄

La H-L-Gly-NH₂ y la H-L-Ser-NH₂ proporcionan mejores rendimientos con nuestros derivados que los obtenidos con la enzima modificada (H-L-Gly-NH₂, 69% y la H-L-Ser-NH₂, 89%) o con la enzima inmovilizada sobre agarosa, (H-L-Gly-NH₂, 64% y la H-L-Ser-NH₂, 89%) como puede observarse en la **Tabla 23**. De estos mismos valores deducimos como la H-L-Gly-NH₂ reacciona más lentamente que el resto de aminoácidos no cargados; este hecho ha sido contrastado por numerosos autores, que postulan que su pequeño tamaño le dificulta el reconocimiento por el centro activo de la enzima (100).

Por lo tanto, nuestros derivados pueden considerarse como similares a la enzima modificada con MPEG, puesto que ambos sistemas presentan carácter hidrofóbico y no reconocen aminoácidos cargados

IV.1.5.3.- Influencia de la naturaleza del disolvente

La utilización de disolventes orgánicos presenta un indudable interés en Tecnología Enzimática y puede ser una poderosa herramienta para el diseño de reacciones de Química Fina catalizadas enzimáticamente.

La presencia de disolventes orgánicos tanto en sistemas monofásicos (254), como en sistemas bifásicos (231), presenta ciertas ventajas sobre los sistemas de reacción completamente acuosos (242), entre ellas citaremos:

- a) La presencia de disolventes orgánicos en el medio de reacción es la alternativa más sencilla para desplazar los equilibrios hidrólisis/síntesis en el sentido de la síntesis.
- b) La presencia de disolventes orgánicos permite aumentar notablemente la solubilidad de sustratos y productos no naturales hidrofóbicos.
- c) Generalmente con la presencia de disolventes orgánicos se disminuye la aparición de contaminantes microbianos en los reactores.

A pesar de todas estas ventajas, la utilización de disolventes orgánicos en procesos enzimáticos puede motivar importantes procesos negativos sobre las propiedades de estos

lábil catalizadores biológicos, principalmente sobre el binomio actividad/estabilidad. Las principales causas de inactivación en disolventes orgánicos serían:

1) interacción de las moléculas de enzima con las del codisolvente o con las pocas moléculas de disolvente inmiscible con agua, presentes en la fase acuosa. Esta interacción enzima-disolvente puede tener diferentes efectos:

a.- Interacción de las moléculas de disolvente con los residuos clave del centro activo y, a consecuencia de ello, alteración de las propiedades catalíticas (255).

b.- Cambios globales en la estructura tridimensional:

b1) Cambios producidos cuando el tiempo de contacto es breve, lo que también se traduce en una alteración de su actividad catalítica (256).

b2) Cambios producidos cuando el tiempo de contacto es medio y largo, que provocan la pérdida de estabilidad (247, 256).

2) Interacciones de las moléculas de enzima con interfases hidrofóbicas en sistemas bifásicos (247, 256, 257).

3) El efecto de la reducción del contenido en agua en el entorno de la enzima cuando se trabaja con actividades termodinámicas de agua (a_w) muy bajas (258).

Por todo ello, la utilización de disolventes orgánicos en Tecnología Enzimática resulta especialmente atrayente pero también bastante laboriosa y compleja.

Para estudiar qué disolventes serían los más adecuados para llevar a cabo nuestra síntesis de péptidos, se seleccionaron varios según su $\log P$, descartándose por problemas de solubilidad de los sustratos los disolventes de $\log P > 3$, ensayando entonces: 1,1,1-tricloroetano ($\log P = 2.49$), acetato de etilo ($\log P = 0.73$), etanol ($\log P = -0.32$), acetonitrilo ($\log P = -0.34$), 1,4-butanodiol ($\log P = -0.92$) y N,N-dimetilformamida ($\log P = -1.01$), (234). Las condiciones en las que se llevaron a cabo las reacciones fueron 97/3 y 99/1, (v/v) disolvente orgánico/Tris pH=9.0, 0.1 M, a una temperatura de 25 °C empleando como catalizador la enzima libre y los derivados C1-CT y C5-CT. Los resultados aparecen indicados en la **Tabla 24** y en la **Figura 40**.

A la luz de los resultados obtenidos llegamos a la conclusión de que tanto los derivados (con alto y bajo porcentaje de injerto) como la enzima libre presentan una alta actividad sintética cuando el disolvente presenta un $\log P$ elevado; en cambio la conversión a péptido es

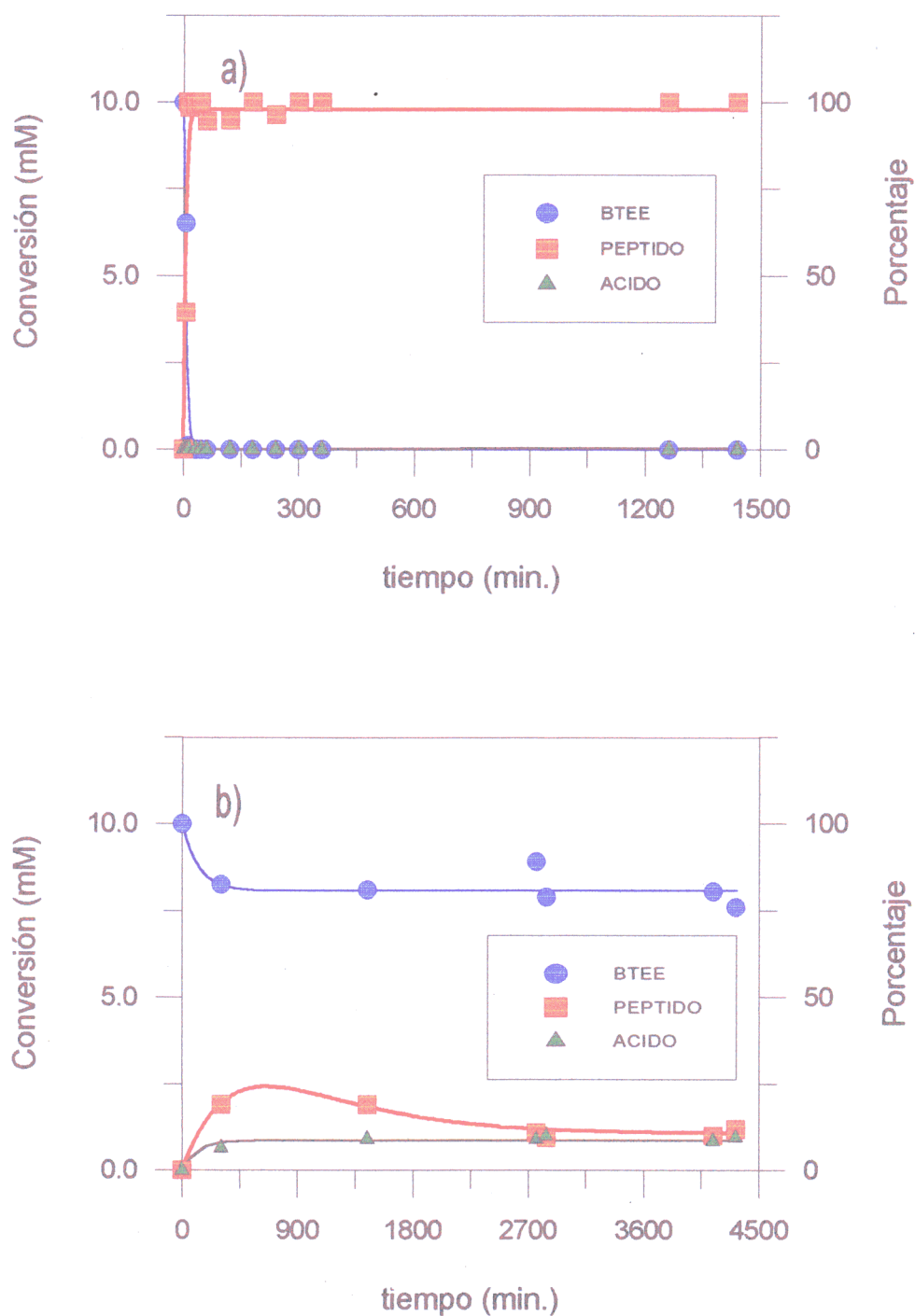


Figura 40.- Influencia del naturaleza del disolvente en la síntesis del dipéptido modelo Bz-*L*-Tyr-*L*-Leu-NH₂, empleando el derivado C1-CT (2.75 mg de derivado/ml equivalentes a 0.24 mg de enzima/ml), en un medio 99/1 (v/v) disolvente orgánico/Tris pH=9.0, 0.1 M. a) 1,1,1-Tricloroetano; b) acetato de etilo.

Tabla 24.- Influencia de la naturaleza del disolvente en la síntesis del dipéptido modelo Bz-L-Tyr-L-Leu-NH₂, empleando diferentes catalizadores; enzima libre (0.075 mg/ml), C1-CT (2.75 mg de derivado/ml equivalentes a 0.24 mg de enzima/ml) y C5-CT (1.3 mg de derivado/ml, equivalentes a 0.053 mg de enzima/ml), la proporción disolvente orgánico/Tris pH=9.0 0.1 M fue 97/3 (v/v) salvo en el caso del derivado C1-CT que se utilizó 99/1 (v/v).

Entr.	Disolventes	log P ^a	Enzima libre liofilizada			Derivado C1-CT no liofilizado			Derivado C5-CT liofilizado		
			% Pép.	t (h.)	V ₀ ^b	% Pép.	t (h.)	V ₀ ^b	% Pép.	t (h.)	V ₀ ^b
1	1,1,1-Tricloroetano	2.49	> 99	0.5	1.195	> 99	0.5	1.678	> 99	6	0.082
2	Acetato de etilo	0.73	95	6	0.124	19,4	24	0.033	> 99	26	0.016
3	Etanol	- 0.32	0	21	0	--- ^c	--- ^c	--- ^c	0	21	0
4	Acetonitrilo	- 0.34	19.5	21	0.005	--- ^c	--- ^c	--- ^c	8	21	0.003
5	1,4-Butanodiol	- 0.92	0	21	0	0	24	0	0	21	0
6	N,N-Dimetilformamida	- 1.01	0	21	0	0	24	0	0	21	0

^a Coeficiente de reparto octanol/agua (234).

^b Velocidad inicial de síntesis de péptido (mM/min.).

^c No ensayadas.

mínima o nula si el $\log P < 0$. El acetonitrilo presenta prácticamente el mismo valor de $\log P$ que el etanol pero el comportamiento de la enzima es diferente en ambos disolventes. Mientras que no se observó síntesis de péptido en el caso del etanol, sí apareció péptido aunque en muy poca proporción en el caso del acetonitrilo (Tabla 24), tanto para la enzima libre (20% de péptido en 24 h), como para el derivado C5-CT (8% de péptido en 24 h). Ello se explica en base al efecto desnaturalizante del disolvente prótico (EtOH) frente al acetonitrilo que no forma tantos enlaces de hidrógeno con las moléculas de enzima y por ello es menos desnaturalizante (158, 175).

Estos hechos vienen a corroborar que el efecto desactivante del disolvente orgánico sobre las moléculas de enzima inmovilizadas se pueden ejercer en tres aspectos, como en el caso de la enzima libre:

- 1) Efecto macroscópico ligado con el valor del $\log P$ o con el coeficiente de solubilidad en agua de Hildebrand (δ) y que controla la cantidad de agua que rodea al derivado. En este punto la acuofilia del soporte es muy importante (201).
- 2) Interacción disolvente-enzima, por ejemplo, reacción de grupos $-\text{NH}_2$ libres de la enzima con el $-\text{CO}-$ de la metilisobutilcetona para formar $-\text{C}=\text{NR}-$, tal y como se describe en la bibliografía (132, 259), o la formación de enlaces de hidrógeno entre la enzima y grupos polares del disolvente.
- 3) Interacciones del disolvente orgánico con el centro activo y/o con el complejo enzima-sustrato

Claramente el disolvente con mejores rendimientos fue el 1,1,1-tricloroetano, el cual posee el valor de $\log P$ más elevado. Mientras que los disolventes con $\log P < 0$, captan todo el agua añadida al medio (1-3)% y además deshidratan a la enzima desactivandola. Por ello, el 1,1,1-tricloroetano que rechaza el agua permite que la enzima este recubierta de su capa de hidratación y por lo tanto sea activa. Por la misma razón, el AcOEt será el segundo disolvente a considerar. Tanto el 1,1,1-tricloroetano como el AcOEt no interaccionan con la enzima libre ni inmovilizada, por ello, permiten que ésta adopte la conformación más activa dentro de su microentorno acuoso y de reacción.

Este resultado está de acuerdo con los datos presentes en la bibliografía, donde se indica cómo el disolvente más apolar es el menos perjudicial (260). No obstante, este disolvente

presenta el inconveniente de la baja solubilidad del donador de acilo en las condiciones de reacción.

Por el contrario, no se consiguió sintetizar dipéptido empleando 1,4-butanodiol ni N,N-dimetilformamida como disolventes, resultados que atribuimos a la elevada hidrofilia que presentan ambos disolventes, con lo cual capturan las pocas moléculas de agua presentes en el medio, evitando que la enzima adquiera *la monocapa de hidratación* que le proporcione la conformación activa para poder llevar a cabo la reacción de síntesis de péptidos (Introducción, **Sección I.4.3.5**).

Por otro lado, empleando disolventes inmiscibles (1,1,1-tricloroetano y acetato de etilo) se observa en ambos casos la formación de un precipitado blanco, cuando el rendimiento a péptido es aproximadamente del 70% lo cual facilita su purificación, y se detecta una baja concentración de ácido a lo largo de toda la reacción sin que aparezca la actividad amidásica. Este cambio en el aspecto del reactor nos indicó que el péptido se extraía del medio de reacción precipitando en la fase orgánica sin sufrir ninguna alteración. Pensando en un sencillo proceso de purificación del dipéptido precipitado (ver Parte Experimental), nos inclinaremos por emplear los sistemas bifásicos (1,1,1-tricloroetano/Tris pH=9.0, 0.1 M y AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M) que también han reportado buenos resultados a otros autores (247).

IV.1.5.4.- Influencia del porcentaje de fase acuosa en el medio de reacción empleado en la síntesis de péptidos

Es de sobra conocido (171-173, 249b), que la proporción de fase acuosa presente en sistemas bifásicos es un factor fundamental en la actividad del catalizador. No obstante, esta cantidad de agua no tiene por que estar directamente relacionada con el agua que rodea al microentorno de la enzima inmovilizada, ya que compiten disolvente, soporte y enzima por retener el agua del medio (Introducción, **Sección I.4.3.5**). Por este motivo y según los resultados anteriores, es lógico plantear un estudio con los diferentes derivados variando la proporción de agua en el reactor. Los resultados aparecen recogidos en las **Figuras 41 a 46** y resumidos en las **Tablas 25 a 29**.

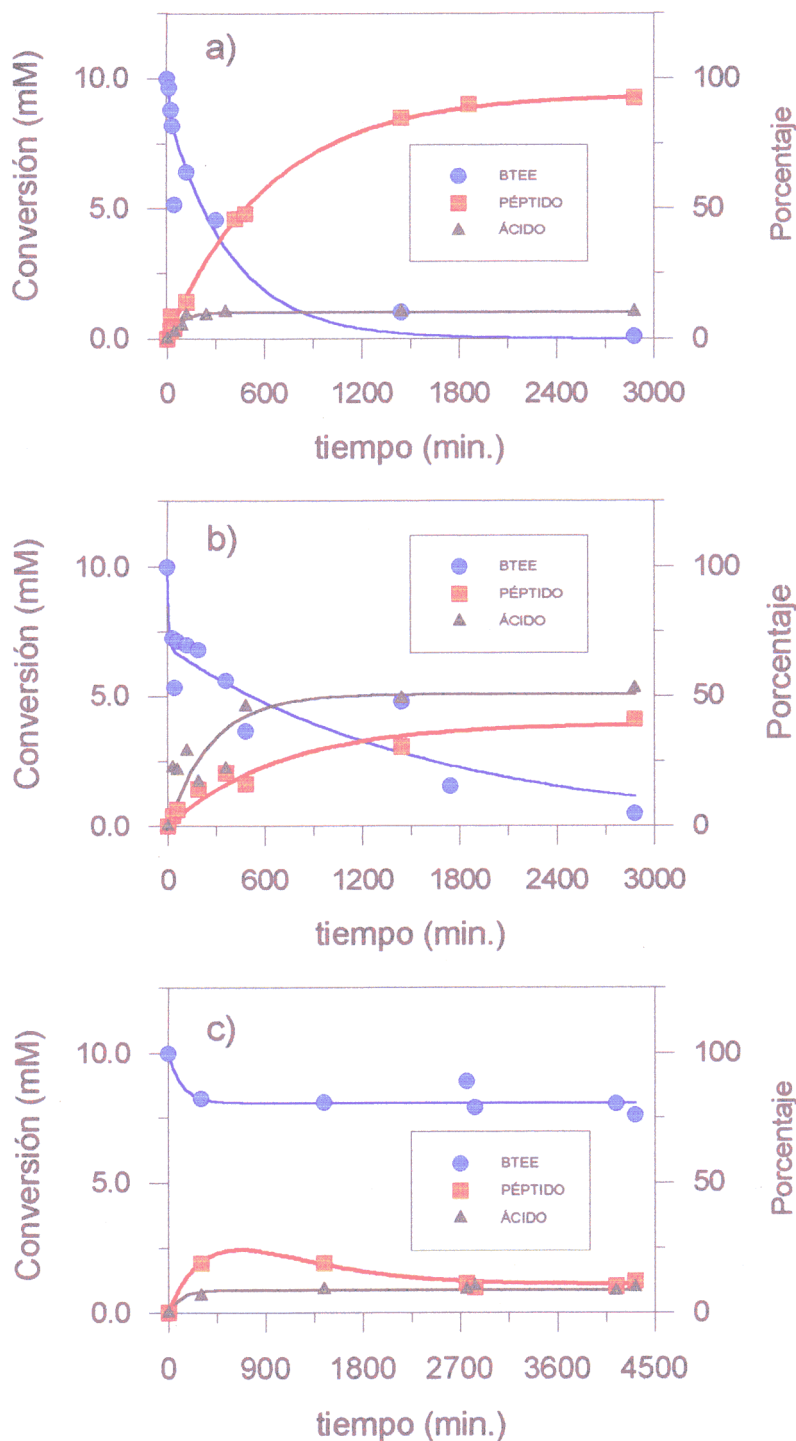


Figura 41.- Síntesis del dipéptido Bz-*L*-Tyr-*L*-Leu-NH₂ empleando el derivado C1-CT (2.75 mg de derivado/ml equivalentes a 0.24 mg de enzima/ml), en un medio AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, a 25 °C de temperatura. a) 2/1; b) 4/1; c) 99/1 (v/v).

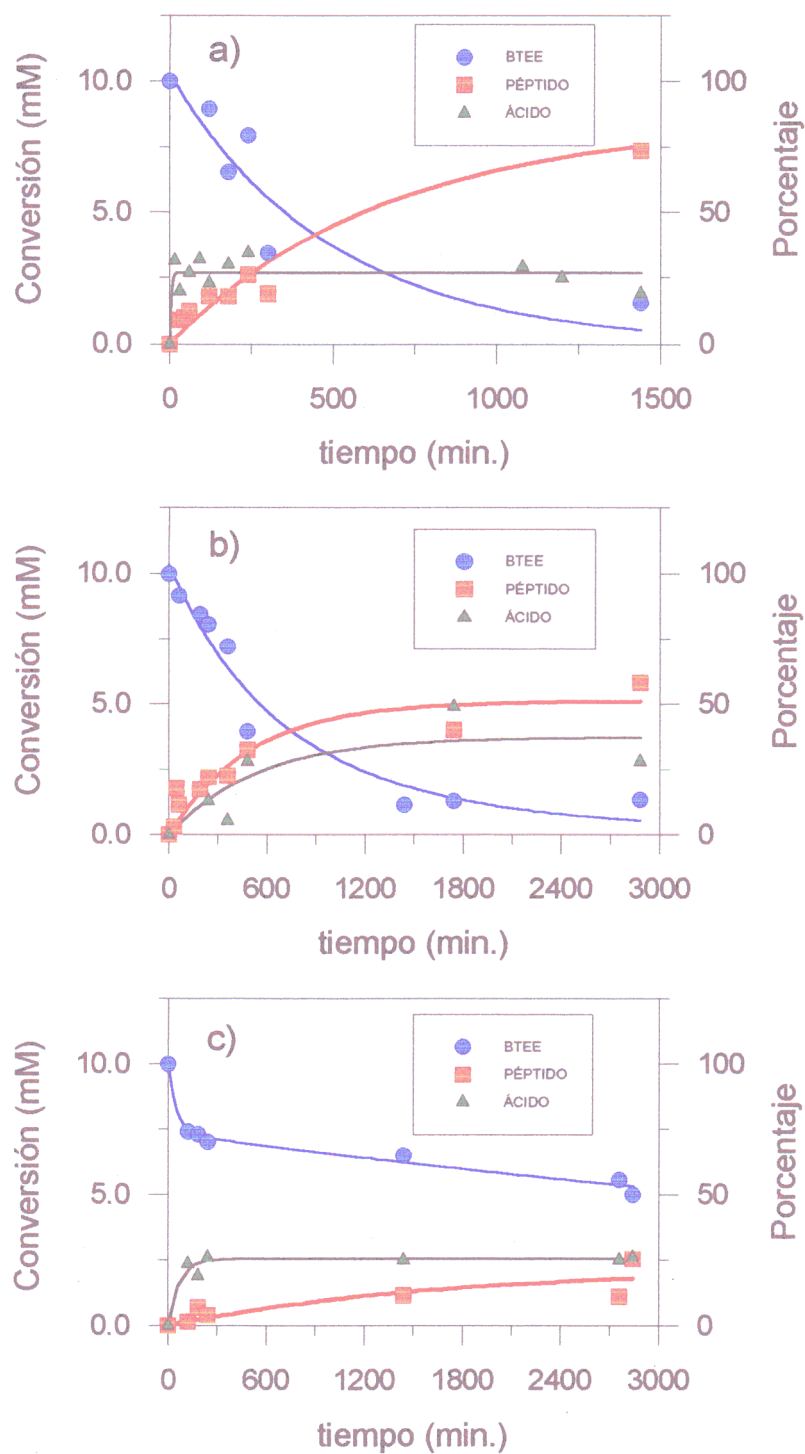


Figura 42.- Síntesis del dipéptido Bz-L-Tyr-L-Leu-NH₂ empleando el derivado C2-CT (7.25 mg de derivado/ml equivalentes a 0.24 mg de enzima/ml), en un medio AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, a 25 °C de temperatura. a) 2/1; b) 4/1; c) 99/1 (v/v).

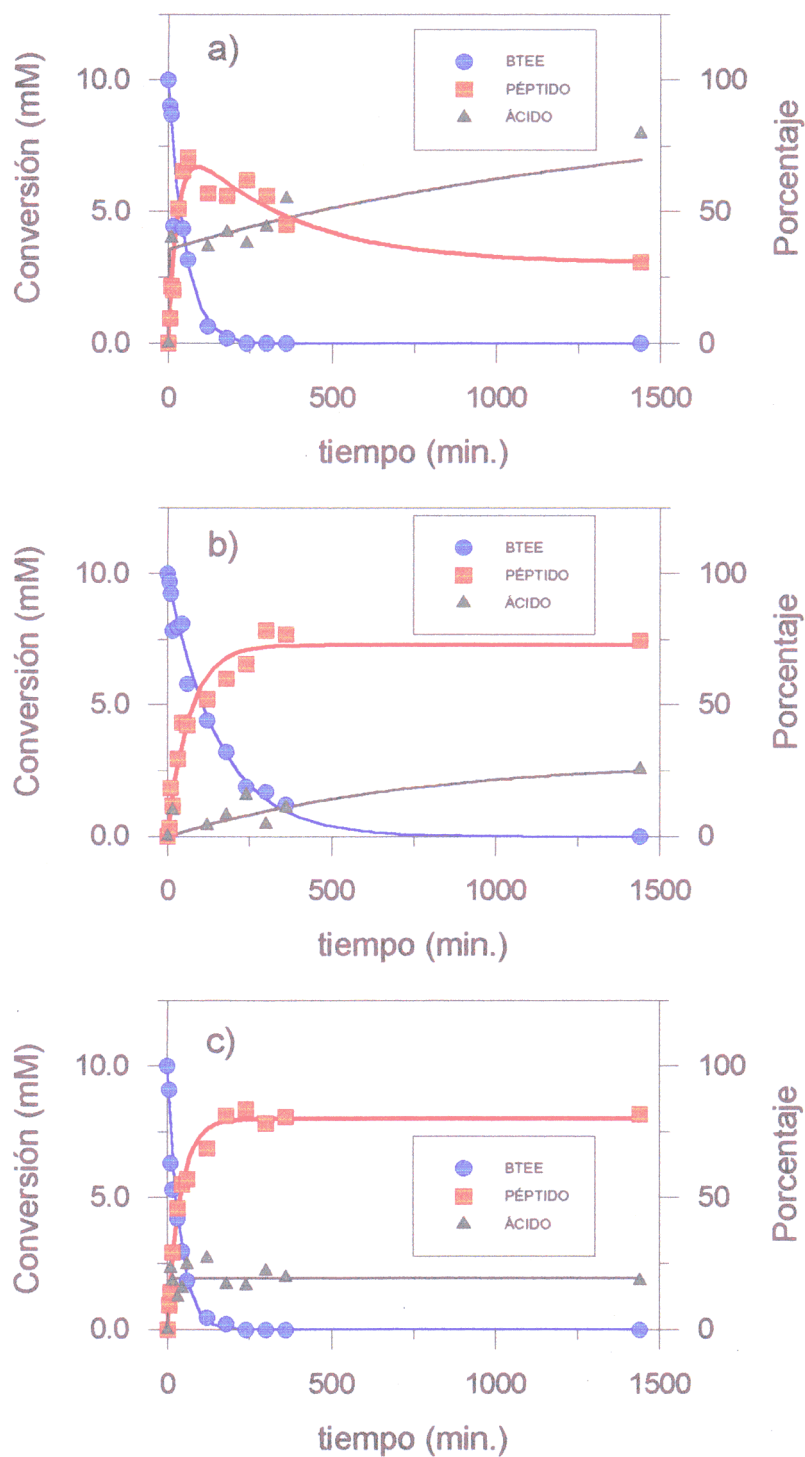


Figura 43.- Síntesis del dipéptido $Bz-L-Tyr-L-Leu-NH_2$, empleando el derivado C3-CT (6.2 mg de derivado/ml equivalentes a 0.24 mg de enzima/ml), en un medio AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, a 25 °C de temperatura. a) 2/1; b) 4/1; c) 99/1 (v/v).

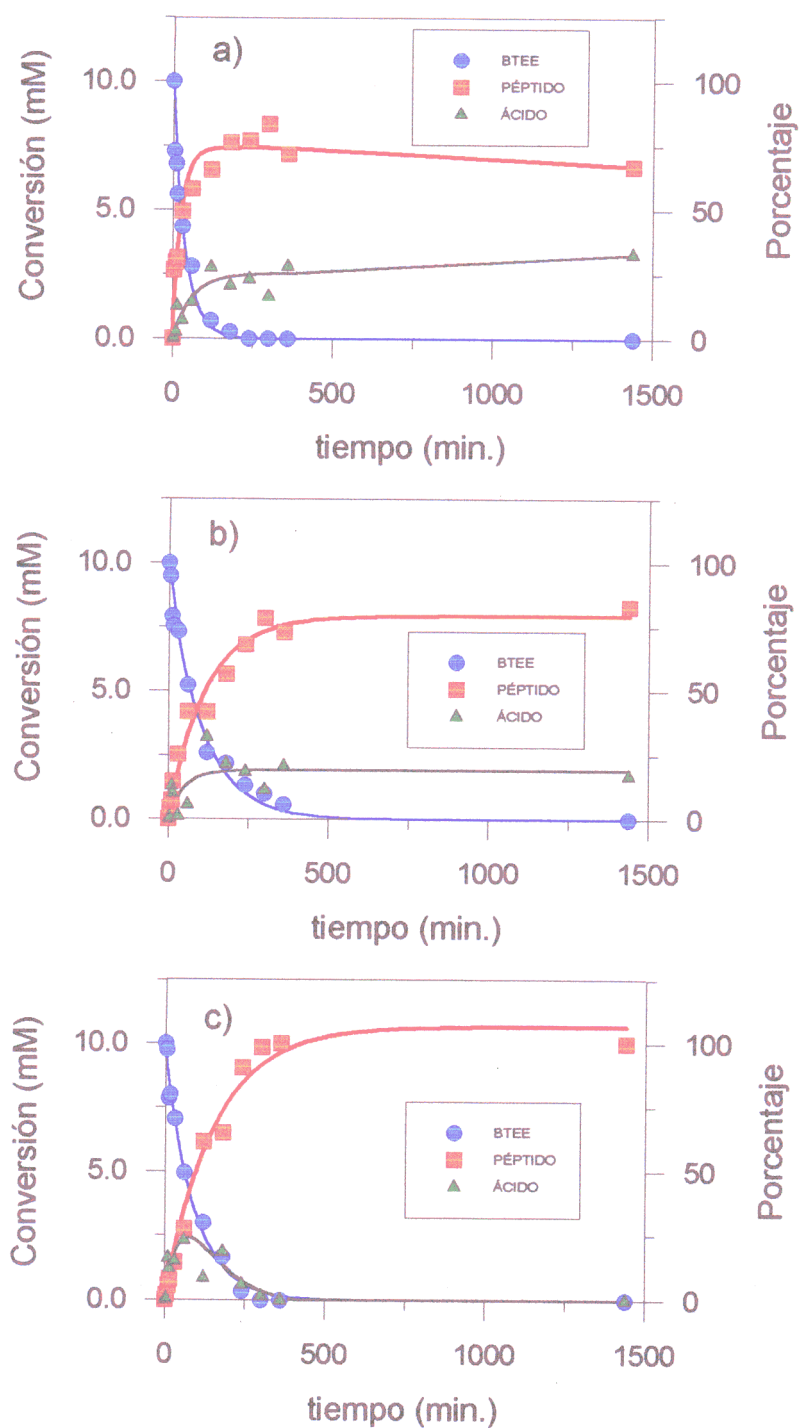


Figura 44.- Síntesis del dipéptido $Bz-L-Tyr-L-Leu-NH_2$ empleando el derivado C4-CT (1.3 mg de derivado/ml equivalentes a 0.24 mg de enzima/ml), en un medio AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, a 25 °C de temperatura. a) 2/1; b) 4/1; c) 99/1 (v/v).

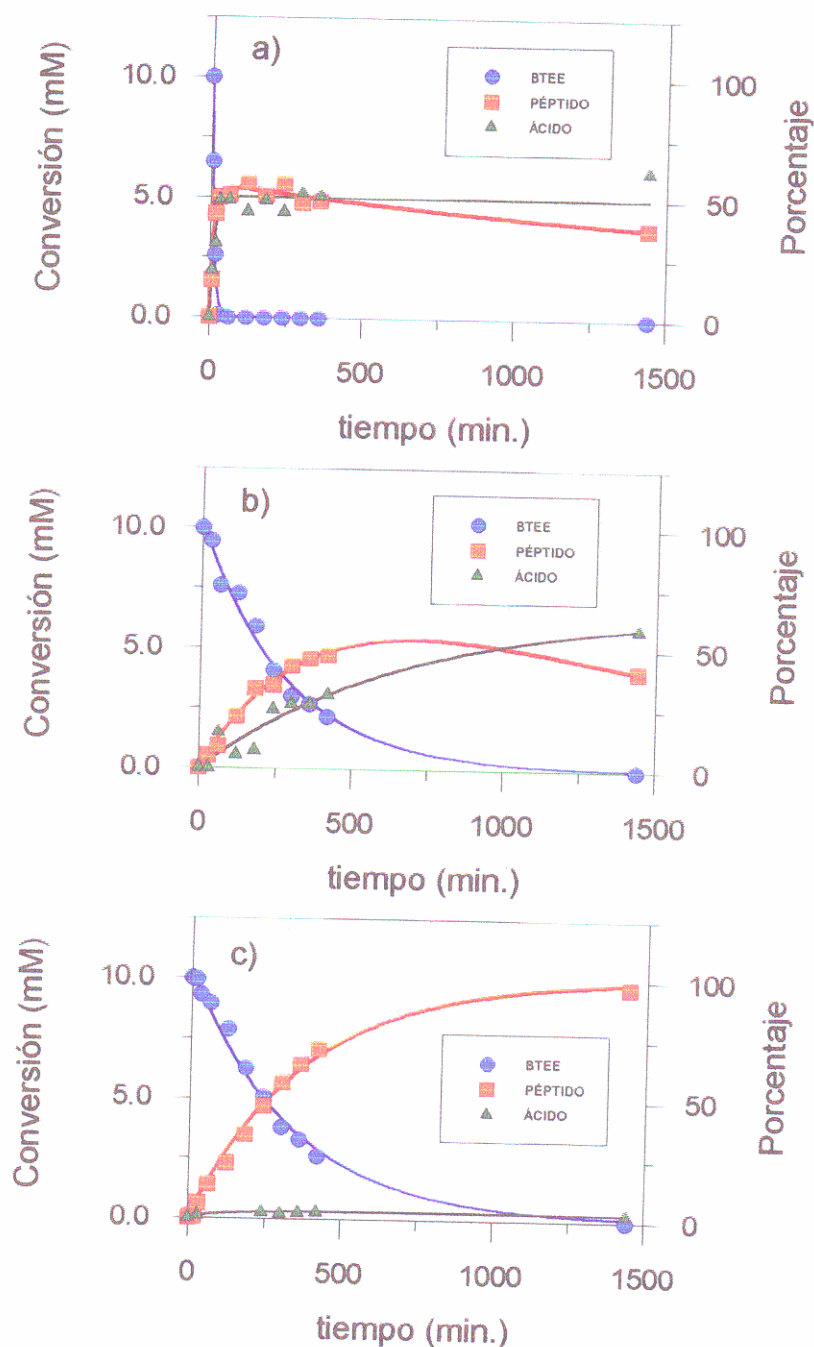


Figura 45.- Síntesis del dipéptido Bz-*L*-Tyr-*L*-Leu-NH₂ empleando el derivado C5-CT (1.3 mg de derivado/ml equivalentes a 0.053 mg de enzima/ml), en un medio AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, a 25 °C de temperatura. a) Tris pH=9.0 0.1 M, saturado con AcOEt; b) 1/1; c) 99/1 (v/v).

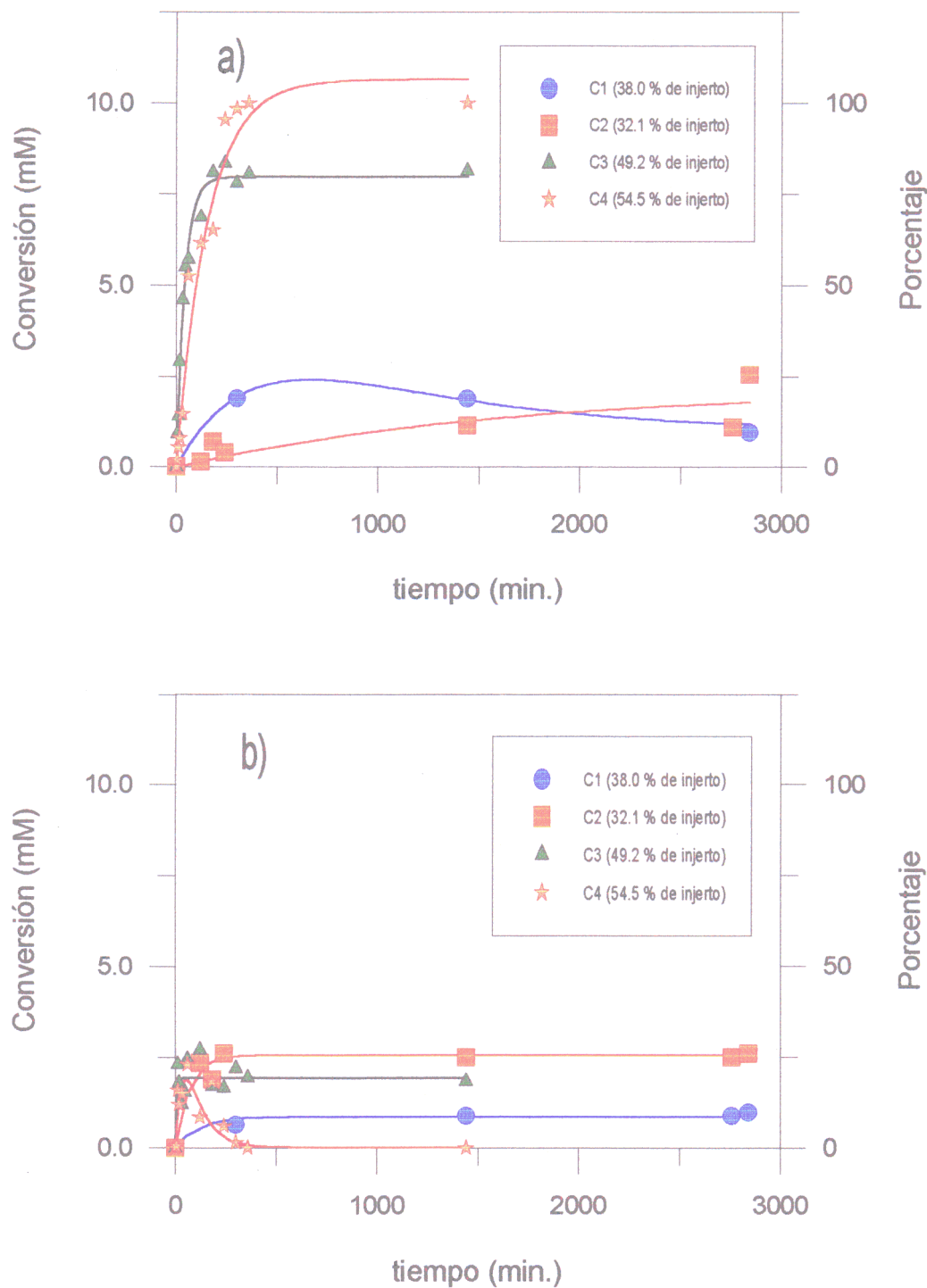


Figura 46.- Influencia del porcentaje de injerto del soporte en la síntesis del dipéptido Bz-L-Tyr-L-Leu-NH₂ empleando como medio de reacción AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 99/1, (v/v) a 25 °C de temperatura. a) Péptido; b) ácido.

Tabla 25.- Síntesis del péptido Bz-L-Tyr-L-Leu-NH₂ con (2.75 mg de derivado C1-CT/ml equivalentes a 0.24 mg de α -quimotripsina/ml), AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, a 25° C de temperatura.

t (h.)	% Péptido	% Ácido	Pép./ác.	V. inicial ^a	Disol./tampón
24	90	10	9.0	0.010	2/1
48	40	50	0.8	0.005	4/1
5	20	5	4.0	0.035	99/1

^a Velocidad inicial de síntesis de péptidos expresada en mM/min.

Tabla 26.- Síntesis del péptido Bz-L-Tyr-L-Leu-NH₂ con (7.75 mg de derivado C2-CT/ml equivalentes a 0.24 mg de α -quimotripsina/ml), AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, a 25° C de temperatura.

t (h.)	% Péptido	% Ácido	Pép./ác.	V. inicial ^a	Disol./tampón
48	84	18	4.7	0.010	2/1
24	52	38	1.4	0.010	4/1
5	18	25	0.7	0.015	99/1

^a Velocidad inicial de síntesis de péptidos expresada en mM/min.

Tabla 27.- Síntesis del péptido Bz-L-Tyr-L-Leu-NH₂ con (6.2 mg de derivado C3-CT/ml equivalentes a 0.24 mg de α -quimotripsina/ml), en AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M a 25° C de temperatura.

t (h.)	% Péptido	% Ácido	Pép./ác.	V. inicial ^a	Disol./tampón
1	70	15	4.7	0.23	2/1
6	77	11	7.0	0.11	4/1
6	81	19	4.3	0.20	99/1

^a Velocidad inicial de síntesis de péptidos expresada en mM/min.

Tabla 28.- Síntesis del péptido Bz-L-Tyr-L-Leu-NH₂ con (1.3 mg de derivado C4-CT/ml equivalentes a 0.24 mg de α -quimotripsina/ml, en AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M a 25° C de temperatura.

t (h.)	% Péptido	% Ácido	Pép./ác.	V. inicial ^a	Disol./tampón
5	84	16	5.3	0.28	2/1
6	83	17	5.3	0.07	4/1
8	99	1	99.0	0.09	99/1

^a Velocidad inicial de síntesis de péptidos expresada en mM/min.

Tabla 29.- Síntesis del péptido Bz-L-Tyr-L-Leu-NH₂ con (1.3 mg de derivado C5-CT/ml equivalentes a 0.053 mg de α -quimotripsina/ml, en AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M a 25° C de temperatura.

t (h.)	% Péptido	% Ácido	Pép./ác.	V. inicial ^a	Disol./tampón
2	52	48	1.1	0.470	Tris saturado ^b
10	58	35	1.7	0.040	1/1
24	95	3	31.7	0.025	99/1

^a Velocidad inicial de síntesis de péptidos expresada en mM/min.

^b Tris pH=9.0, 0.1 M saturado con acetato de etilo.

Como cabía esperar, la proporción óptima de disolventes varía según la naturaleza del soporte y la carga enzimática.

El primer efecto evidente que debe comentarse es el hecho de que al aumentar el porcentaje de injerto, los derivados son más activos (mayor relación péptido/ácido) en medios con menor cantidad de agua, 99/1, (v/v). Por el contrario, cuanto menor es el porcentaje de injerto, el derivado se muestra más activo en un medio eminentemente acuoso (C1-CT, **Tabla 25**). Así, derivados con poco grado de injerto (C1-CT y C2-CT 38.0% y 32.2% respectivamente (**Tabla 16**), referido a la masa total de soporte) requieren grandes cantidades de medio acuoso (2/1) para proporcionarnos una buena relación péptido/ácido, mientras que

con los derivados C4-CT y C5-CT (54.5% de injerto, referido a la masa total de soporte) ocurre lo contrario (mejor medio 99/1). El derivado C3-CT (49.2% de injerto, referido a la masa total de soporte) se encuentra en una posición intermedia, donde la proporción más interesante es 4/1, (v/v) AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M.

Estos hechos indican claramente como derivados más hidrófilos requieren menos cantidad de agua para llevar a cabo la síntesis peptídica puesto que el microentorno enzimático será más favorable, y necesitaremos menos cantidad de agua en el macroentorno. Por tanto, la competencia entre el sistema enzima-soporte y el disolvente por captar agua se inclina más fácilmente hacia el primer término en aquellos derivados con elevado porcentaje de injerto.

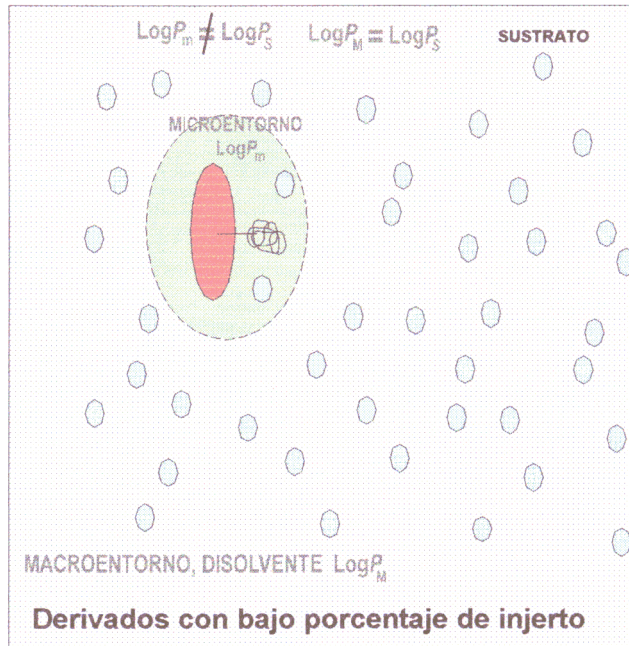
Muchos autores (242), han observado la existencia de problemas de transferencia de masa en sistemas líquido-sólido, especialmente cuando los reactivos y la matriz del soporte difieren mucho en hidrofobicidad. Este hecho fue estudiado por Fukui y cols (220, 221), los cuales llevaron a cabo la inmovilización de biocatalizadores en geles obtenidos por fotopolimerización de resinas y macromoléculas de uretano, tal y como indicamos en la introducción teórica (Sección I.4.4.2) variando la relación entre moléculas de fragmentos hidrofóbicos e hidrofílicos, alterando así las características de los geles hasta encontrar una relación óptima hidrofilia/hidrofobia entre los sustratos y el gel, solucionando los problemas de transferencia de masa. Para minimizar los problemas de transferencia de masa anteriormente citados Mattiasson y cols (159) postulan que la velocidad de reacción en sistemas biocatalizados que contienen una interfase puede ser optimizada según estas reglas:

- 1.- $|\log P_M - \log P_S|$ debe ser máximo.
- 2.- $|\log P_m - \log P_s|$ debe ser mínimo.

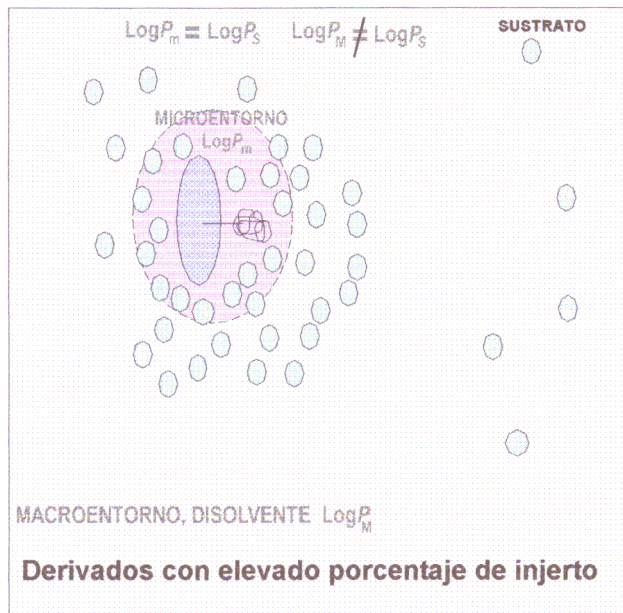
donde $\log P_M$, $\log P_m$ y $\log P_S$ representan, respectivamente, los coeficientes de reparto del macroentorno ("bulk phase"), del microentorno o interfase en el que se encuentra el biocatalizador, y el del sustrato (Esquema 31).

En el caso de los dos derivados con igual porcentaje de injerto C4-CT y C5-CT (Fig. 44 y 45), tenemos que el derivado con más carga enzimática (C4-CT) conduce a mayores conversiones en péptido y sobre todo a mejores relaciones péptido/ácido.

a)



b)



Esquema 31.- Influencia del coeficiente de reparto de los sustratos, del microentorno del derivado y del macroentorno en las reacciones de síntesis peptídica. a) $\log P_m \neq \log P_s$, derivados con bajo porcentaje de injerto b) $\log P_m \approx \log P_s$, derivados con elevado porcentaje de injerto

En nuestro caso, a la luz de los resultados recogidos en las **Figuras 44 y 45** se observa un aumento de la velocidad inicial de síntesis con el incremento del porcentaje de medio acuoso, 2/1 vs 99/1, (v/v). Este hecho ha sido recogido en la bibliografía (159) para el caso de la α -quimotripsina adsorbida sobre celite empleando acetonitrilo como disolvente y se explica en función de la hidratación de la enzima inmovilizada.

Para una mejor visualización de los resultados se han representado en la **Figura 46** las curvas de progreso para la reacción estándar de síntesis, empleando un medio 99/1 (v/v) AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, obtenidas para los diferentes derivados. Como puede verse los derivados con mayor porcentaje de injerto conducen a un mayor rendimiento en péptido.

IV.1.5.5.- Influencia de la temperatura en los procesos de síntesis peptídica

A fin de estudiar la influencia de la temperatura en nuestros procesos de síntesis peptídica, se llevaron a cabo ensayos a diferentes temperaturas; 4, 25 y 37 °C, con el derivado C4-CT y siguiendo el esquema general de síntesis descrito en la Parte Experimental (**Sección III.6.4.5**), en las condiciones más interesantes desde el punto de vista sintético para este derivado AcOEt/(Tris pH=9.0, 0.1 M en proporciones 99/1, (v/v). Los resultados aparecen reflejados en la **Figura 47**.

El rendimiento final, cercano al 100% obtenido a 4 °C y a 25 °C es similar aunque la velocidad de síntesis es mucho menor para la reacción a 4 °C, como puede observarse en la **Figura 47**. Es de sobra conocido que un incremento moderado de la temperatura origina un aumento en las velocidades de reacción (137, 261).

Cuando la reacción se llevo a cabo a una temperatura de 37 °C, el rendimiento final en péptido resultó ser menor. Este hecho confirma la desactivación observada de los derivados a esta temperatura, (**Sección IV.2.2**). Este resultado concuerda con la importancia actual de la "crioenzimología" (161-163), metodología que minimiza estos problemas de desactivación enzimática por la temperatura y permite obtener buenas relaciones péptido/ácido a temperaturas inferiores a 0 °C.

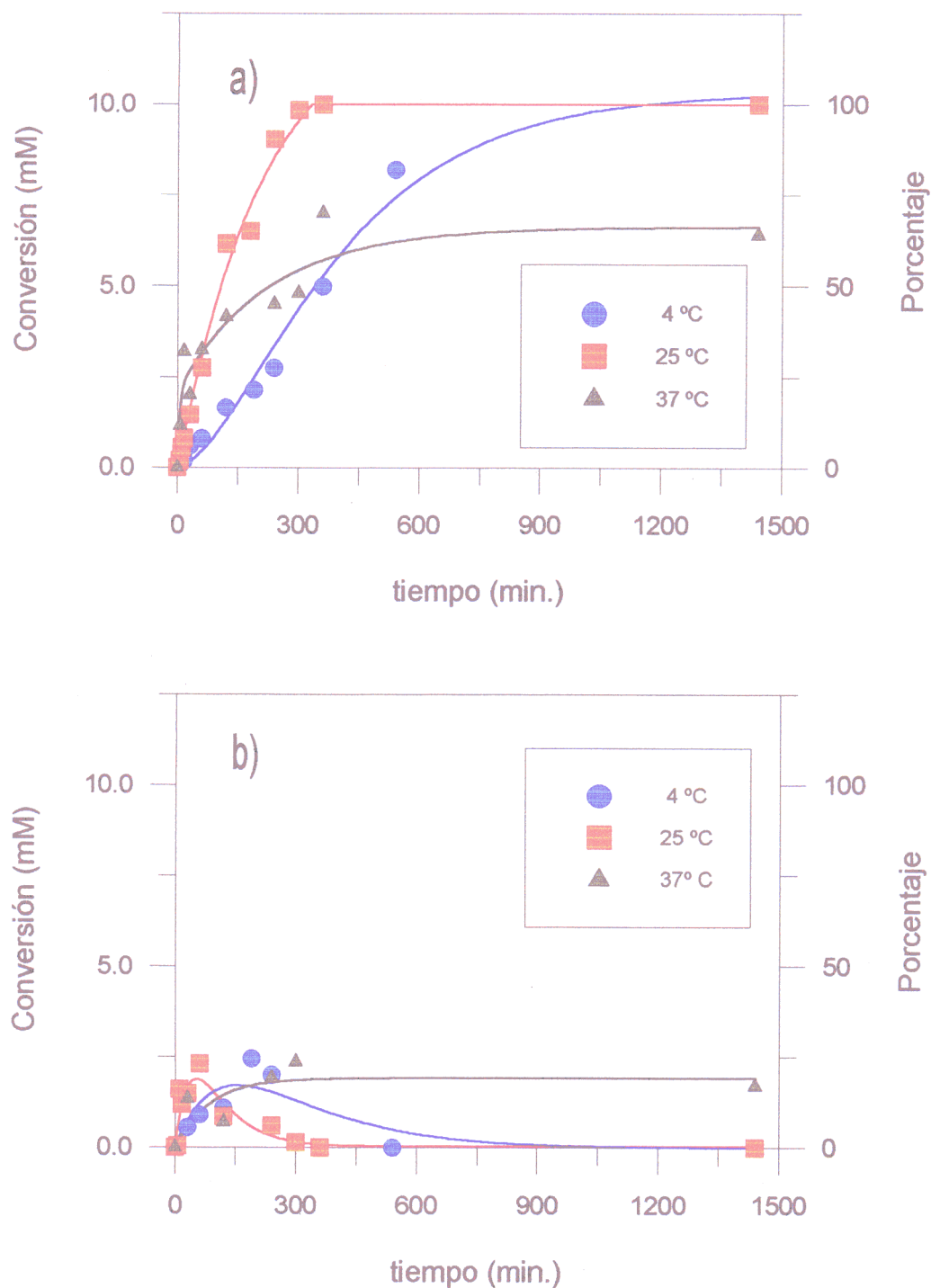


Figura 47.- Influencia de la temperatura en la síntesis del dipéptido modelo Bz-*L*-Tyr-*L*-Leu-NH₂, empleando el derivado C4-CT (1.3 mg de derivado/ml equivalentes a 0.24 mg de enzima/ml) y como medio de reacción AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 99/1, (v/v). a) Péptido; b) ácido.

El soporte parece influir en este tipo de experimentos de forma decisiva ya que tal y como se ha descrito en la bibliografía (233), cuando se llevan a cabo reacciones de esterificación (entre Ac-*L*-Trp-OH y feniletanol) con derivados de α -quimotripsina sobre geles de agarosa en el intervalo de temperaturas comprendido entre 18 y 38°C, se produce un incremento paulatino de la velocidad inicial de síntesis de forma opuesta a lo que sucede en el caso de nuestros derivados inmovilizados sobre copolímeros de injerto.

IV.1.5.6.- Influencia de la concentración de donador de acilo

La variación de la concentración de donador de acilo (desde 5 hasta 20 mM) en la síntesis de péptidos catalizada por el derivado C5-CT debería seguir un comportamiento michaeliano, como cabría esperar cuando la concentración de BTEE, se encuentra siempre en defecto con respecto a la de nucleófilo (40 mM). En la **Figura 48** aparece representada dicha variación.

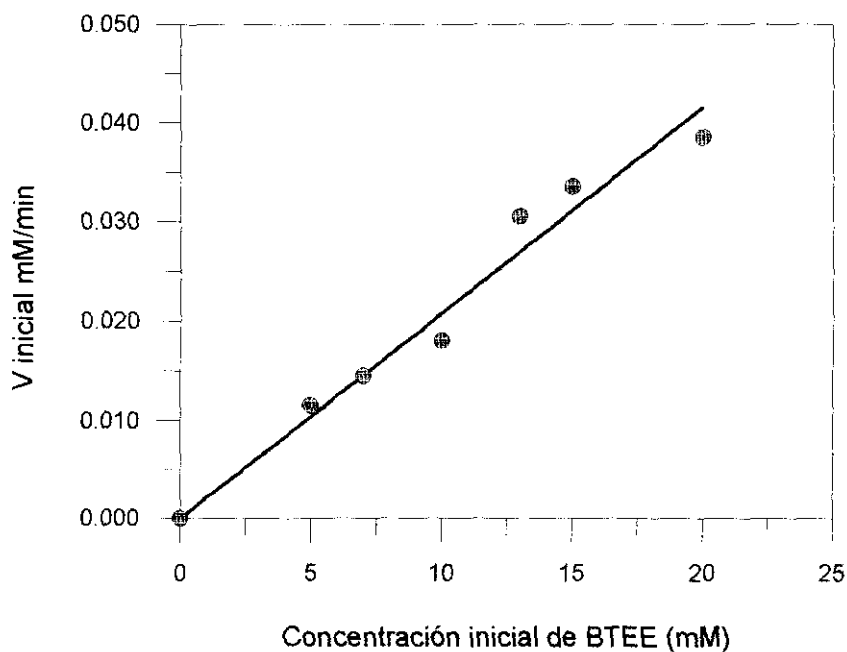


Figura 48.- Variación de la velocidad inicial de síntesis del dipéptido Bz-*L*-Tyr-*L*-Leu-NH₂, en función de la concentración de donador de acilo empleando el derivado C5-CT (1.3 mg de derivado/ml equivalentes a 0.053 mg de enzima/ml) como medio AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 97/3, (v/v) y 40 mM de *L*-leucinamida.

Los datos se ajustan perfectamente a una recta que pasa por el origen de pendiente $(2,1 \pm 0.2) \times 10^{-3} \text{ min.}^{-1}$ y $R^2 = 0.991$, lo que nos sitúa en el tramo inicial de una curva michaeliana, indicándonos que la concentración de donador de acilo empleada no satura en ningún momento al catalizador ($S \ll K_m$), con lo cual el aprovechamiento del catalizador es prácticamente óptimo (159).

En este tramo inicial de la curva michaeliana $\text{Pendiente}/[E_0] = k_{\text{cat}}/K_m$, siendo este cociente una medida de la eficacia catalítica de una enzima, en este caso su valor es aproximadamente 1, con lo cual $k_{\text{cat}} \approx K_m$, como en los procesos de hidrólisis **Sección IV.1.4.1.**

Otros autores empleando como donador de acilo (*Z-L-Phe-OMe*) en procesos de síntesis de péptidos utilizando acetato de etilo saturado con agua y α -quimotripsina inmovilizada sobre celite como catalizador (2.25 mg de enzima/ml) han obtenido resultados similares a los nuestros (159) obteniendo valores muy elevados de K_m , aparente.

IV.1.5.7.- Influencia de la concentración de nucleófilo

Para estudiar el efecto de la concentración de nucleófilo y tomando como referencia un trabajo realizado por Jakubke y cols (145) en el cual se estudiaba la eficacia de varios nucleófilos en los procesos de deacilación del complejo acil-enzima ($\text{H-L-Leu-NH}_2 > \text{H-L-Val-NH}_2 > \text{H-D-Leu-NH}_2$), se realizó un estudio similar en el que se varió la concentración de un solo nucleófilo para conocer su influencia a lo largo de todo el proceso sintético.

Así se llevaron a cabo reacciones de síntesis del dipéptido modelo *Bz-L-Tyr-L-Leu-NH₂* en presencia de AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 97/3, (v/v), el derivado empleado fue C5-CT y siguiendo el esquema general de síntesis peptídica (**Sección III.5**). Se varió la concentración de nucleófilo desde 5 hasta 50 mM, manteniendo constante la concentración de donador de acilo BTEE en 10 mM. Los resultados aparecen recogidos en las **Figuras 49, 50 y 51**, mientras que en la **Figura 52** se recogen las velocidades iniciales de formación de péptido a diferentes concentraciones de nucleófilo. Observando estas figuras, se comprueba como aumentando la cantidad de nucleófilo en la reacción, se consigue disminuir la concentración

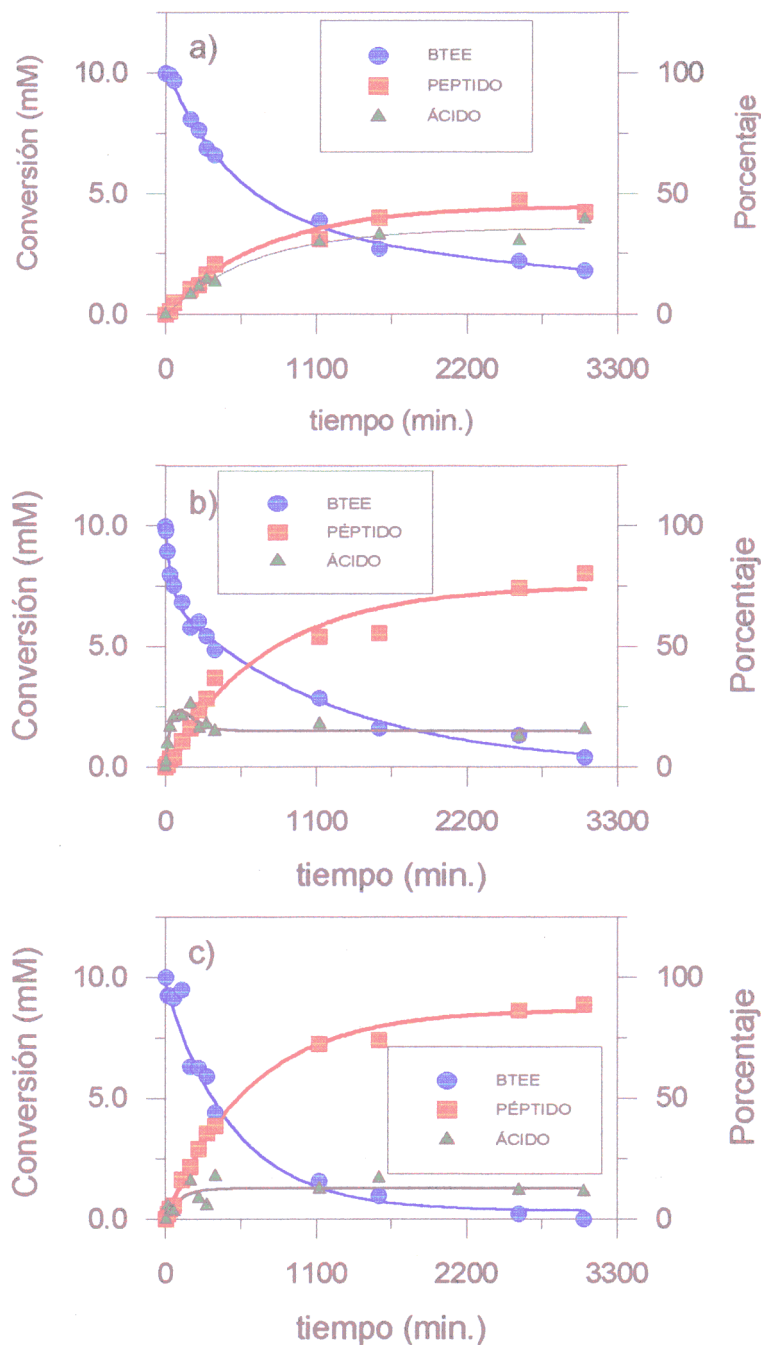


Figura 49.- Influencia de la concentración de nucleófilo ($H-L-Leu-NH_2$) en la síntesis del dipéptido modelo $Bz-L-Tyr-L-Leu-NH_2$ empleando BTEE (10 mM) como donador de acilo, como catalizador, el derivado C5-CT (1.3 mg de derivado/ml equivalentes a 0.053 mg de enzima/ml) y como medio de reacción AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 97/3, (v/v). a) 5 mM b) 10 mM y c) 15 mM.

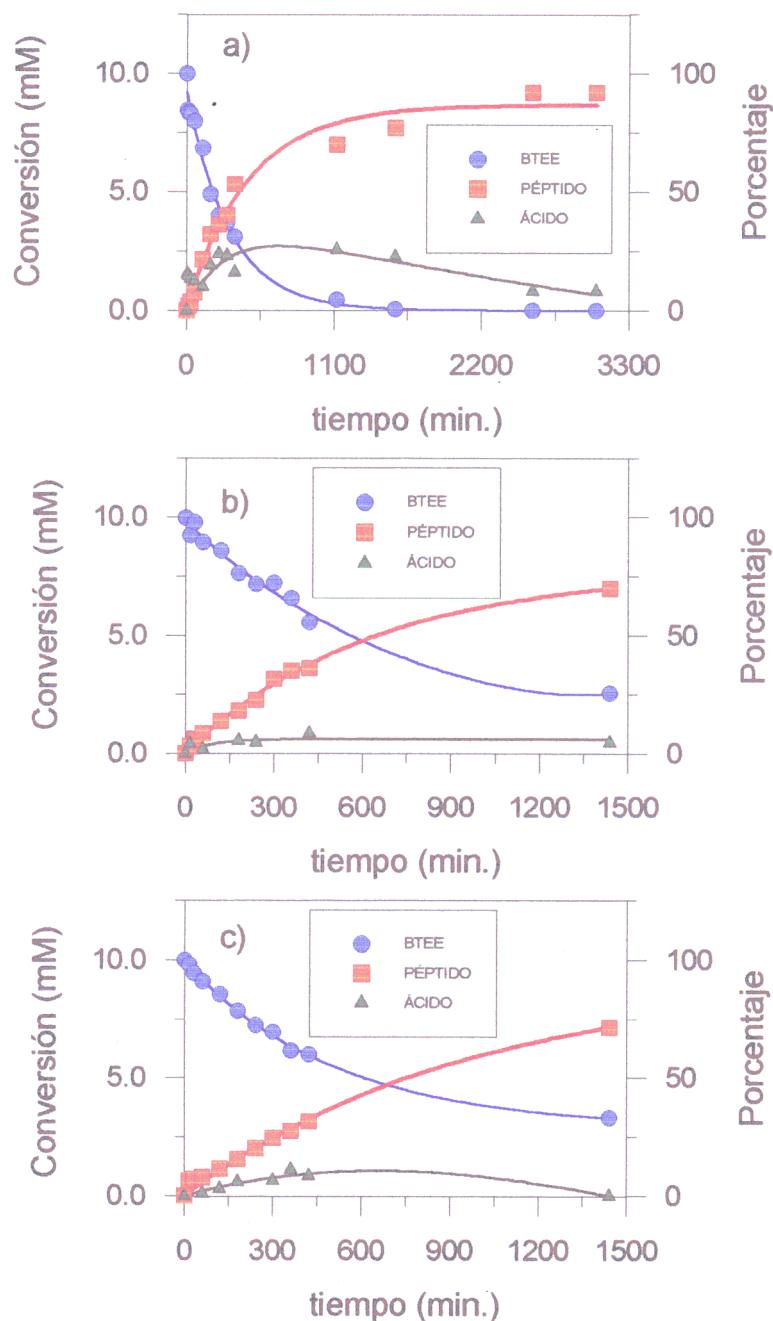


Figura 50.- Influencia de la concentración de nucleófilo ($H-L-Leu-NH_2$) en la síntesis del dipéptido modelo $Bz-L-Tyr-L-Leu-NH_2$, empleando BTEE (10 mM) como donador de acilo, como catalizador, el derivado C5-CT (1.3 mg de derivado/ml equivalentes a 0.053 mg de enzima/ml) y como medio de reacción AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 97/3, (v/v). a) 20 mM b) 25 mM y c) 30 mM.

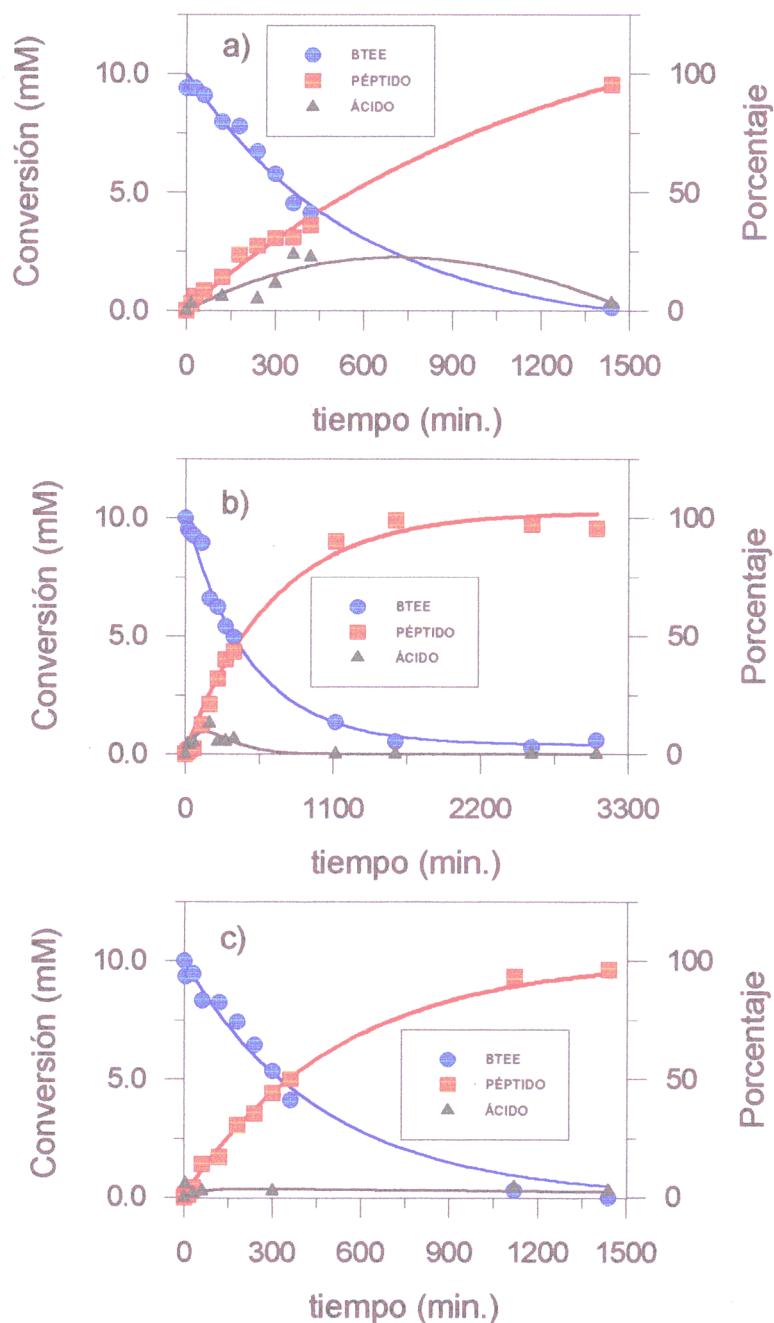


Figura 51.- Influencia de la concentración de nucleófilo ($H-L-Leu-NH_2$) en la síntesis del dipéptido modelo $Bz-L-Tyr-L-Leu-NH_2$ empleando BTEE (10 mM) como donador de acilo, como catalizador, el derivado C5-CT (1.3 mg de derivado/ml equivalentes a 0.053 mg de enzima/ml) y como medio de reacción AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 97/3, (v/v). a) 35 mM b) 40 mM y c) 50 mM.

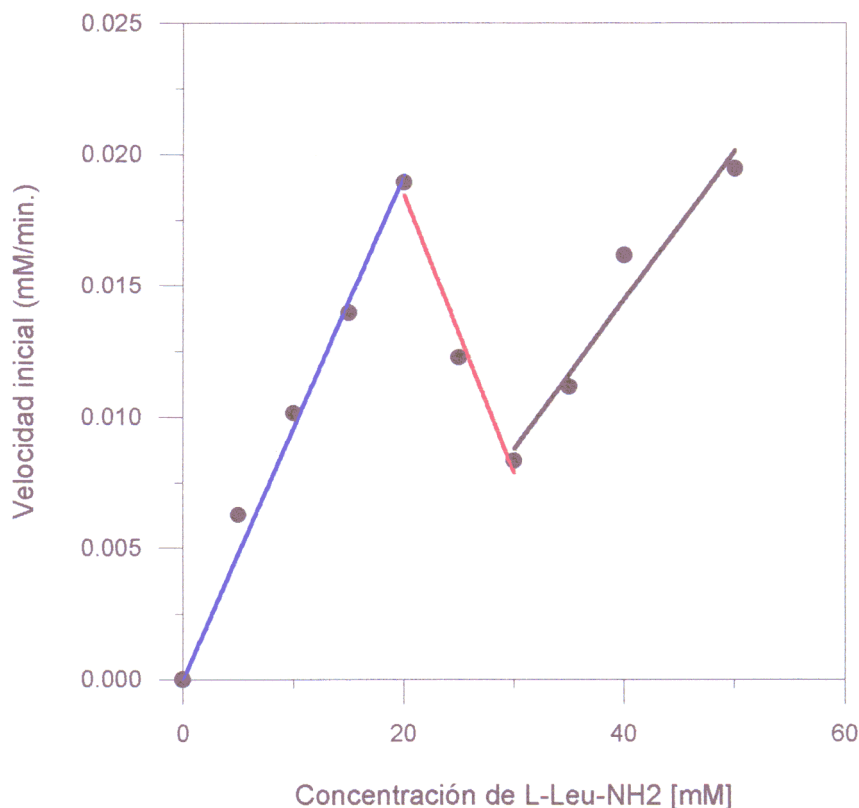


Figura 52.- Variación de la velocidad inicial de síntesis del dipéptido Bz-*L*-Tyr-*L*-Leu-NH₂, en función de la concentración de nucleófilo empleando el derivado C5-CT (1.3 mg de derivado/ml equivalentes a 0.053 mg de enzima/ml) como medio AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 97/3, (v/v) y 10 mM de BTEE.

final de ácido. Este resultado está indicando la existencia de dos tipos de reacciones: una principal, bajo control cinético, y otra que se manifiesta cuando la reacción está muy avanzada, hecho que podría atribuirse a la reacción de síntesis de péptidos termodinámicamente controlada, esto es, aquella que conduce al péptido por reacción directa del ácido con el nucleófilo (**Figura 9, Sección I.4.2**).

Como puede observarse, se produce una total desaparición de BTEE para 20, 40 y 50 mM de *L*-leucinamida, mientras que para 25 y 30 mM de *L*-leu-NH₂ existe una cantidad de BTEE remanente al tiempo final de reacción, lo que nos hizo pensar en la existencia de procesos dependientes de la concentración de nucleófilo, hecho que queda reflejado en la **Figura 52**, donde se pueden distinguir 3 tramos bien diferenciados:

1) Para las concentraciones bajas de nucleófilo comprendidas entre 0 y 20 mM, puede observarse como se aumenta la velocidad inicial de síntesis de péptido al incrementarse la concentración de nucleófilo, hecho lógico, teniendo en cuenta el carácter hidrofóbico que el soporte induce en el microentorno enzimático, que hace necesaria una elevada concentración de nucleófilo polar en el macroentorno para disponer de una óptima concentración del mismo en las cercanías de la enzima. Por tanto, consideramos que el paso lento de la velocidad de reacción, en este sistema, será la desacilación por el nucleófilo del complejo acil-enzima.

2) Desde 20 mM hasta 30 mM se produce el efecto contrario, actuando el nucleófilo como inhibidor, impidiendo la desaparición total de BTEE al finalizar la reacción (comparar Figuras 49a y 49b con 50b y 50c). Este hecho puede atribuirse a una ocupación competitiva del centro de reconocimiento del sustrato donador de acilo (ρ_2) por el exceso de nucleófilo presente en el medio, puesto que la α -quimotripsina es capaz de aceptar ésteres y/o amidas de leucina como agentes acilantes (133, 252).

3) A partir de 30 mM, el microentorno del derivado ya se encontraría saturado por la *L*-leucinamida; sin embargo, se produce un aumento en la velocidad inicial de síntesis peptídica, posiblemente debido a existencia de procesos de control termodinámico que se acentúan con elevadas proporciones de medio orgánico 97/3, (v/v) AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M y altas concentraciones de uno de sustratos (Sección I.4.2.2). Puesto que estamos estudiando velocidades iniciales de síntesis de péptidos, hemos de concluir que estos procesos de síntesis termodinámica se producen simultáneamente con los procesos de síntesis cinéticamente controlada ya desde el inicio de la reacción para estas elevadas concentraciones de nucleófilo, como se refleja en la Figura 51c, donde se observa ya que desde el comienzo de la reacción no se detecta la presencia de ácido.

Volviendo a las especificaciones de Jakubke y cols, los cuales, después de varios tratamientos matemáticos, llegaron a la siguiente expresión (145):

$$\frac{[\text{ácido}]}{[\text{péptido}]} = \frac{\ln \frac{N}{N - [\text{péptido}]}}{[\text{péptido}]} * \rho_0 + \rho_N$$

donde si representásemos la relación [ácido]/[péptido] en función del $\ln(N/(N-$

[péptido])/[péptido] obtendríamos una recta, siempre teniendo en cuenta las consideraciones hechas por estos autores entre las que no aparece la existencia de un proceso termodinámico.

Por lo tanto, no es de extrañar que nuestros resultados no se ajustaran a una recta, lo que hace inservible este método para el cálculo del coeficiente de partición

IV.1.6.- REACCIONES DE SÍNTESIS DE PÉPTIDOS TERMODINÁMICAMENTE CONTROLADAS

A fin de comprobar nuestras hipótesis acerca de la presencia en ciertos casos de procesos de síntesis peptídica bajo control termodinámico, se realizó un ensayo en el cual se utilizó únicamente como donador de acilo Ac-L-Tyr-OH (10 mM), con una elevada concentración de nucleófilo (H-L-Leu-NH₂ (50 mM) para favorecer la aparición de dicho proceso sintético, en condiciones experimentales similares a los descritos en el apartado anterior. El resultado aparece recogido en la **Figura 53**, donde puede comprobarse como se

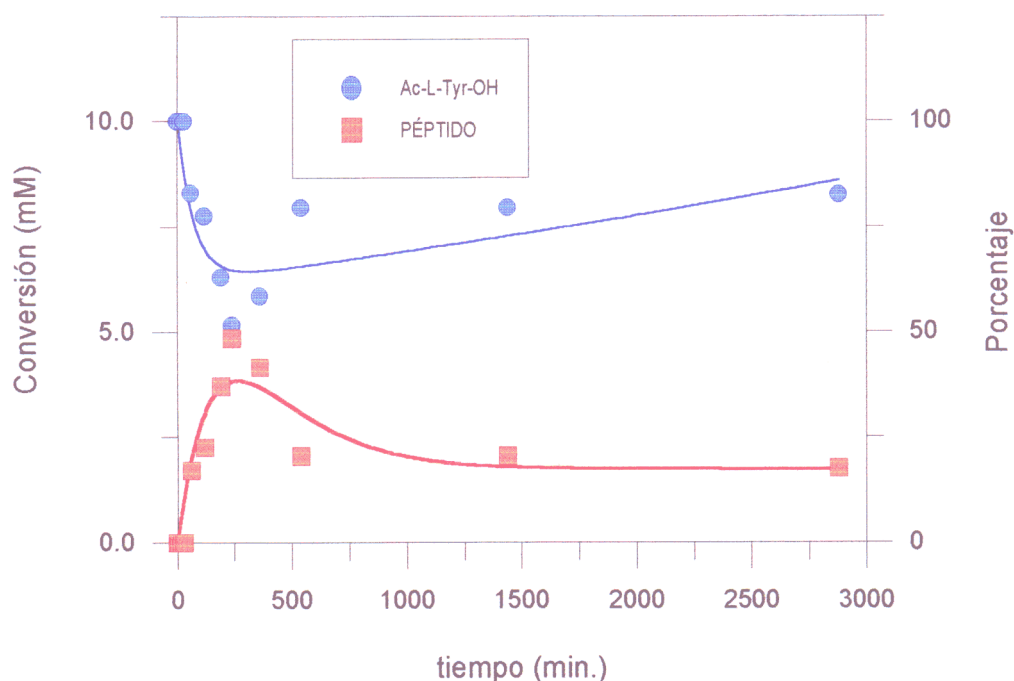


Figura 53.- Síntesis termodinámicamente controlada del dipéptido Ac-L-Tyr-L-Leu-NH₂, empleando, Ac-Tyr-OH (10 mM) como único donador de acilo, 1.3 mg del derivado C4-CT (0.24 mg de enzima/ml), AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 97/3, (v/v) a 25 °C de temperatura.

produce la síntesis del péptido desde el comienzo de la reacción, de manera que aumenta la concentración de péptido con el tiempo hasta un punto a partir del cual podemos decir que se alcanza el equilibrio. Por tanto, se puede concluir que cuando se trabaja con altas concentraciones de nucleófilo y un elevado porcentaje de medio orgánico, se puede producir fenómenos bajo control termodinámico.

Probablemente, no se alcanzó un mayor rendimiento en péptido pues las condiciones experimentales empleadas no son las ideales para llevar a cabo este tipo de procesos como se comentó en la Introducción de esta memoria (Secciones I.4).

IV.1.7.- REACCIONES DE SÍNTESIS DE PÉPTIDOS EN REACTOR DISCONTINUO Y POSTERIOR PURIFICACIÓN DE LOS MISMOS

IV.1.7.1.- Reutilización de los derivados inmovilizados sobre copolímeros de injerto (PE/HEMA).

Un aspecto muy interesante en todo trabajo en biocatálisis aplicada es la posibilidad de reutilizar el biocatalizador después de un ciclo productivo (**Figura 13, Sección I.4.4.2**). Estos ensayos se llevaron a cabo, según se describe en la **Sección III.6.6.1**, empleando una concentración de 0,24 mg de α -quimotripsina/ml y los derivados C1-CT (2.75 mg de derivado/ml), C2-CT (7.25 mg de derivado/ml), utilizando AcOEt/Tris pH=9.0 80/20 (v/v) como medio de reacción, mientras que para el derivado C4-CT (1.3 mg de derivado/ml) las proporciones para llevar a cabo las reacciones de síntesis peptídica fueron (99/1) (v/v), empleando como disolventes acetato de etilo y 1,1,1-tricloroetano. Los resultados obtenidos aparecen en las **Figuras 54, 55, 56 y 57**, recogiéndose en las **Tablas 30, 31, 32 y 33**, los parámetros medidos para cada caso.

Observando los resultados representados en la **Figura 54** con C1-CT puede apreciarse que la peor relación péptido/ácido (**Tabla 30**) se obtiene en la primera utilización del biocatalizador. En la reutilización posterior disminuye de manera drástica el porcentaje de ácido obtenido; este hecho puede explicarse puesto que, al no haber sido liofilizado este derivado inmovilizado previamente a su uso, la enzima debe poseer una elevada proporción

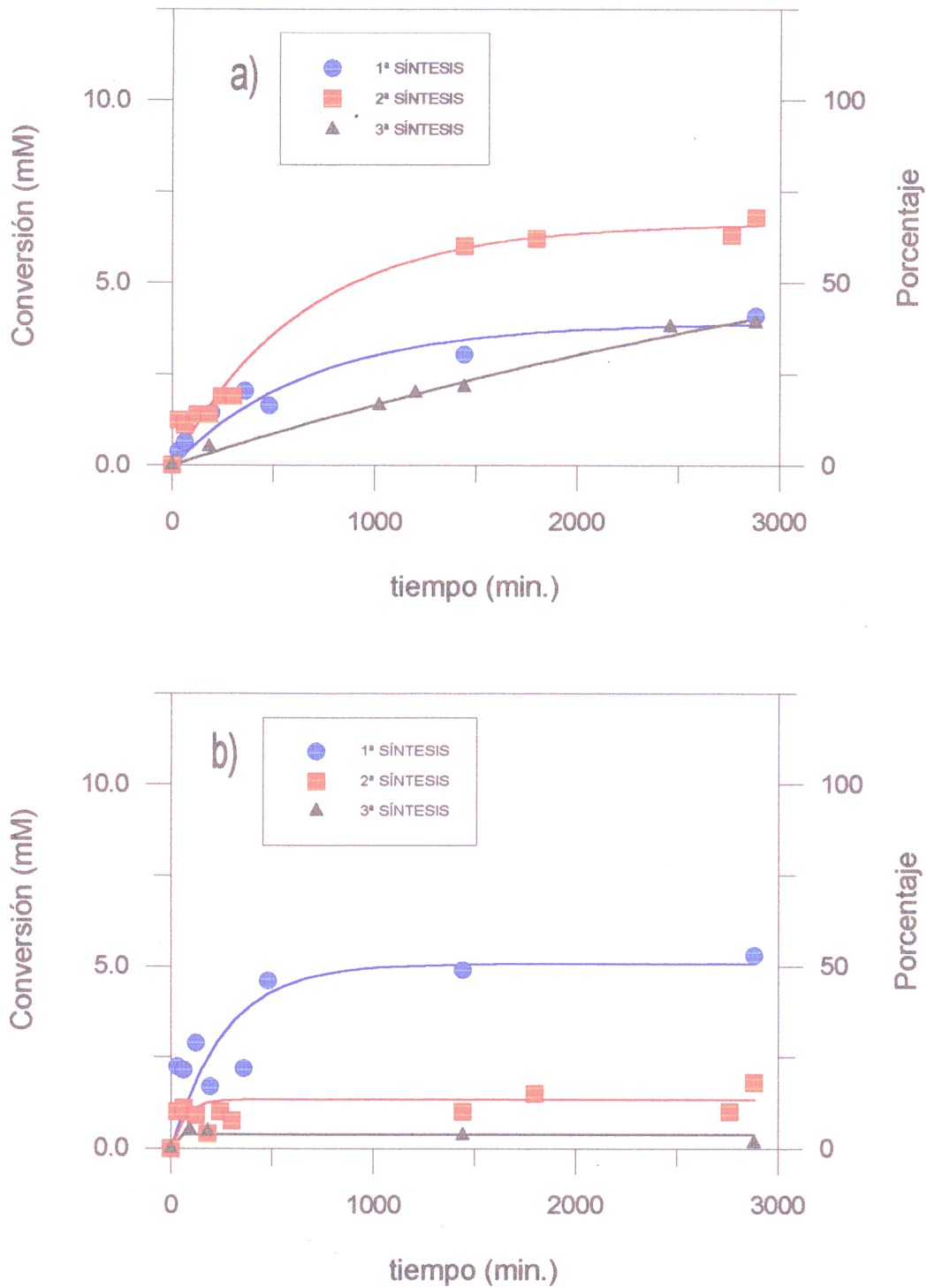


Figura 54.- Reutilización del derivado C1-CT (2.75 mg de derivado/ml equivalentes a 0.24 mg de enzima/ml), empleando como medio de reacción AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 4/1, (v/v), a 25 °C de temperatura. a) Péptido; b) ácido

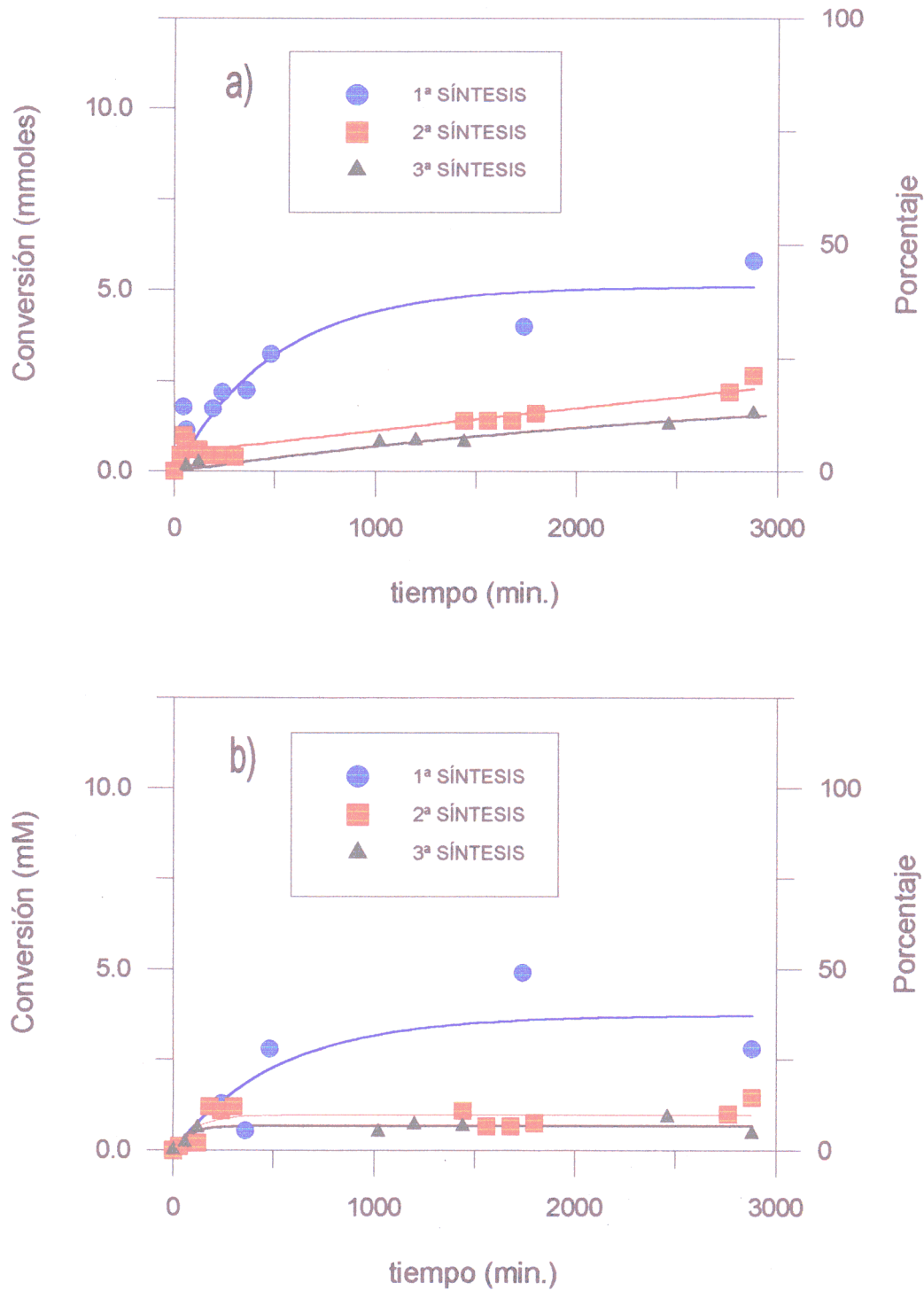


Figura 55.- Reutilización del derivado C2-CT (7.25 mg de derivado/ml equivalentes a 0.24 mg de enzima/ml), empleando como medio de reacción AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 4/1, (v/v), a 25 °C de temperatura. a) Péptido; b) ácido

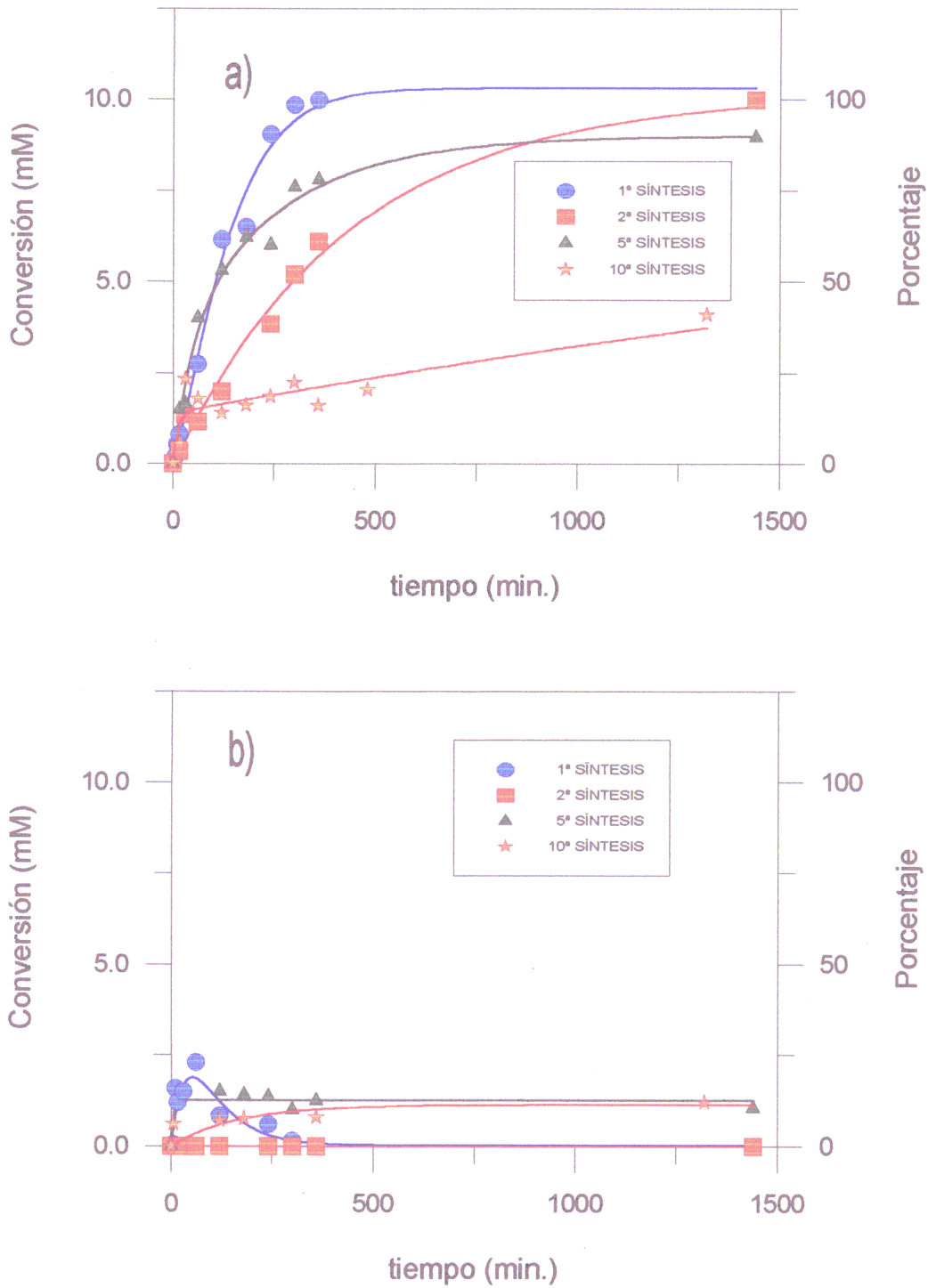


Figura 56.- Reutilización del derivado C4-CT (1.3 mg de derivado/ml equivalentes a 0.24 mg de enzima/ml), empleando como medio de reacción AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 99/1, (v/v), a 25 °C de temperatura. a) Péptido; b) ácido

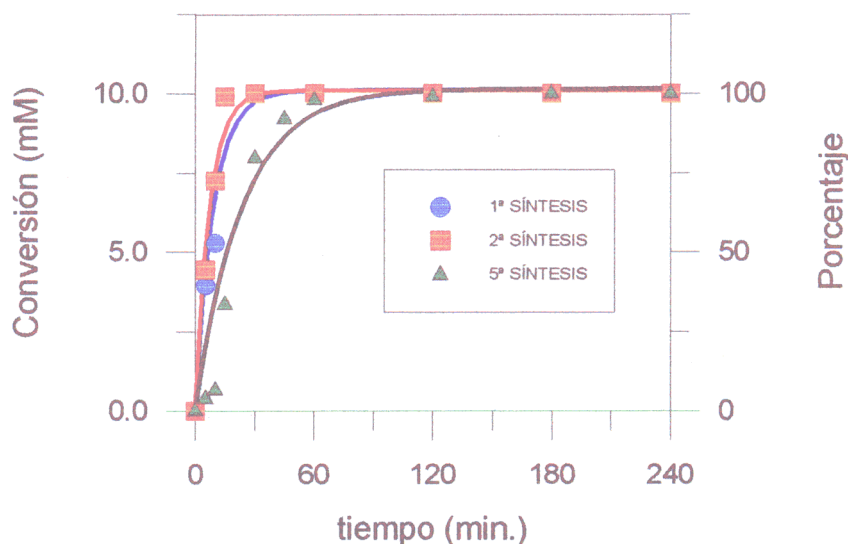


Figura 57.- Reutilización del derivado C4-CT (1.3 mg de derivado/ml equivalentes a 0.24 mg de enzima/ml), empleando como medio de reacción 1,1,1-tricloroetano/Tris pH=9.0, 0.1 M, 99/1, (v/v), a 25 °C de temperatura. a) Péptido; b) ácido

de agua en el microentorno humectado que le proporciona el soporte, lo cual facilita el proceso de hidrólisis del éster. Después de estar en contacto el derivado con la mezcla acetato de etilo/tampón (4/1) durante 48 h (2880 min.), esto es, tras el primer ciclo catalítico, se elimina el agua del microentorno fundamentalmente por el efecto del disolvente (AcOEt, $\log P = 0.73$). Es por ello por lo que la actividad transferásica se favorece frente a la esterásica en el segundo ciclo catalítico (Fig. 54).

Estos resultados están de acuerdo con los mostrados por Heras y cols (262), que han encontrado una relación entre el tiempo de liofilización del derivado inmovilizado de α -quimotripsina sobre agarosa y sus actividades transferásica y esterásica. Así, el catalizador con un mayor grado de liofilización, presenta mayor actividad en la síntesis de péptidos y menor en la hidrólisis de ésteres.

En la segunda reutilización (3^{er} ciclo catalítico) vuelve a disminuir el porcentaje de hidrólisis por el mismo efecto apuntado arriba, mientras que la actividad transferásica sigue siendo importante, si bien es inferior a la observada en la primera reutilización. De ello cabe deducir una paulatina desactivación del derivado inmovilizado, sin pérdida de proteína, ya que los experimentos de abrasión (Sección IV.1.3), arrojaron resultados negativos.

Tabla 30.- Síntesis del péptido Bz-L-Tyr-L-Leu-NH₂, con 0.24 mg de enzima/ml, (2.75 mg de derivado C1-CT/ml), en AcOEt/Tris/HCl pH=9 (4/1) a 25°C.

t (h.)	% Péptido	% Ácido	Pept./ac.	Reacción
48	40	50	0.8	1 ^a SÍNTESIS
48	67	18	3.7	1 ^a RECUPER.
48	40	4	10.0	2 ^a RECUPER.

El comportamiento del derivado C2-CT (Figura 55 y Tabla 31) en las reutilizaciones es más cercano a C1-CT (Figura 54 y Tabla 30) que a C4-CT (Figura 56 y Tabla 32). El derivado C2-CT en un medio de AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 4/1, (v/v) presenta un comportamiento diferente al del derivado C1-CT, (Fig. 54). El derivado C2-CT se desactiva después de cada reutilización, disminuyendo tanto la actividad transferásica como la esterásica a pesar de lo cual la relación péptido/ácido crece ligeramente. Ello debe atribuirse al menor grado de injerto del polímero C2, que lo hace más lipóide y por tanto, más sensible a la alteración de su estructura por un disolvente relativamente lipóide como es el acetato de etilo. No obstante, al igual que pasaba en el caso del derivado C1-CT, la disminución en la reacción de hidrólisis del donador de acilo con el número de reutilizaciones, es más acusada que la observada en el caso de la actividad transferásica (Tabla 30) como se aprecia por el aumento de la relación péptido/ácido.

Tabla 31. Síntesis del péptido Bz-L-Tyr-L-Leu-NH₂, con 0.24 mg de enzima/ml, (7.25 mg de derivado C2-CT/ml), en AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, (4/1) a 25°C.

t(h.)	% Péptido	% Ácido	Pep./Ac.	Reacción
24	50	35	1.42	1 ^a SÍNTESIS
48	22	11	2.00	1 ^a RECUPER.
48	16	7	2.29	2 ^a RECUPER.

A diferencia de los dos derivados anteriores, el derivado C4-CT, además de proporcionarnos un mayor rendimiento, no se desactiva apreciablemente en los primeros ciclos, siendo necesarios 5 de ellos para que se empiece a apreciar una desactivación, y 10 para que su actividad disminuya por debajo del 50%. No obstante, y a diferencia del comportamiento de los derivados C1-CT y C2-CT, con el derivado C4-CT (Fig. 56), a medida que se reutiliza la enzima desciende la actividad transferásica y aumenta aunque muy ligeramente la actividad hidrolítica. Este hecho, es atribuible al gran porcentaje de injerto del soporte empleado, y a la elevada carga enzimática.

Tabla 32.- Síntesis del péptido Bz-L-Tyr-L-Leu-NH₂, con 0.24 mg de enzima/ml, (1.3 mg de derivado C4-CT/ml), en AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M (99/1, v/v) a 25° C.

t (h.)	% Péptido	% Ácido	Pept./ac.	V. Inicial ^a	Reacción
6	99	1	99.0	0.070	1 ^a SÍNTESIS
24	99	1	99.0	0.023	2 ^a SÍNTESIS
24	90	10	9.0	0.066	5 ^a SÍNTESIS
24	44	12	3.7	0.011	10 ^a SÍNTESIS

^a Velocidad inicial de síntesis de péptido (mM/min.)

Cuando el disolvente es 1,1,1-tricloroetano ($\log P = 2.49$) (234), no se aprecia disminución en el rendimiento (Figura 57 y Tabla 33), ni la aparición de ácido, solamente un ligero descenso en la velocidad de síntesis, después de 5 ciclos productivos, demostrando claramente como estos disolventes inmiscibles con el agua, de elevado $\log P$, son menos perjudiciales para la enzima que el acetato de etilo (260).

El conseguir 10 ciclos de síntesis con buenos rendimientos en péptido es un excelente resultado teniendo en cuenta el efecto destructor sobre el derivado que ejerce el sistema de agitación en el fondo del reactor.

Comparando los valores de velocidades iniciales de las Tablas 32 y 33, nos llama

primeramente la atención la enorme diferencia que existe entre ambos disolventes, siendo la velocidad inicial de síntesis en 1,1,1-tricloroetano 10 veces superior a la obtenida en acetato de etilo; por otra parte, en el caso del disolvente clorado la velocidad de la 2ª síntesis es superior al de la 1ª síntesis, lo que parece indicar que la enzima se habitúa a reconocer a estos sustratos, modificando su forma y adaptándola a los requerimientos del BTEE y de la *L*-leucimamida, soportando este cambio las manipulaciones de los procesos de recuperación del catalizador. Este hecho se demuestra más claramente con los datos recogidos en el apartado siguiente.

Tabla 33.- Síntesis del péptido Bz-*L*-Tyr-*L*-Leu-NH₂, con 1.3 mg de derivado C4-CT/ml, equivalentes a 0.24 mg de enzima/ml, en 1,1,1-tricloroetano/Tris pH=9.0, 0.1 M, 99/1, (v/v) a 25° C.

t (min.)	% Péptido	% Ácido	Pept./ac.	V. inicial*	Reacción
15	99	1	99.0	1.092	1ª SÍNTESIS
30	99	1	99.0	1.383	2ª SÍNTESIS
120	99	1	99.0	0.350	5ª SÍNTESIS

* Velocidad inicial de síntesis de péptido (mM/min.)

IV.1.7.2.- Reacciones de síntesis consecutivas empleando derivados inmovilizados de α -quimotripsina sobre copolímeros de injerto.

Se han denominado "síntesis consecutivas" a aquellos ciclos de producción de dipéptidos que tienen lugar dentro del mismo reactor sin purificar el producto, y donde la separación entre un ciclo y otro, viene definida por el consumo total del donador de acilo, a diferencia de las reutilizaciones, en las cuales, después de cada ciclo, se extrae el producto y se aísla el catalizador, para posteriormente emplear dicho catalizador recuperado en el seno de otro reactor, con un medio de reacción fresco, sin que exista un acumulo de péptido, como

sucede en las reacciones de síntesis consecutivas (**Sección III.6.6.2**).

Guisán y cols. (263), han llevado a cabo procesos de "regeneración del catalizador", los cuales también implican la existencia de ciclos, pero que son diferentes de los definidos por nosotros, puesto que estos autores aunque también miden la actividad de la enzima, la aíslan del medio de reacción, la desnaturalizan con urea o guanidina y posteriormente, en medio acuoso, hacen que se vuelva a plegar para a continuación medir de nuevo su actividad, repitiendo este proceso varias veces con el fin de observar si la enzima pierde o no actividad. (263).

Hemos estudiado lo que sucede en este tipo de síntesis consecutivas, debido al hecho de que el objetivo de todo proceso que se intente llevar a una escala al menos semi-industrial pasa por obtener grandes cantidades de producto, con sencillos procesos de purificación y con bajas cantidades de catalizador.

Estos ensayos han sido posibles gracias a los resultados obtenidos anteriormente con los estudios con diferentes soportes, en las distintas condiciones de reacción. Así, hemos podido encontrar condiciones en las que la actividad amidásica no aparece (97/3, (v/v) AcOEt/(Tris pH=9.0, 0.1 M), ya que el dipéptido se extrae precipitando en la fase orgánica, permaneciendo lejos de la enzima y no hidrolizándose a lo largo del tiempo (**Fig. 44 y 45, Sección IV.1.5.4**), hecho que es fundamental para llevar a cabo estas reacciones. También es imprescindible obtener rendimientos elevados (próximos al 100%) como los que se obtienen con derivados de elevado porcentaje de injerto (**Fig. 46, Sección IV.1.5.4**). El hecho de la existencia en estas condiciones de síntesis termodinámica, además de aumentar el rendimiento, favorece la purificación de los productos al disminuir la cantidad de ácido presente en la reacción (**Fig. 51 b y c, Sección IV.1.5.7 y Fig. 53, Sección IV.1.6**).

Analizadas estas consideraciones llevamos a cabo síntesis consecutivas según se describe en la parte experimental (**Sección III.6.6.2**) empleando como medio de reacción AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 97/3, (v/v), obteniendo los resultados que se reflejan en las **Figuras 58 y 59**.

En la **Figura 58** se muestra como, lejos de perder actividad tras el primer ciclo productivo y los tres siguientes, se produce un aumento de la actividad enzimática, hasta llegar a un máximo en el 4^o ciclo, para posteriormente pasar a una etapa que dura 6 ciclos en

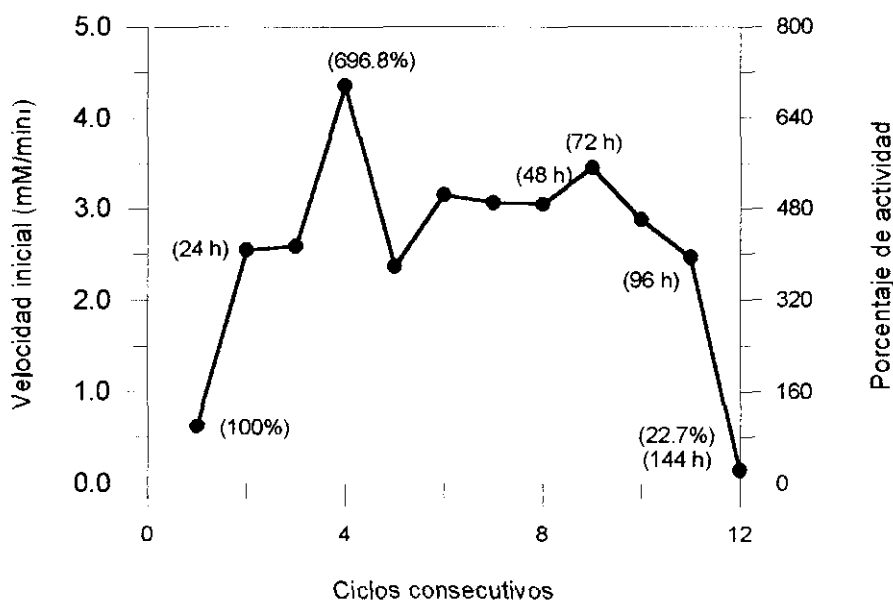


Figura 58.- Variación de la velocidad inicial de síntesis de péptidos ($Bz-L-Tyr-L-Ala-NH_2$), en función del número de ciclos de "síntesis consecutivas", empleando 1.3 mg del derivado C6-CT/ml, (0.113 mg de enzima/ml), en un medio AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 97/3, (v/v) y a 25 °C de temperatura.

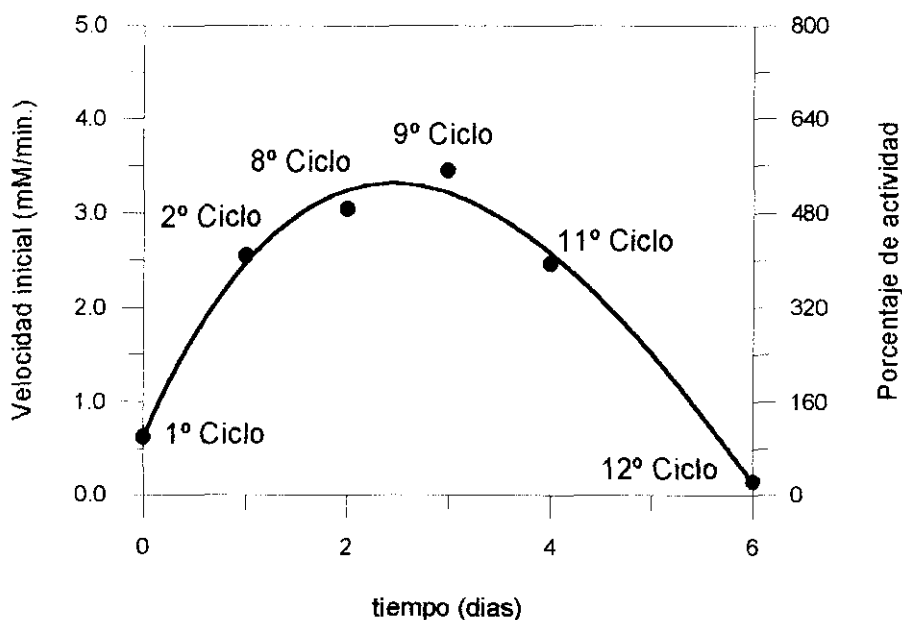


Figura 59.- Variación de la velocidad inicial en procesos de síntesis consecutivas de péptidos ($Bz-L-Tyr-L-Ala-NH_2$), en función del tiempo, empleando 1.3 mg del derivado C6-CT/ml, (0.113 mg de enzima/ml), en un medio AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 97/3, (v/v) y a 25 °C de temperatura.

los que la actividad enzimática se estabiliza en un valor muy por encima del inicial ($\approx 500\%$), para finalmente comenzar a descender hasta llegar, después de 12 ciclos sintéticos a una actividad inferior a la inicial.

Conociendo las curvas de desactivación del catalizador en este mismo medio (**Figuras 30 y 31**), en las cuales se observa como éste pierde actividad desde el principio y comparándolas con la **Figura 59** en la que se aprecia como el catalizador aumenta su actividad por encima del valor inicial hasta las 72 h., podemos, pues, concluir que el comportamiento del biocatalizador en presencia de los sustratos es distinto al que se describe cuando éste se incubaba, en las mismas condiciones experimentales, en ausencia de dichos sustratos (**Figura 30**). Ello se debe al *Bioimprinting* que realiza el sustrato sobre el derivado inmovilizado. Estos hechos concuerdan con los resultados descubiertos por Guisán y cols. los cuales han observado cambios de actividad en la α -quimotripsina al inmovilizarla sobre geles de agarosa en presencia de ciertos sustratos, (264).

Comparando las **Figuras 58 y 59** entre sí podemos deducir que tanto el número de ciclos como el tiempo que permanece el catalizador en el reactor son factores importantes en este tipo de reacciones, aumentando la actividad hasta llegar a un máximo en el 4º ciclo, para descender paulatinamente a continuación (**Fig 58**), mientras que con respecto al tiempo, el máximo se alcanza a los 3 días, para a partir de entonces disminuir la actividad hasta un valor inferior al inicial transcurridos 6 días.

De forma análoga, se llevaron a cabo síntesis consecutivas para obtener los dipéptidos Bz-L-Tyr-Ala-NH₂, Ac-L-Phe-L-Leu-NH₂ y Ac-L-Phe-L-Ala-NH₂, obteniendo resultados similares.

IV.1.7.3.- Purificación del péptido sintetizado en las reacciones consecutivas

Una vez realizados los procesos de síntesis consecutivas, con un rendimiento muy próximo al 95% de péptido en cada ciclo, mediante una sencilla metodología, (**Sección III.6.6.3**), se logró la purificación de los dipéptidos consiguiendo Bz-L-Tyr-L-Leu-NH₂, Bz-L-Tyr-L-Leu-NH₂, Ac-L-Phe-L-Leu-NH₂, Ac-L-Phe-L-Ala-NH₂ (este dipéptido presentó algunos problemas de purificación debido a su mayor solubilidad en medio acuoso). Estos productos

han sido caracterizados mediante análisis elemental y espectroscopia de resonancia magnética nuclear de (¹H) protón . A continuación se muestran dos ejemplos en los cuales el grado de pureza es próximo al 98 %:

Microanálisis del dipéptido Bz-L-Tyr-L-Ala-NH₂:

	% Carbono	% Hidrógeno	% Nitrógeno
Valores teóricos	64.21	5.95	11.82
Valores prácticos	63.43	5.98	11.61

Microanálisis del dipéptido Bz-L-Tyr-L-Leu-NH₂:

	% Carbono	% Hidrógeno	% Nitrógeno
Valores teóricos	66.48	6.85	10.57
Valores prácticos	65.10	6.69	10.48

Los resultados del espectro de Resonancia Magnética nuclear de protón (RMN ¹H) se muestran a continuación:

Dipéptido Bz-L-Tyr-L-Ala-NH₂

(RMN ¹H) ((CD₃)₂SO, 250 MHz) δ(ppm)= 1.2 (d, 3H, CH₃ (2´)); 2.85-3.00 (dd, 2H (H_a, H_b)); 4.20 (q, 1H, CH (2)); 4.57 (m, 1H, CH (2´)); 6.62 (d, 2H, NH₂ (4´)); 7.03-7.28 (2S, NH (10 y 1´)); 7.13 (d, 2H, CH (5), CH (9)); 7.49 (m, 3H; CH (14), CH (15), CH (16)); 7.76 (d, 2H, CH (6), CH (8)); 8.10-8.52 (2d, 2H, CH (13), CH (17)); 9.15 (S, 1H, OH fenólico).

Dipéptido Bz-L-Tyr-L-Leu-NH₂

(RMN ¹H) ((CD₃)₂SO, 250 MHz) δ(ppm)= 0.85 (dd, 2CH₃, 6H, (3´´´ y 4´´)); 1.49 (m, 1H, CH (3´)); 1.60 (m, 2H, CH₂ (2´)); 2.85-2.97 (dd, 2H (H_a, H_b)); 4.23 (m, 1H, CH (2)); 4.59 (m, 1H, CH (2´)); 6.62 (d, 2H, NH₂ (4´)); 7.01-7.29 (2S, NH (10 y 1´)); 7.13 (d, 2H, CH (5), CH (9)); 7.45 (m, 3H; CH (14), CH (15), CH (16)); 7.76 (d, 2H, CH (6), CH (8)); 7.98-8.50 (2d, 2H, CH (13), CH (17)); 9.15 (S, 1H, OH fenólico).

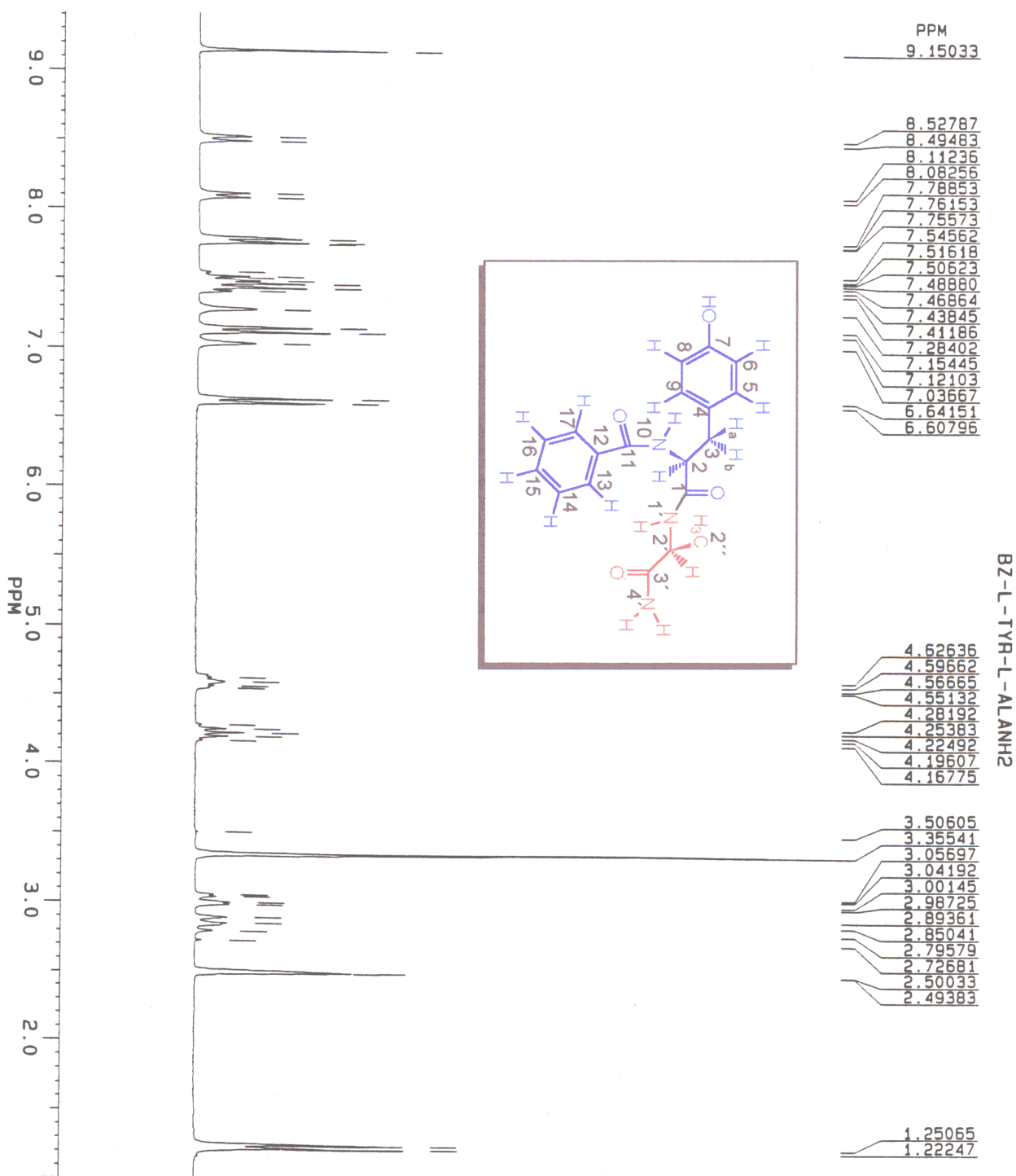


Figura 60.- Espectro de resonancia de protón ¹H del dipéptido Bz-L-Tyr-L-Ala-NH₂.

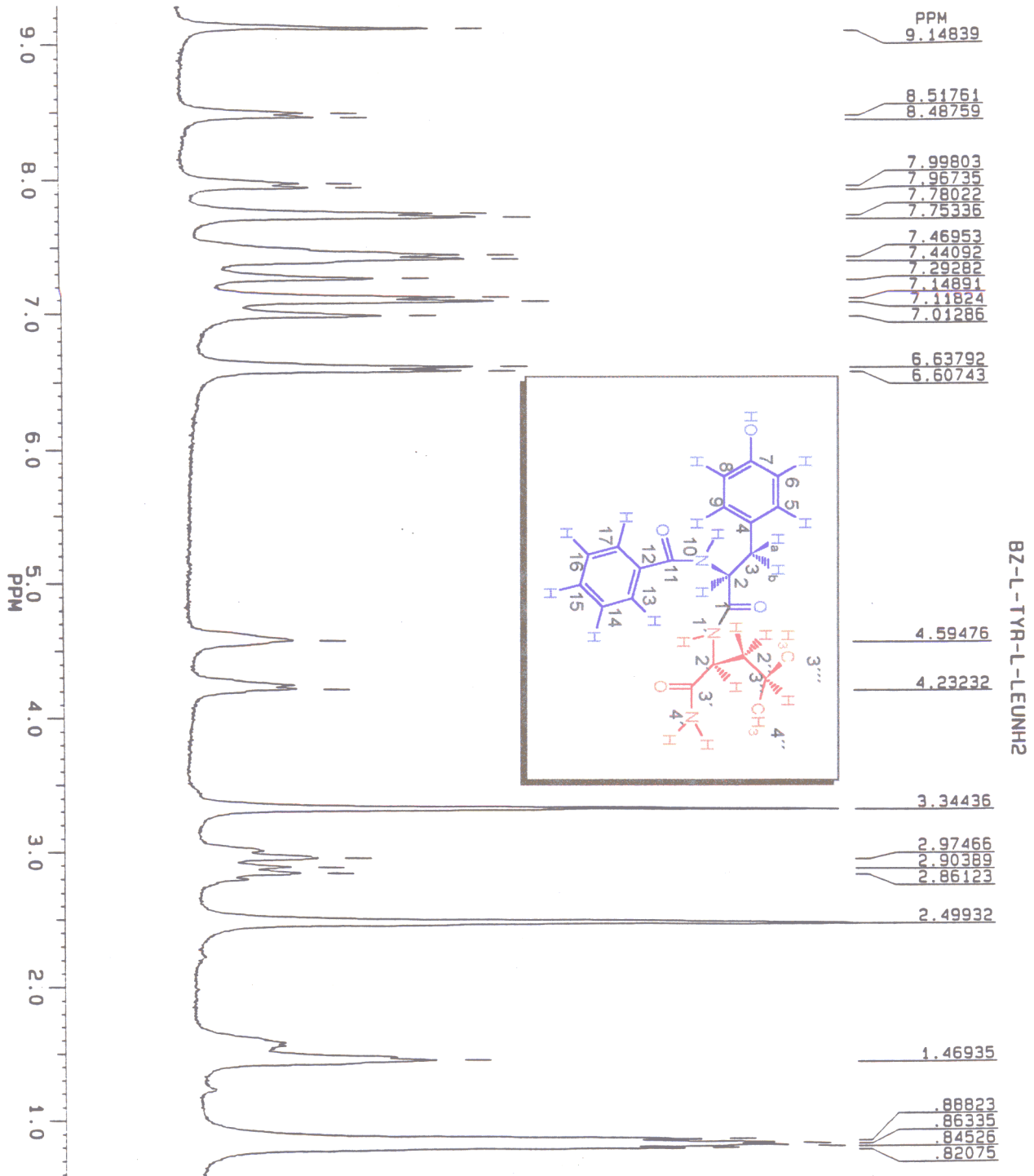


Figura 61.- Espectro de resonancia de protón ¹H del dipéptido Bz-L-Tyr-L-Leu-NH₂.

IV.2.- ENSAYOS CON DERIVADOS INMOVILIZADOS DE α -QUIMOTRIPSINA SOBRE GELES DE AGAROSA.

Para comparar los derivados de α -quimotripsina inmovilizada sobre copolímeros de injerto (PE/HEMA) con otros conocidos, hemos llevado a cabo ensayos similares con unos derivados de α -quimotripsina inmovilizada sobre geles de agarosa perfectamente caracterizados por el grupo del Dr. Guisán, a los cuales hicimos referencia en el **Apartado III.4.**

Así pues, en este apartado nos vamos a centrar en comentar los resultados obtenidos en ciertos experimentos muy concretos que nos valdrán como termino de comparación.

IV.2.1.- CARACTERIZACIÓN DE LOS DERIVADOS INMOVILIZADOS SOBRE GELES DE AGAROSA

En la **Tabla 34**, se muestran las características de los tres derivados de α -quimotripsina inmovilizada sobre geles de agarosa.

El derivado obtenido por unión unipuntual y con mayor carga enzimática (AGU1-CT) presenta una baja actividad retenida si bien esta se midió a pH=6.0. En los otros dos derivados, la determinación de la actividad hidrolítica se realizó a pH=7.8, (óptimo para la enzima) (159, 229). Puede apreciarse que estos derivados AGU2-CT y AGM1-CT de igual carga enzimática presentan valores muy similares de actividad específica de hidrólisis a cortos tiempos de reacción, independientemente de si se trata de un derivado uni o multipuntual.

Si comparamos la actividad específica de estos derivados en la hidrólisis del GpNA (229), (**Tabla 34**) (3.76 y 2.70 μ M/min. mg de enzima) con los derivados inmovilizados sobre copolímeros, (**Tabla 16**) (0.36-4.26 μ M/min. mg de enzima) vemos que ambos grupos de derivados inmovilizados presentan valores similares, a pesar de tener los derivados inmovilizados sobre geles de agarosa una carga enzimática sensiblemente inferior, (6 mg de enzima/ml de gel) frente a (33-189 mg de enzima/g de copolímero) (**Tabla 16**). Esto indica que toda la enzima inmovilizada se comporta de la misma forma independientemente de la carga del derivado, no observándose problemas difusionales en aquellos derivados más cargados como cabría esperar.

Tabla 34 Caracterización de los derivados de α -quimotripsina inmovilizada sobre geles de agarosa.

Derivado	Soporte	Derivado			
	Activación ^a	Carga ^b	% Act. ret. ^c	Activ. esp. ^d	Activ. esp. ^e
AGU1-CT	0.5	19.0	---	---	0.07 \pm 0.006 ^g
AGU2-CT	0.5	6.0	67 \pm 2	3.76 \pm 0.08	3.3 \pm 0.2 ^h
AGM1-CT	75	6.0	49.5 \pm 0.7	2.70 \pm 0.06	2.8 \pm 0.2 ^h

^a Activación del soporte (μmol de aldehído/ml de gel).

^b Determinada por el método de Lowry (mg de enz./ml de gel), (densidad del gel = 0.7 g/ml) (237).

^c Porcentaje de actividad retenida expresada como: (mg de enzima activa/mg de enzima unida) \times 100.

^d Actividad específica calculada por el método del GpNA, ($\mu\text{M}/\text{min. mg}$ de enz.) (229).

^e Actividad específica calculada en pHstat en la hidrólisis de BTEE (mM/min. mg de enz.).

^g Actividad enzimática en la hidrólisis de BTEE, empleando tampón fosfato pH=6.0 0.01 M.

^h Actividad enzimática en la hidrólisis de BTEE, empleando tampón fosfato pH=7.8 0.01 M.

IV.2.2.- REACCIONES DE HIDRÓLISIS DE BTEE

IV.2.2.1- Estudio cinético del proceso de hidrólisis

Primeramente se realizó un estudio cinético del proceso de hidrólisis, con los derivados (AGU2-CT y AGM1-CT) y el éster que posteriormente emplearíamos como donador de acilo en las reacciones de síntesis de péptidos (BTEE), en diferentes concentraciones, variando desde 5 hasta 90 mM, y empleando un medio con una importante fase acuosa para favorecer el proceso de hidrólisis, AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M 2/1, (v/v). Para ello, se siguieron las condiciones experimentales descritas en el apartado III.7.1.1.

Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 62 y 63:

Como se puede observar el proceso sigue una cinética michaeliana, para ambos catalizadores, presentado para el derivado AGU2-CT los siguientes valores de parámetros V_{max} ,

K_m y k_{cat} :

$$V_{max} = (0.15 \pm 0.02) \text{ mM/min.}$$

$$K_m = (62 \pm 19) \text{ mM.}$$

$$k_{cat} = (45 \pm 6) \text{ min.}^{-1}$$

$$R^2 = 0.973$$

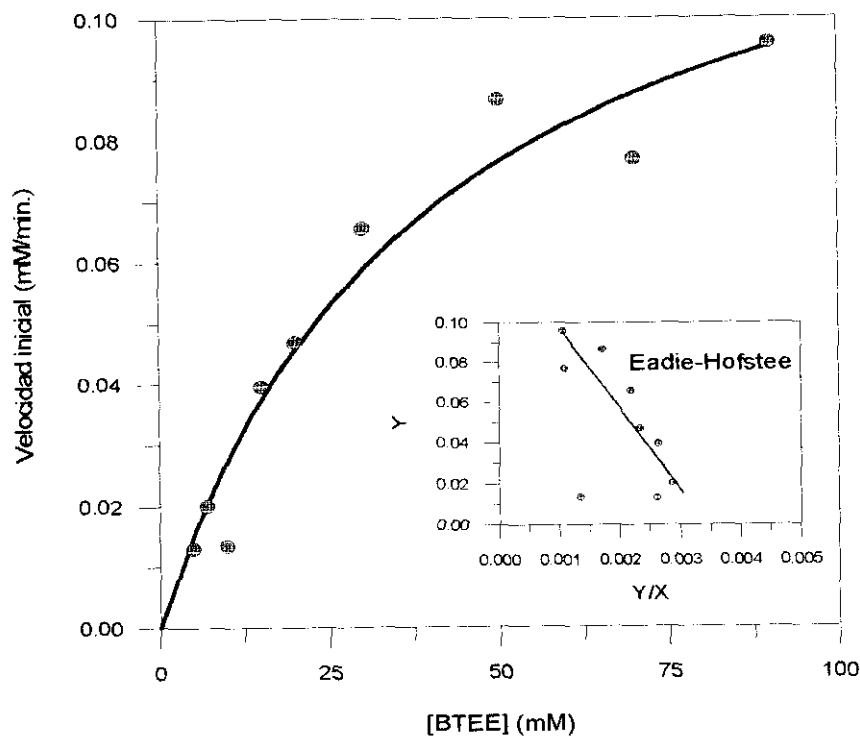


Figura 62.- Representación de Michaelis-Menten, para el proceso de hidrólisis de BTEE, empleando el derivado AGU2-CT (8.85 mg de derivado/ml, 0.076 mg de enzima/ml).

Mientras que en el caso del derivado AGM1-CT estos fueron:

$$V_{max} = (0.10 \pm 0.01) \text{ mM/min.}$$

$$K_m = (27 \pm 6) \text{ mM.}$$

$$k_{cat} = (33 \pm 3) \text{ min.}^{-1}$$

$$R^2 = 0.974$$

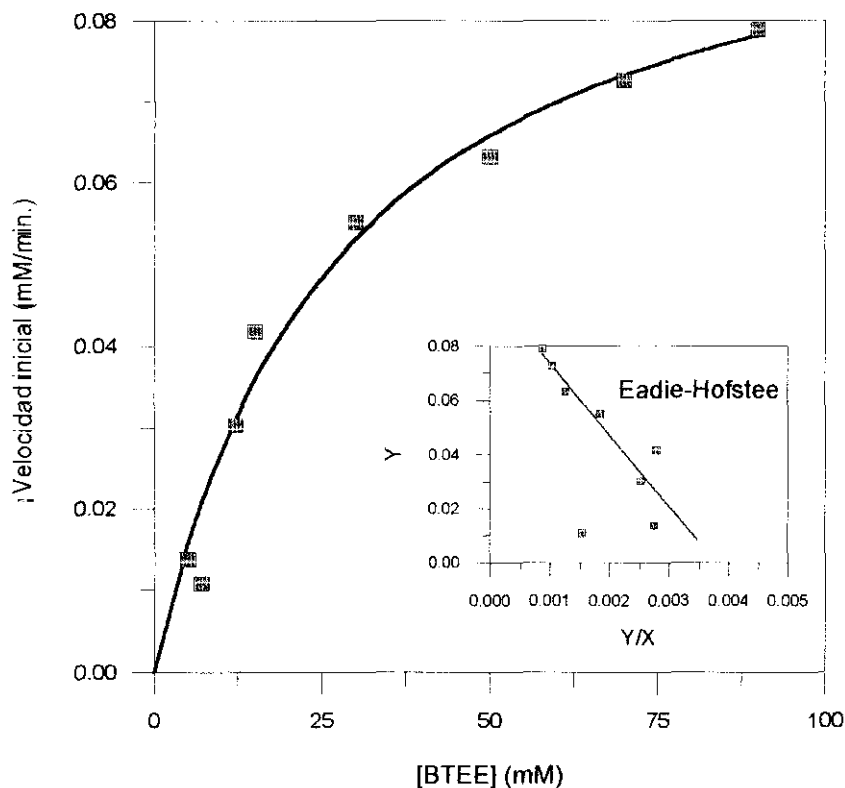


Figura 63.- Representación de Michaelis-Menten, para el proceso de hidrólisis de BTEE, empleando el derivado AGMI-CT (8.85 mg de derivado/ml, 0.076 mg de enzima/ml).

Teniendo en cuenta el error experimental, no parece que exista una diferencia notable entre ambos derivados, siendo el derivado unipuntual ligeramente más eficaz en la catálisis debido a su mayor valor de constante catalítica o número de recambio, lo que indica que el distinto grado de rigidez de los dos derivados modifica el reconocimiento del sustrato y la consiguiente acilación de la serina del centro activo. Comparando los valores de (V_{\max} , K_m y k_{cat}) con los obtenidos con los derivados sobre copolímeros de injerto, observamos como para todos los casos, los valores obtenidos con derivados inmovilizados sobre geles de agarosa son menores. Por lo tanto, existen problemas para que se lleve a cabo el acto catalítico, con lo cual las constantes son realmente aparentes.

Un valor elevado de K_m , como en el caso de los derivados obtenidos sobre copolímeros de injerto ($K_m = 95 \pm 25$), indica que se necesita una mayor cantidad de sustrato para alcanzar la saturación con BTEE, o lo que es lo mismo, que estos derivados obtenidos sobre geles de agarosa presentan mayor afinidad por el sustrato. Por otro lado, el hecho de que la constante

catalítica sea también menor para los derivados inmovilizados sobre geles de agarosa, significa que estos son menos eficaces en el proceso de hidrólisis de BTEE, o lo que es lo mismo el número de moléculas de sustrato convertidas por unidad de tiempo es menor.

Todas estas consideraciones demuestran que la naturaleza del soporte (geles de agarosa o copolímeros de (PE/HEMA)) afecta enormemente a la actividad de la enzima.

IV.2.2.2.- Influencia del porcentaje de medio acuoso

Como paso previo al estudio del proceso de síntesis cinéticamente controlada se llevaron a cabo algunos ensayos de hidrólisis del éster que se utilizará como donador de acilo en los posteriores procesos de síntesis; aumentando paulatinamente la proporción de fase acuosa en el medio de reacción, variando desde 99/1 hasta 10/90 (v/v) AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, observando que los dos catalizadores presentan un comportamiento similar, como se indica en la **Figura 64**. A medida que aumenta la cantidad de agua en el medio se produce un pequeño incremento en la actividad hidrolítica, cuantificada como velocidad inicial de hidrólisis, hasta alcanzar un punto en el que la actividad se dispara, consiguiendo con pequeños incrementos en la cantidad de agua un gran aumento en la actividad hidrolítica.

Estos datos coinciden con los obtenidos por Peter Halling al analizar la influencia de la actividad de agua en la velocidad inicial de síntesis del éster Ac-*L*-Trp-OEt, empleando 3-pentanona como disolvente y como catalizadores derivados de α -quimotripsina inmovilizada sobre geles de agarosa, obteniendo a partir de una actividad de agua cercana a 0.75 un incremento brusco de actividad. Contrario a lo que cabría pensar en este tipo de reacciones en las que un exceso de agua dificultaría la reacción de síntesis del éster Ac-*L*-Trp-OEt, ya que es uno de los productos. Estos autores opinan que este tipo de derivados requieren gran cantidad de agua para conferir a la enzima la flexibilidad necesaria y llevar a cabo la reacción en condiciones óptimas (265).

Por otro lado, Arroyo y cols, han obtenido resultados similares a los anteriormente expuestos para los derivados de agarosa, empleando derivados inmovilizados de lipasa B de *Candida antártica* sobre sílice en la reacción de esterificación de ibuprofeno con 1-propanol, desarrollando un método semiempírico para conocer el valor de a_w al que se debe preequilibrar

un sistema, coincidiendo este con el punto de corte entre la 2^a pendiente de la isoterma de adsorción y el eje en el que se representa la actividad de agua, llegando a alcanzar un valor de 0.9 en este tipo de reacciones. Valores superiores a este pueden causar un descenso de la actividad y favorecer la hidrólisis del éster formado, ya que durante la reacción también se origina agua (182).

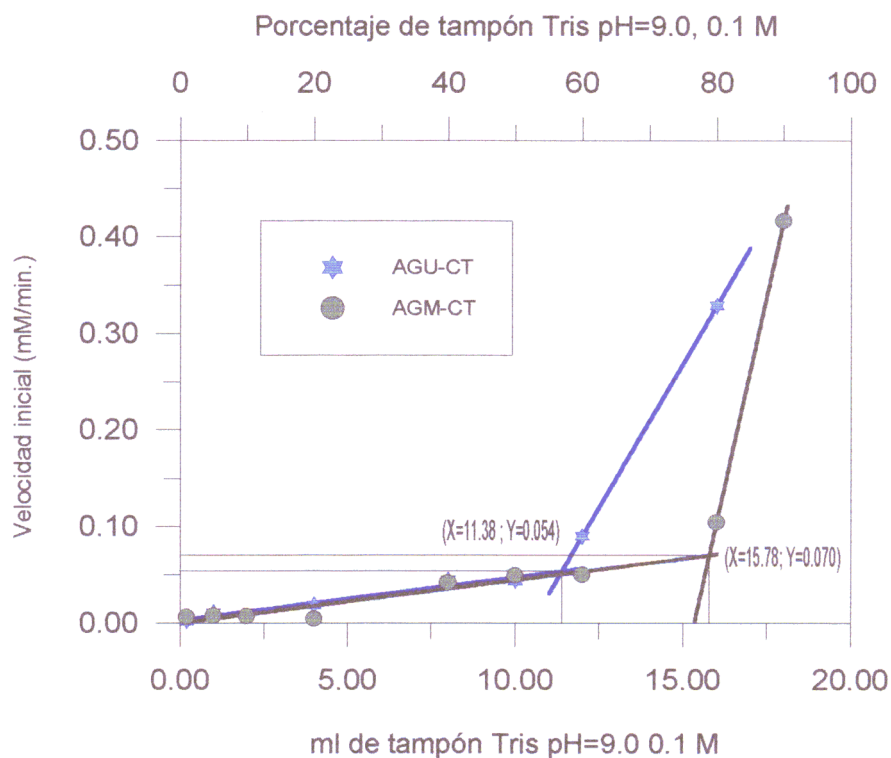


Figura 64.- Influencia del porcentaje de medio acuoso en la reacción de hidrólisis de BTEE, 10 mM, llevada a cabo por los derivados AGU2-CT y AGM1-CT (8.85 mg de derivado/ml, 0.076 mg de enzima/ml).

Los primeros puntos se pueden ajustar a una recta que resultó ser la misma para ambos derivados, cuyos parámetros serían:

$$\text{Pendiente} = (4.4 \pm 0.5) \mu\text{M}/(\text{min. ml de tampón})$$

Ordenada en el origen es no significativa en ambos casos según el test "t de Student" al 99% de certeza.

$R^2=0.96$ en el caso de derivado AGU2-CT y 0.90 para el derivado AGM1-CT.

Estos datos demuestran que a bajas concentraciones de medio acuoso, ambos derivados

presentan el mismo comportamiento, ya que se estaría hidratando la agarosa y ambos derivados poseen la misma carga, cosa que no sucede cuando el porcentaje de agua en el reactor supera el 60% (**Figura 64**). A partir de dicho punto ambos derivados actúan de forma diferente: así, mientras el derivado unipuntual AGU2-CT muestra un incremento brusco de actividad hidrolítica para un porcentaje de medio acuoso inferior al 60% (11.38 ml), con el derivado multipuntual (AGM1-CT) dicho incremento se manifiesta cuando el porcentaje de medio acuoso es cercano al 80% (15.78 ml). Obviamente, este hecho indica claramente como el sistema más rígido (multipuntual) precisa de mayor cantidad de agua para disponerse en la conformación óptima para llevar a cabo la hidrólisis, mientras que para bajos contenidos en agua ambos sistemas se comportan de manera similar (265).

Los derivados obtenidos sobre copolímeros de injerto (derivado C5-CT) se comportaban como el derivado multipuntual, teniendo el punto de corte entre ambas rectas próximo al 80% de tampón (16.21 ml). Ello indica que el aumento de la rigidez de la molécula de enzima producido por la unión multipuntual, aumenta la hidrofobicidad aparente del derivado, ya que se parece más al derivado inmovilizado sobre el copolímero (PE/HEMA) hidrofobo (**Figura 33**).

IV.2.3.- REACCIONES DE SÍNTESIS DE PÉPTIDOS CINÉTICAMENTE CONTROLADAS

IV.2.3.1- Influencia de la cantidad de enzima.

Para determinar la zona de trabajo en la cual la conversión a péptido es función lineal de la cantidad de enzima presente en el reactor, se realizaron diversos experimentos con cantidades crecientes de catalizador, (AGU1-CT), (desde 1.6 hasta 17.7 mg de derivado/ml equivalentes a 0.043 y 0.48 mg de enzima/ml), empleando como medio AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M 2/1 (v/v), mostrándose los resultados obtenidos en la **Fig. 65 y Tabla 35**.

Puede apreciarse que para una concentración elevada (0,48 mg de enzima/ml en reactor), se obtiene una rápida conversión a péptido, alcanzando un 50% de péptido en 3 horas, si bien para tiempos superiores puede apreciarse la actividad amidásica del derivado,

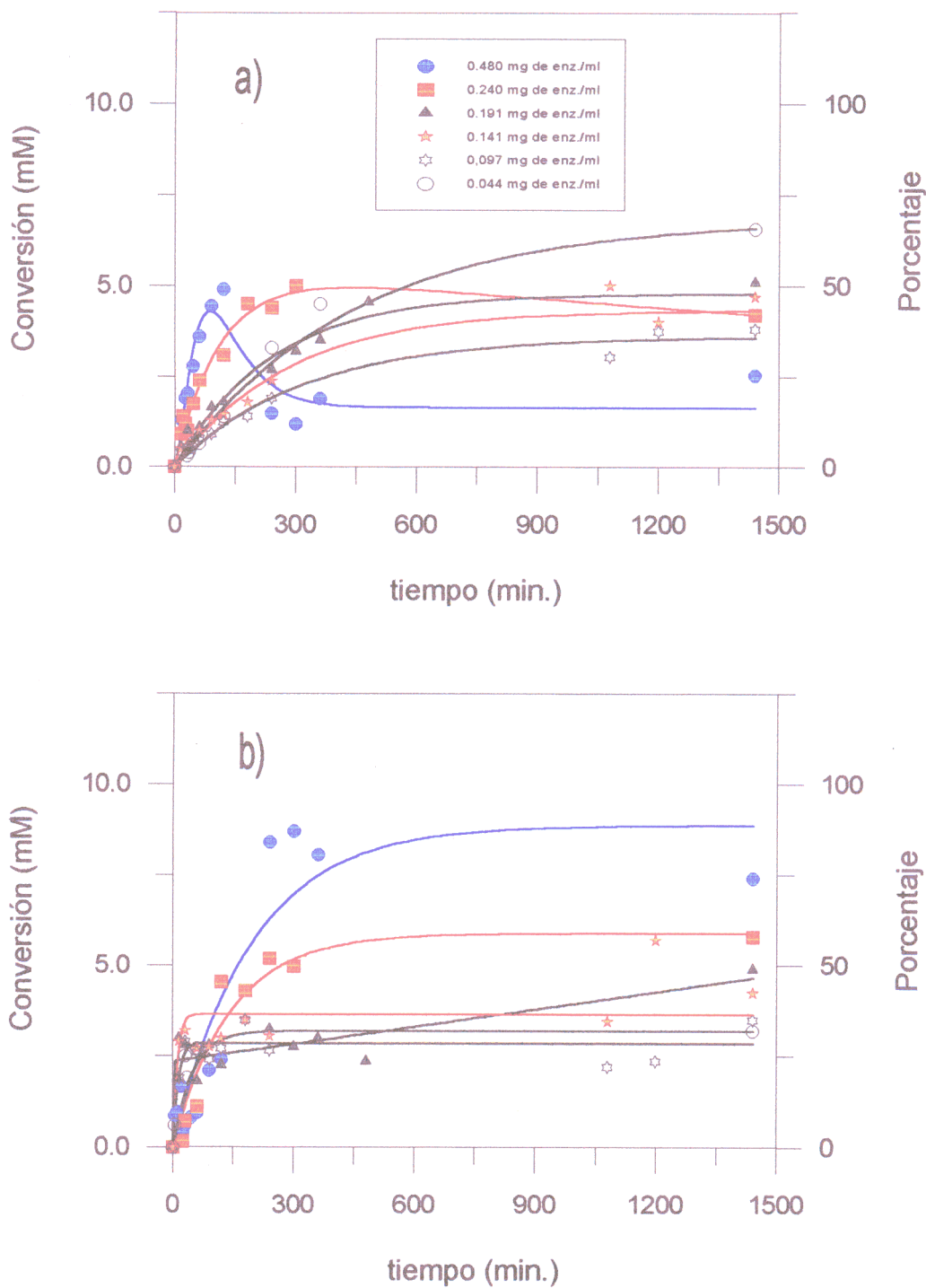


Figura 65.- Influencia de la cantidad de enzima en la síntesis del dipéptido modelo, empleando el derivado AGU1-CT como catalizador y AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M 2/1, (v/v) como medio de reacción a T=25°C, con una relación BTEE/H-L-Leu-NH₂ de 1/4 (M/M). a) Péptido; b) ácido.

lo que conduce a una gran proporción de ácido a largos tiempos de reacción. El mismo comportamiento se obtuvo cuando se utilizó esta misma cantidad de enzima con los derivados C1-CT y C2-CT (Fig. 34 y 35)

Estos valores pueden considerarse mejores que los previamente obtenidos en el grupo por Salvador *y cols* (209), empleando derivados inmovilizados sobre geles de agarosa a una concentración de 8 mg de enzima inmovilizada/ml (17 veces más enzima que la empleada por nosotros) en una mezcla DMF/H₂O, estos autores alcanzan una máxima conversión de un 47% en péptido en 60 minutos.

Tabla 35.- Influencia de la cantidad de derivado añadido en la síntesis del dipéptido modelo, (AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M) (2/1, v/v) a T=25°C, y con una relación (BTEE)/(H-L-Leu-NH₂) de 1/4).

Entr.	mg/ml de Ag- α -CT	mg de α -CT/ml	t (h.)	% Péptido	% Ácido	Pép./Ác.
1	17.70	0.480	2 ^a	49	30	1.63
2	8.85	0.240	5 ^a	48	52	0.92
3	7.05	0,191	18	48	52	0.92
4	5.25	0.141	18	45	35	1.29
5	3.40	0.097	24	30	32	0.94
6	1.60	0.044	24	70	30	2.30

^a A tiempos mayores se aprecia actividad amidásica

De ello cabe deducir que la mezcla bifásica acetato de etilo/tampón es mejor que la monofásica DMF/H₂O, para llevar a cabo la síntesis de péptidos. Este resultado con los datos expuestos por Guisán *y cols*. (209, 247). No obstante, conviene recordar que las formaciones de péptido y de ácido en estas condiciones son procesos competitivos, pues se forman ambos productos ya desde el comienzo de la reacción, según se muestra la **Figura 9** (Sección I.4.2).

Con 0.24 mg de enzima inmovilizada/ml, se observa una ligera acción amidásica, no apreciándose ya para cantidades inferiores de enzima (Fig. 65). De los resultados indicados en la Fig. 65 y Tabla 35 podemos observar como la menor cantidad de derivado empleado (entrada 6) conduce a la mayor relación péptido/ácido, no manifestándose la acción amidásica en ningún momento.

La máxima relación péptido/ácido y el tiempo que se tarda en alcanzarla son los parámetros que mejor definen un proceso de síntesis cinéticamente controlado. De estos valores, recogidos en la Tabla 35, podemos deducir que la mayor selectividad hacia la formación de péptido se alcanza con la menor cantidad de biocatalizador (0.043 mg de enzima/ml), si bien la reacción transcurre muy lentamente, pues como se comentó en la Introducción (Sección I.4.2) la concentración de enzima afecta fundamentalmente al tiempo que se tarda en alcanzar el máximo porcentaje en péptido.

La relación péptido/ácido obtenida es, en general, inferior a la conseguida con los derivados inmovilizados sobre copolímeros hidrofóbicos (Tablas 19 y 20). Ello se explica en función de la naturaleza hidrofílica del soporte, agarosa, que en estas condiciones favorece la hidrólisis del donador de acilo a ácido. Así, el porcentaje de ácido en el caso de los derivados inmovilizados sobre agarosa es más elevado que para los derivados inmovilizados sobre copolímeros.

No obstante, no se observan grandes diferencias a bajas concentraciones de enzima, tal y como describen Clapés y cols. para el caso de α -quimotripsina adsorbida sobre celite (251). Esto nos induce a pensar que la agarosa actuando como soporte no ejerce ninguna acción sobre la actividad enzimática cuando el parámetro en estudio es la concentración de enzima en el reactor.

IV.2.3.2.- Influencia de la estructura del nucleófilo y del donador de acilo en procesos de síntesis peptídica.

Como se indica en la introducción teórica de esta Memoria, la α -quimotripsina nativa es una endoproteasa que reconoce en el subsitio ρ_2 (según la nomenclatura de Hansch, (111)) ("ar", según la nomenclatura de Niemann y Cuningham (104)) a un aminoácido aromático (33,

96), mientras que carece prácticamente de especificidad en el subsitio p_1 ó "n" que reconoce al nucleófilo (266). Para comprobar si el derivado inmovilizado sobre agarosa mantiene la misma especificidad que la enzima nativa, se procedió a sintetizar cuatro dipéptidos diferentes empleando dos donadores de acilo: Bz-*L*-Tyr-OEt y Ac-*L*-Phe-OEt. y dos nucleófilos: H-*L*-Leu-NH₂ y H-*L*-Ala-NH₂. Se utilizó asimismo una concentración de enzima de 0.24 mg de enzima/ml (8.85 mg de derivado AGU1-CT/ml), con tres disolventes en los que el comportamiento del derivado es muy diferente; 1,1,1-tricloroetano, metilisobutilcetona (MIBK) y acetato de etilo (AcOEt), en proporciones 99/1 (v/v) disolvente orgánico/Tris pH=9.0, 0.1 M.

Los resultados aparecen recogidos en las Figuras 66-71 y en la Tabla 36.

Observando los resultados obtenidos en 1,1,1-tricloroetano (Fig. 66 y 67) podemos apreciar como se logra mayor conversión cuando se emplea como nucleófilo la *L*-leucinamida frente a la *L*-alaninamida. De ello cabe deducir, en principio, que cuando se emplea un disolvente de logP >2 e inerte frente al derivado inmovilizado, tal y como el 1,1,1-tricloroetano, cuanto más lipóide es el nucleófilo, mayor conversión a péptido se obtiene. Por el contrario, para el caso de la MIBK (Fig. 68 y 69) no influye tanto la naturaleza de nucleófilo, pues las diferencias son menos acusadas. Resultados análogos se han descrito en la bibliografía utilizando medios orgánicos con bajo contenido en agua, v. g; empleando α -quimotripsina libre liofilizada en acetonitrilo con un 5% de agua (132), en acetonitrilo (1% H₂O) con α -quimotripsina adsorbida sobre quitina (132b). Por el contrario, estos resultados son opuestos a los obtenidos en medios que contienen una elevada cantidad de H₂O v. g.: 20% DMF con α -quimotripsina inmovilizada sobre geles de agarosa, donde ambos nucleófilos se comportan de forma similar (267) y con α -quimotripsina libre (138). Estos hechos se deben, según describen Kise y cols. (132), a la alteración de K_m por efecto de la interacción enzima-medio, pero no a una variación de k_{cat} , lo cual implica una alteración de la conformación del centro activo o del microentorno de la enzima y no de la maquinaria catalítica. Esto nos estaría hablando de una alteración de la conformación de la α -quimotripsina por transformación de los grupos hidrófilos (Enz-NH₂) en hidrófobos (Enz-N=C(Me)(ibu) por alquilación con la MIBK, tal y como sugiere Kise.

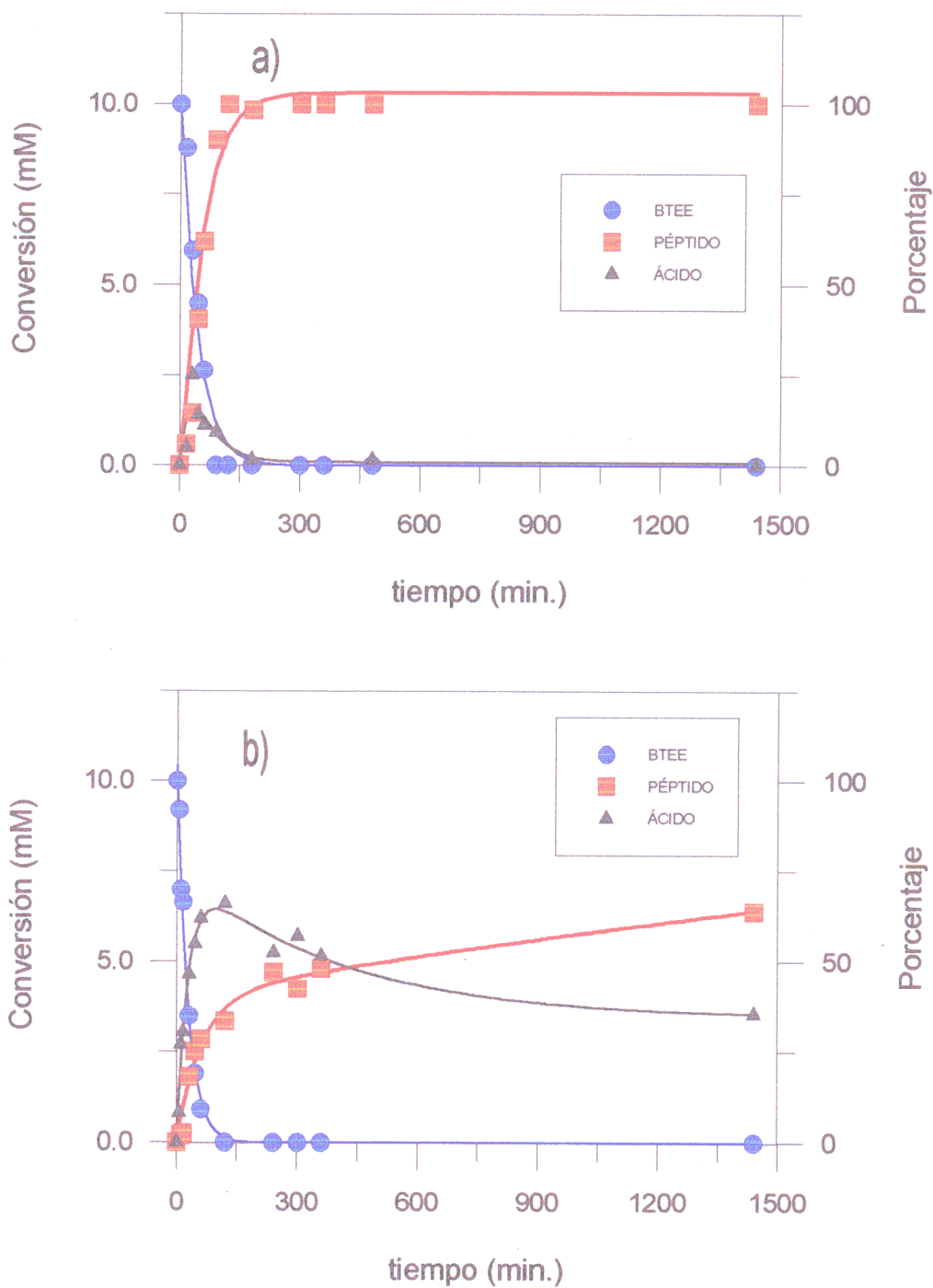


Figura 66,- Influencia del nucleófilo, empleando 1,1,1-tricloroetano/Tris pH=9.0, 0.1 M 99/1, (v/v) como medio y 0.24 mg de enzima/ml (8.85 mg de derivado AGU1-CT/ml). a) Síntesis del dipéptido Bz-L-Tyr-L-Leu-NH₂; b) síntesis del dipéptido Bz-L-Tyr-L-Ala-NH₂.

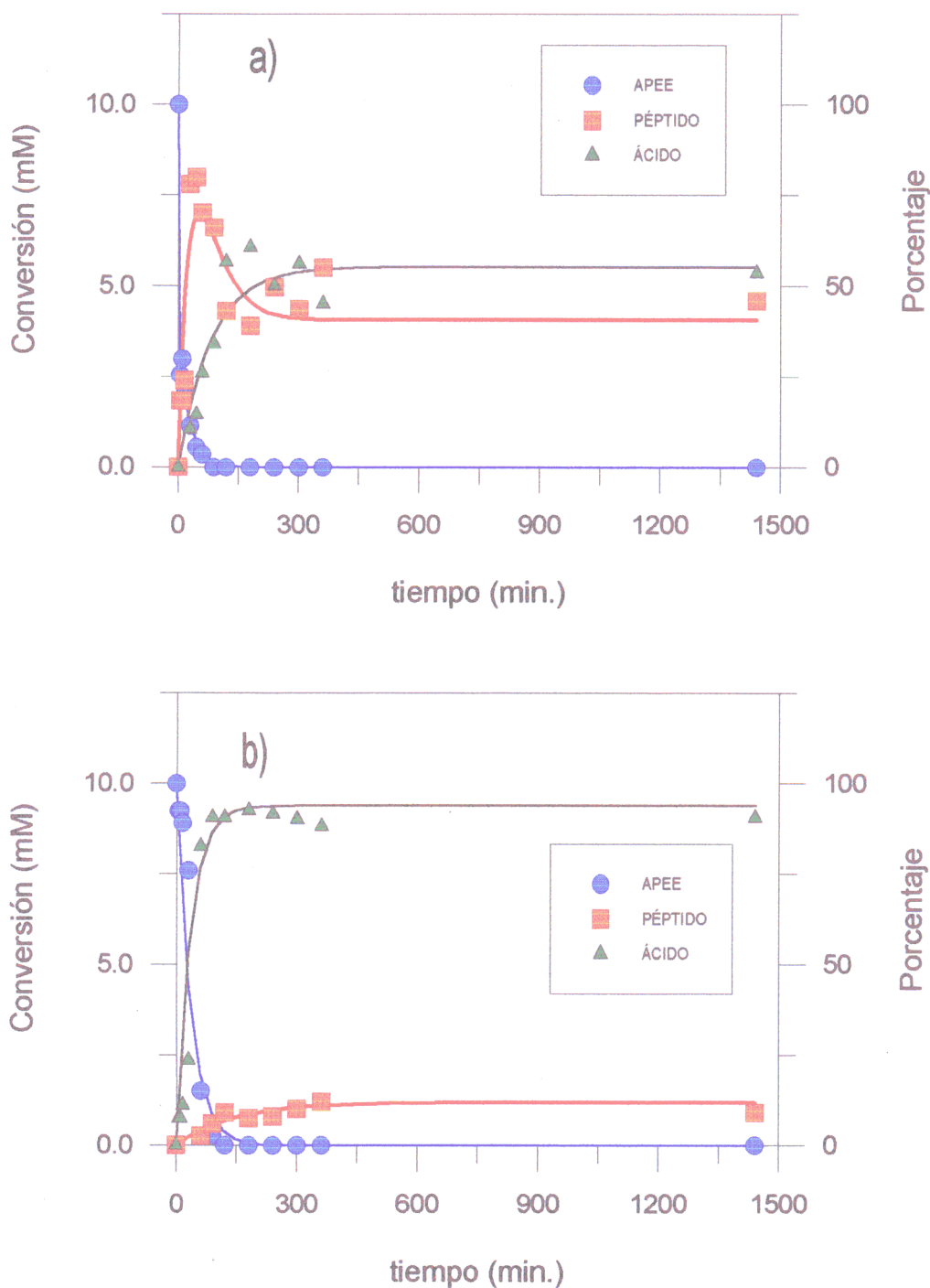


Figura 67,- Influencia del nucleófilo, empleando 1,1,1-tricloroetano/Tris pH=9.0, 0.1 M 99/1, (v/v) como medio y 0.24 mg de enzima/ml (8.85 mg de derivado AGU1-CT/ml). a) Síntesis del dipéptido Ac-L-Phe-L-Leu-NH₂; b) síntesis del dipéptido Ac-L-Phe-L-Ala-NH₂.

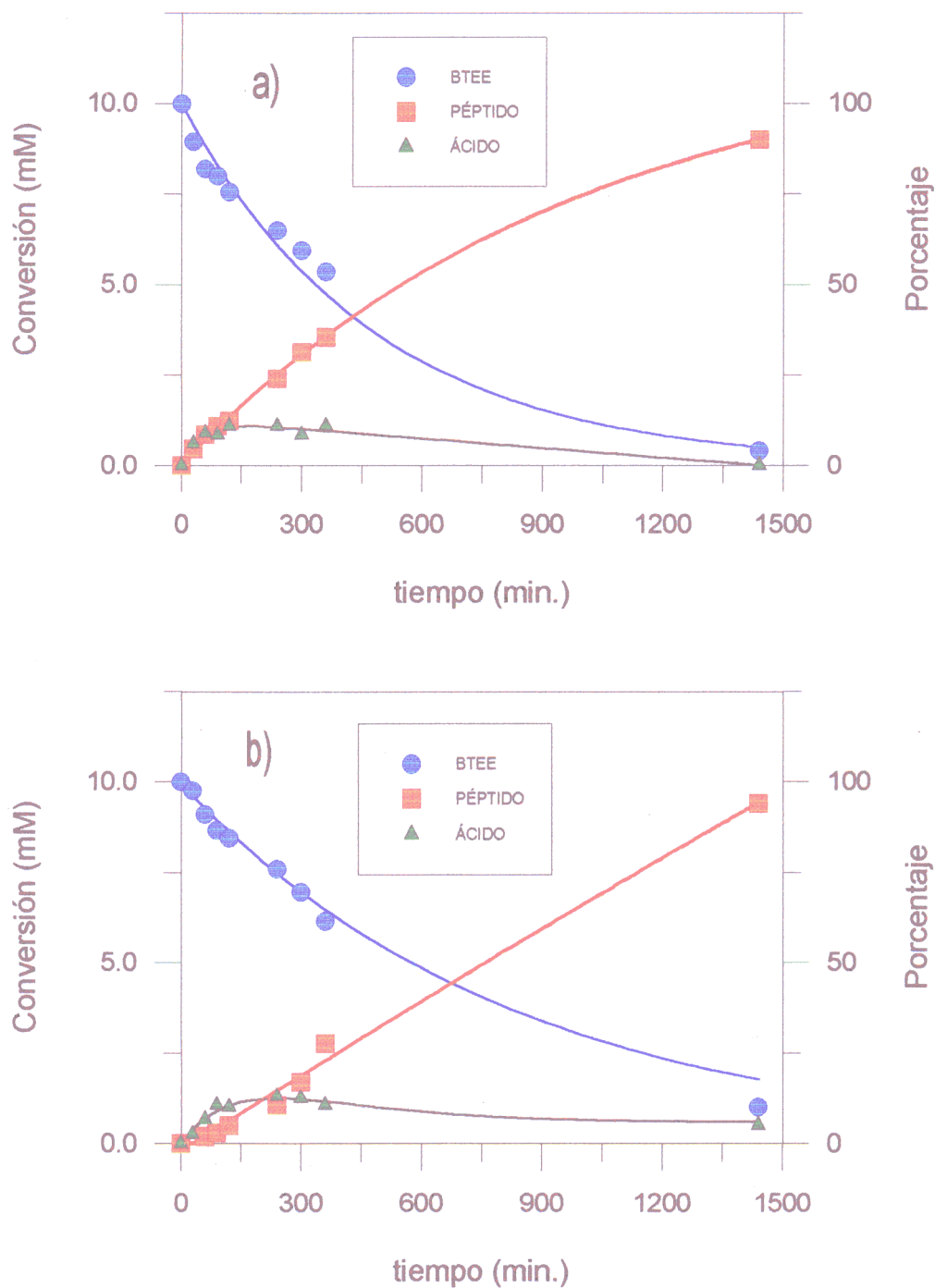


Figura 68,- Influencia del nucleófilo, empleando metilisobutilcetona/Tris pH=9.0, 0.1 M 99/1, (v/v) como medio y 0.24 mg de enzima/ml (8.85 mg de derivado AGU1-CT/ml). a) Síntesis del dipéptido Bz-L-Tyr-L-Leu-NH₂; b) síntesis del dipéptido Bz-L-Tyr-L-Ala-NH₂.

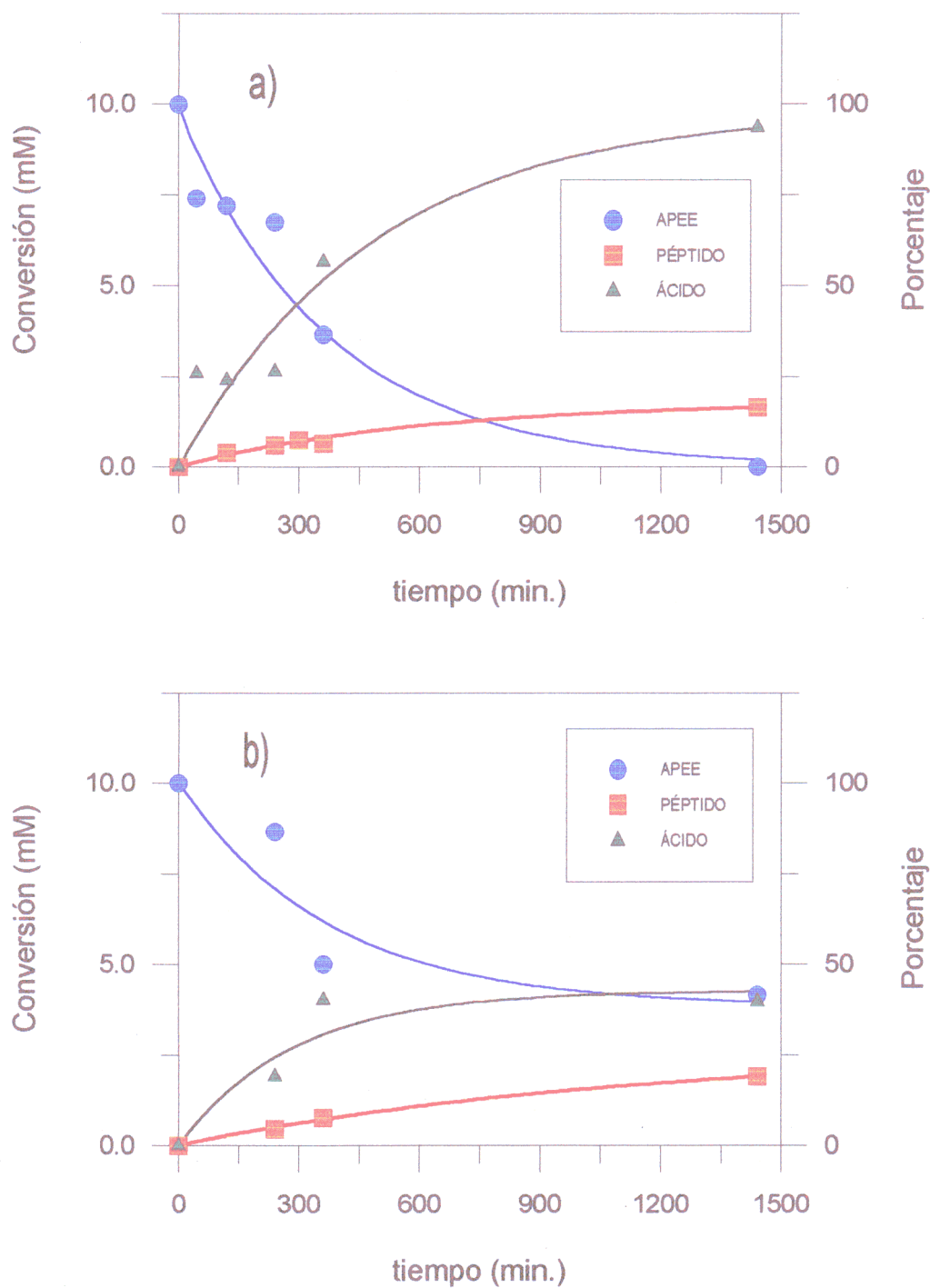


Figura 69,- Influencia del nucleófilo, empleando metilisobutilcetona/Tris pH=9.0, 0.1 M 99/1, (v/v) como medio y 0.24 mg de enzima/ml (8.85 mg de derivado AGU1-CT/ml). a) Síntesis del dipéptido Ac-L-Phe-L-Leu-NH₂; b) síntesis del dipéptido Ac-L-Phe-L-Ala-NH₂.

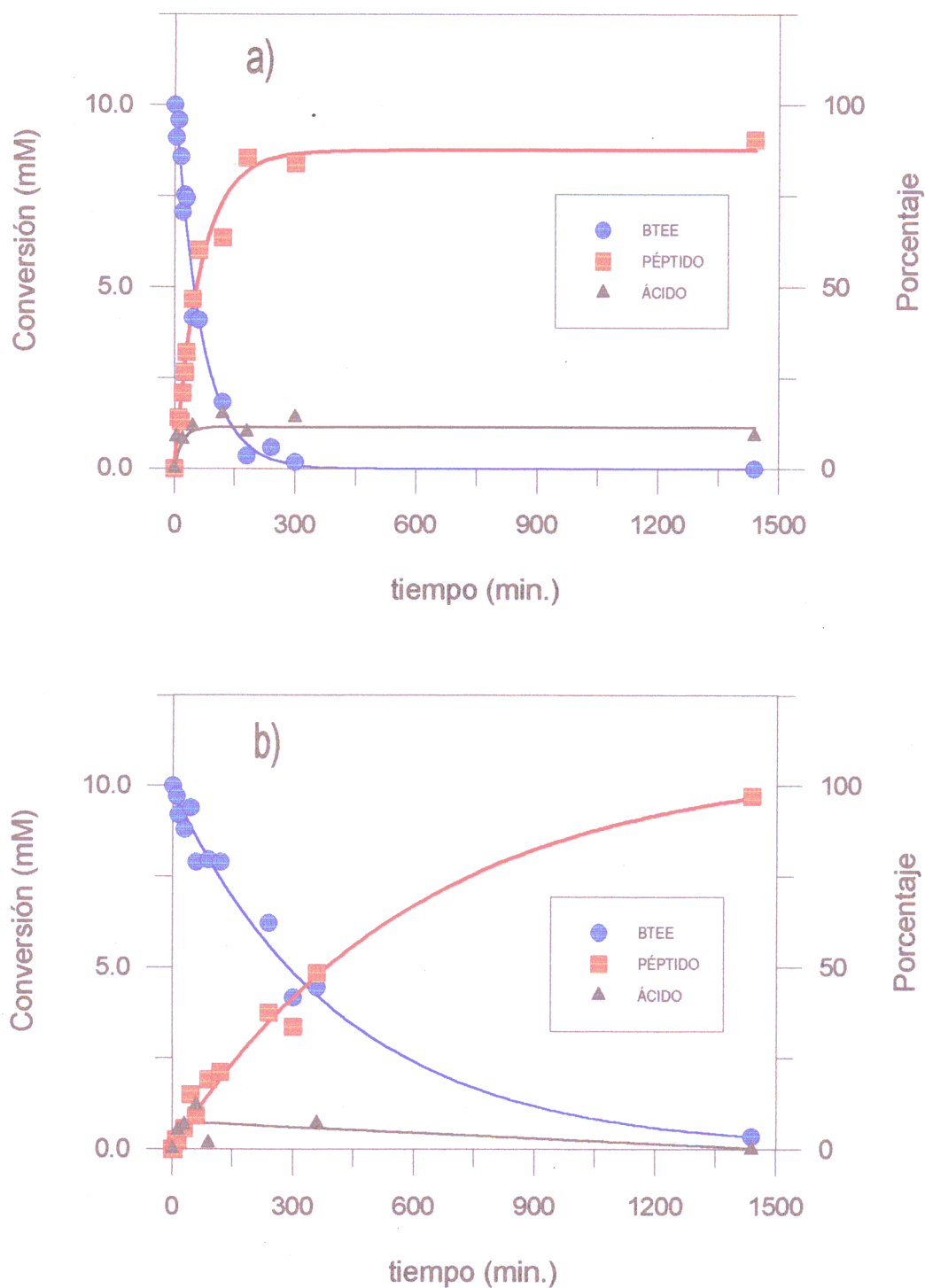


Figura 70,- Influencia del nucleófilo, empleando acetato de etilo/Tris pH=9.0, 0.1 M 99/1, (v/v) como medio y 0.24 mg de enzima/ml (8.85 mg de derivado AGU1-CT/ml). a) Síntesis del dipéptido Bz-L-Tyr-L-Leu-NH₂; b) síntesis del dipéptido Bz-L-Tyr-L-Ala-NH₂.

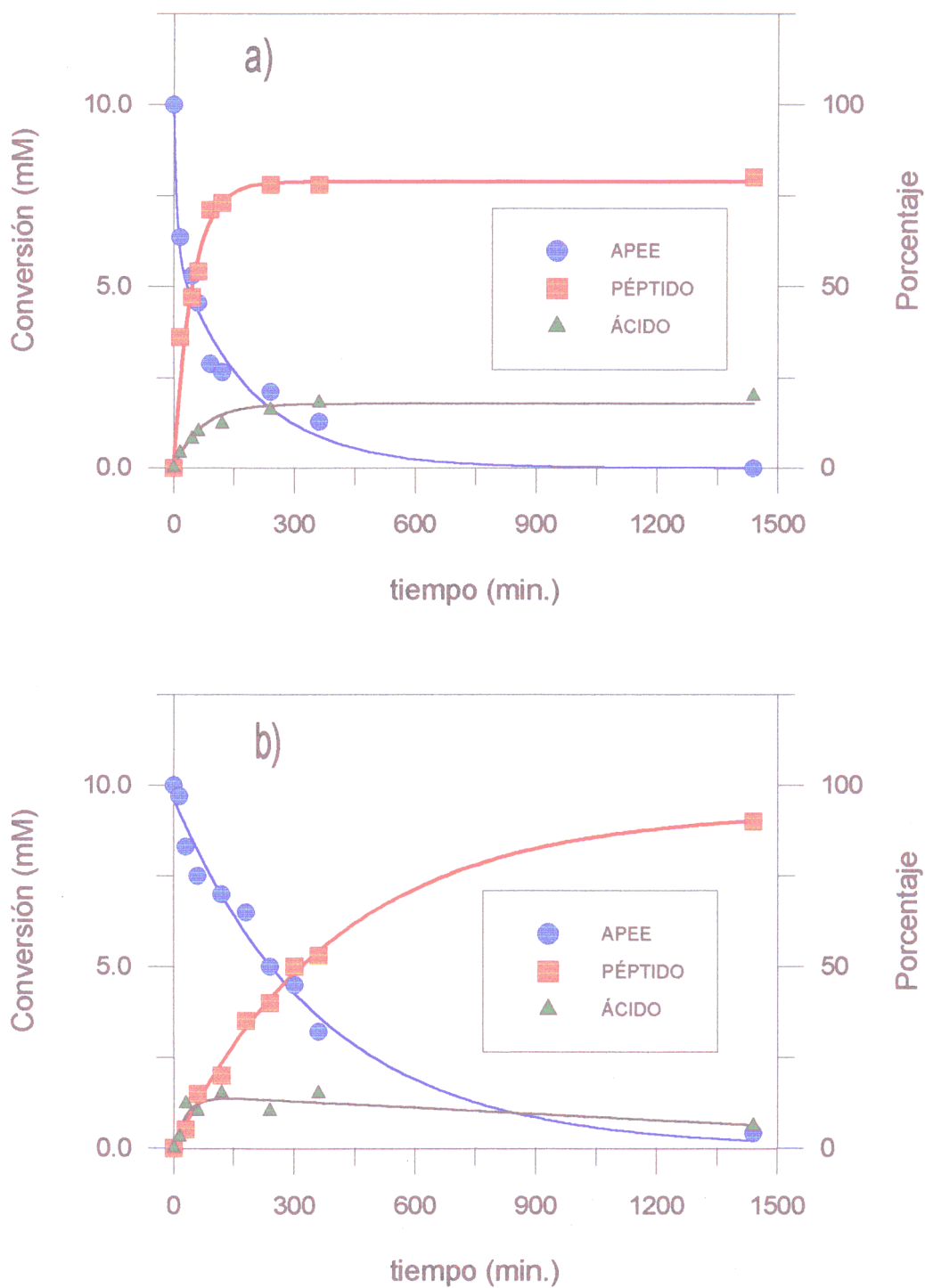


Figura 71,- Influencia del nucleófilo, empleando acetato de etilo/Tris pH=9.0, 0.1 M ζ 9/1, (v/v) como medio y 0.24 mg de enzima/ml (8.85 mg de derivado AGU1-CT/ml). a) Síntesis del dipéptido Ac-L-Phe-L-Leu-NH₂; b) síntesis del dipéptido Ac-L-Phe-L-Ala-NH₂.

proceso de síntesis de péptidos (252). Así pues el -OH fenólico de la tirosina parece ser importante para el reconocimiento del sustrato, pero su efecto no es tan dramático como en el caso de la MIBK.

Por lo tanto, tal y como ocurre con la enzima nativa o modificada químicamente, el Bz-*L*-Tyr-OEt es mejor donador de acilo que la Ac-*L*-Phe-OEt. De ello se deduce que la inmovilización sobre agarosa no altera el patrón de reactividad de la enzima.

Por último debemos decir que el dipéptido Bz-*L*-Tyr-*L*-Ala-NH₂ (**Fig 66b**) es más sensible a la hidrólisis que el Bz-*L*-Tyr-*L*-Leu-NH₂ (**Fig. 66a**), lo cual puede deberse a su menor impedimento estérico y mayor hidrofília que favorecería el que fuera preferentemente reconocido por la enzima inmovilizada sobre la agarosa, soporte eminentemente hidrófilo.

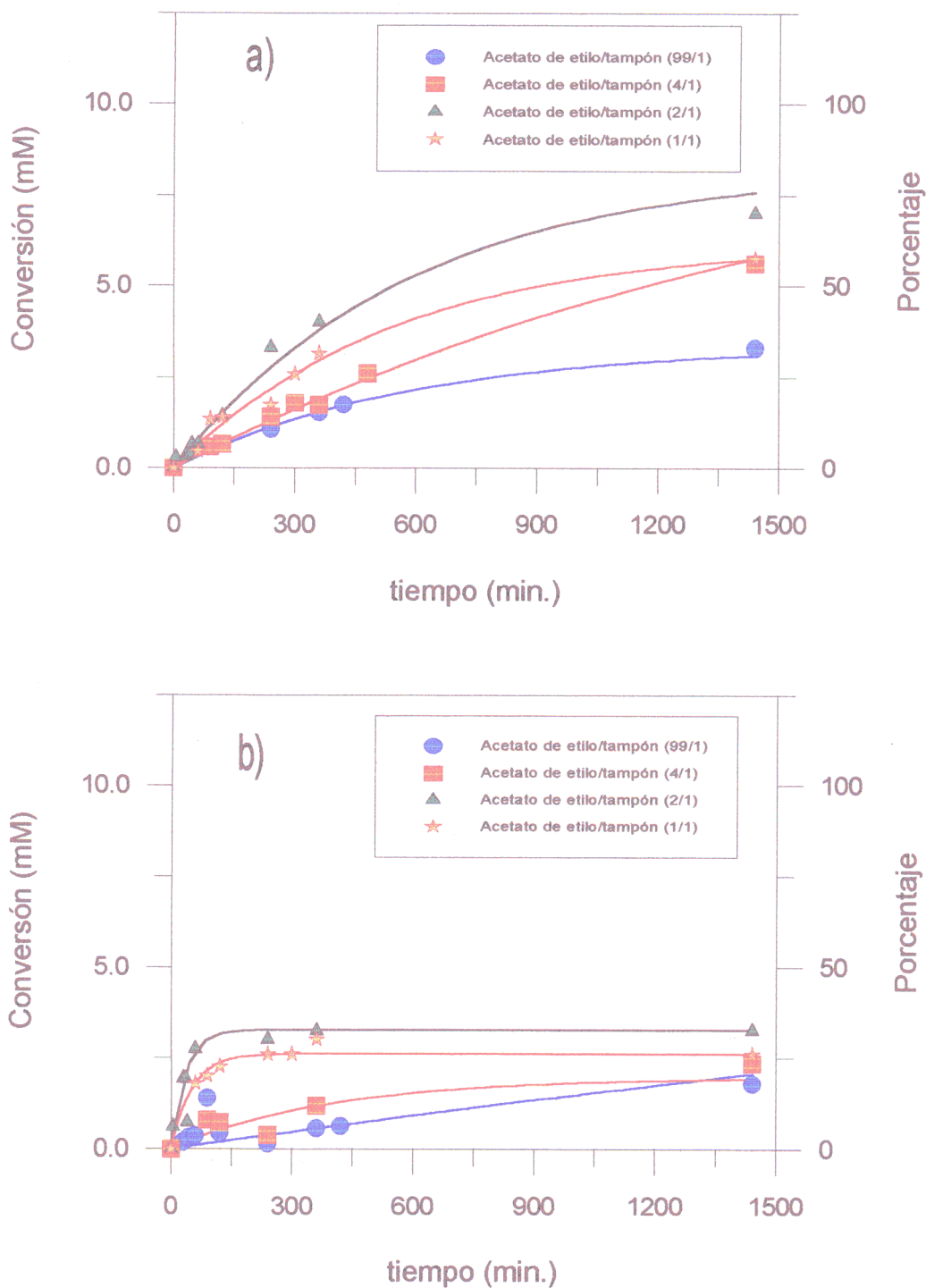
En la **Tabla 36** se resumen los resultados obtenidos al estudiar la influencia de la naturaleza del donador de acilo y del nucleófilo en el proceso de síntesis, trabajando en condiciones de medio orgánico ligeramente hidratado.

De los datos indicados en esta **Tabla 36** puede deducirse que el disolvente óptimo depende del péptido a sintetizar. Así cuando el nucleófilo es lipóide (H-*L*-Leu-NH₂) se recomienda un disolvente de logP > 2 (1,1,1-tricloroetano) (entrada 1a), pero cuanto más hidrófilo es el nucleófilo, menor es la diferencia observada entre uno y otro disolvente; inclusive empleando acetato de etilo (entradas 3) en proporciones elevadas, se obtiene más rendimiento con la *L*-alaninamida que con la *L*-leucinamida, aunque las velocidades de desaparición de éster y de síntesis de péptidos son mayores cuando se utiliza como nucleófilo *L*-leucinamida (**Figuras 70 y 71**).

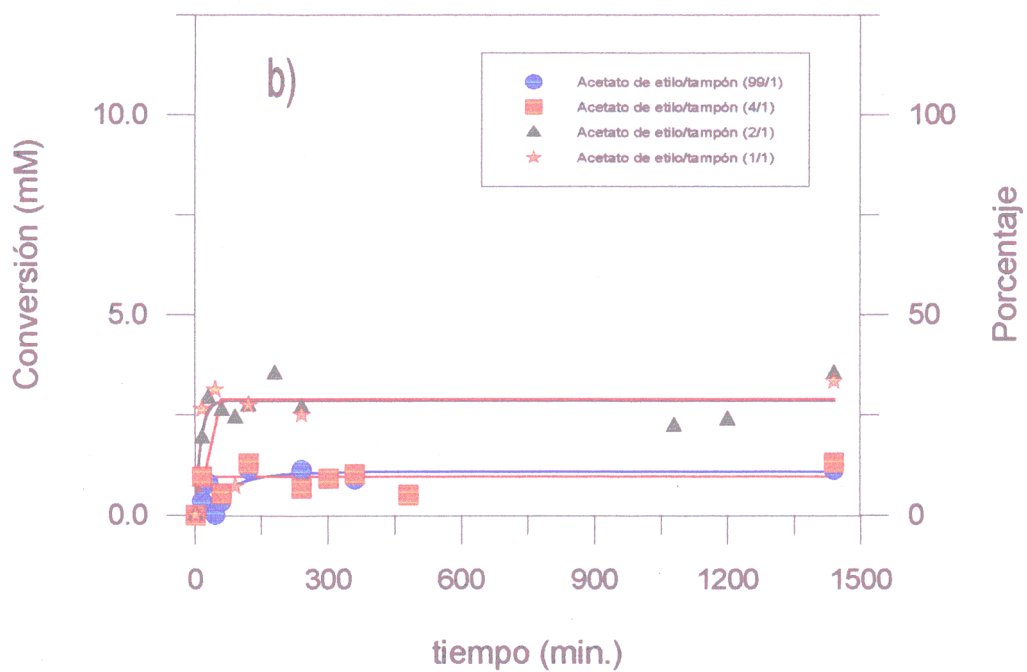
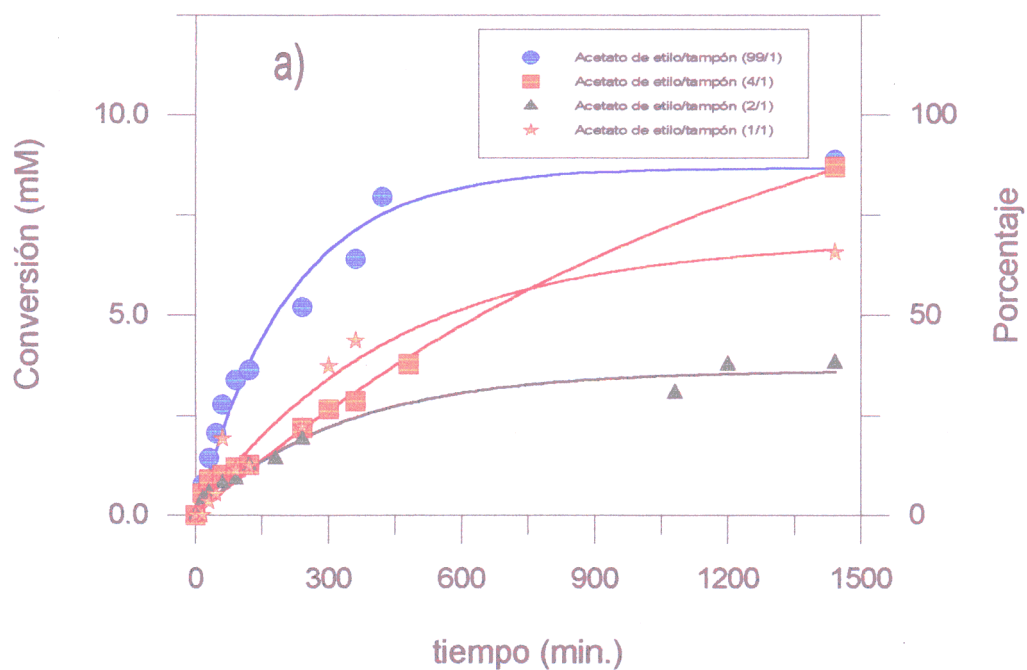
IV.2.3.3.- Influencia del porcentaje de disolvente

En la bibliografía se ha tratado ampliamente el efecto del medio bifásico en la reacción de síntesis de péptidos (159, 164, 181, 268). En esta línea hemos analizado la influencia de la proporción de AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M en la relación péptido/ácido empleando diferentes cantidades de biocatalizador.

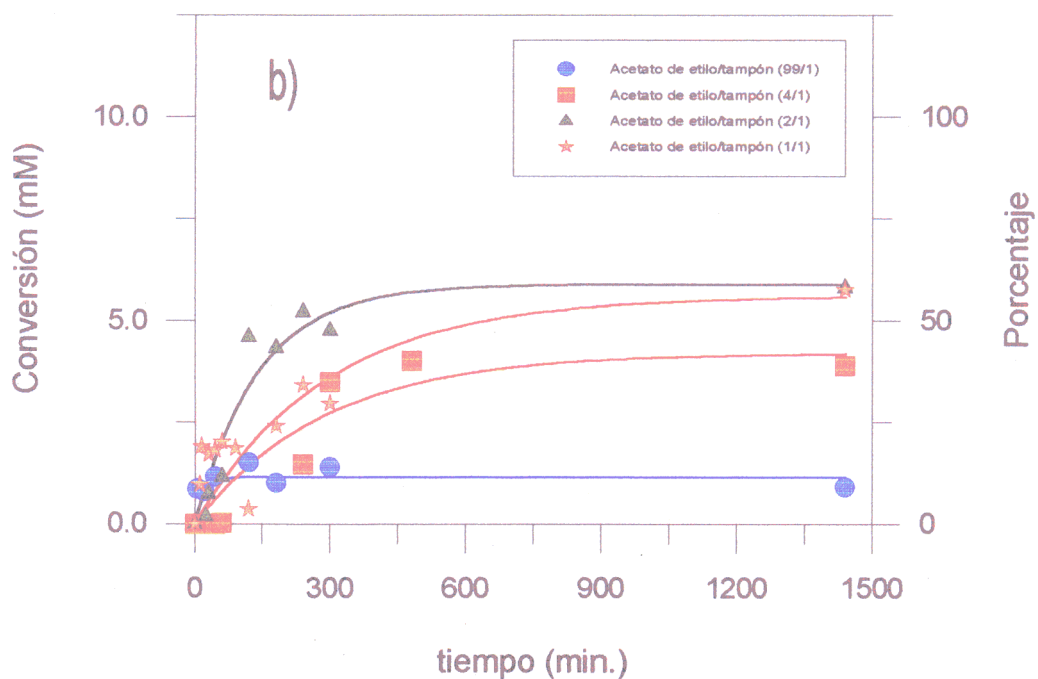
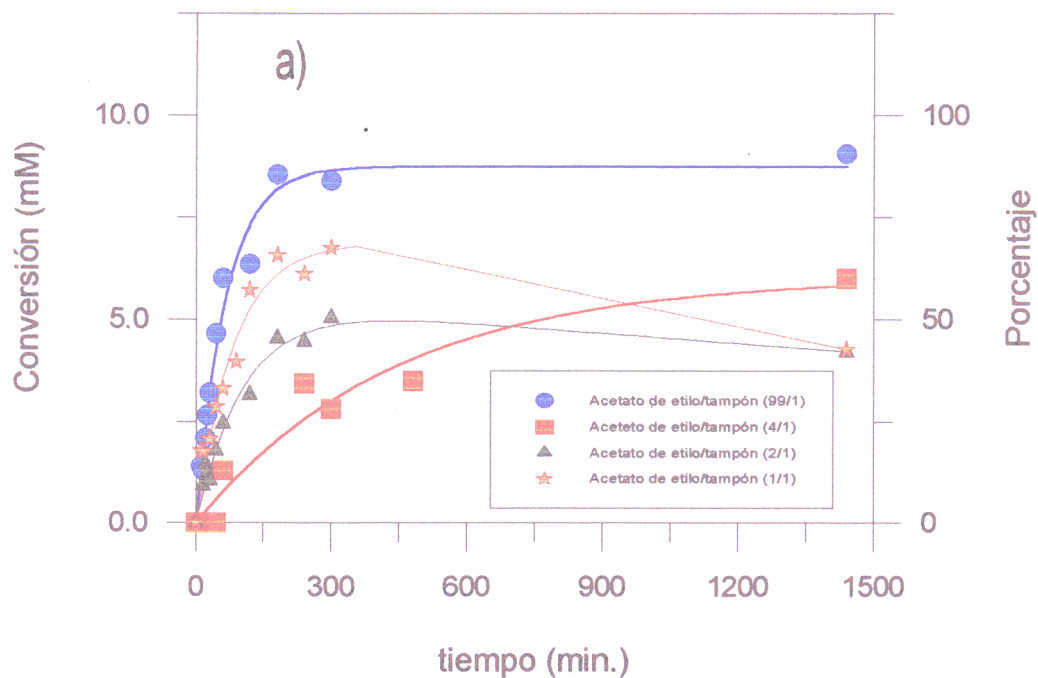
En las **Figuras 72, 73 y 74** se muestran las curvas de progreso obtenidas empleando 3 concentraciones distintas de derivado AGU1-CT (1.6, 3.6, y 8.85 mg de derivado/ml



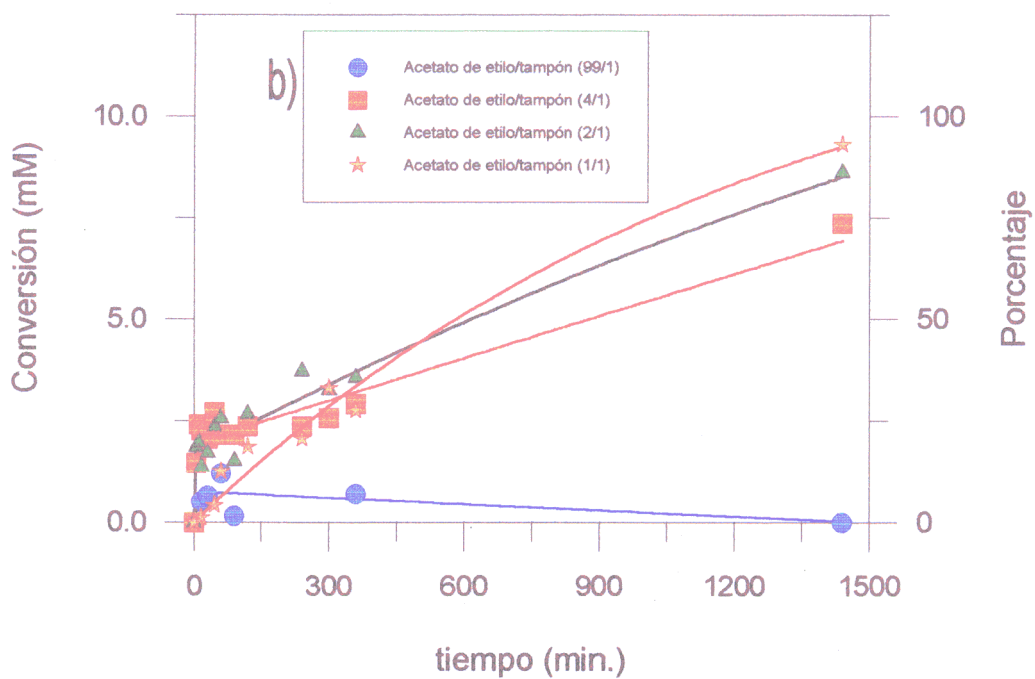
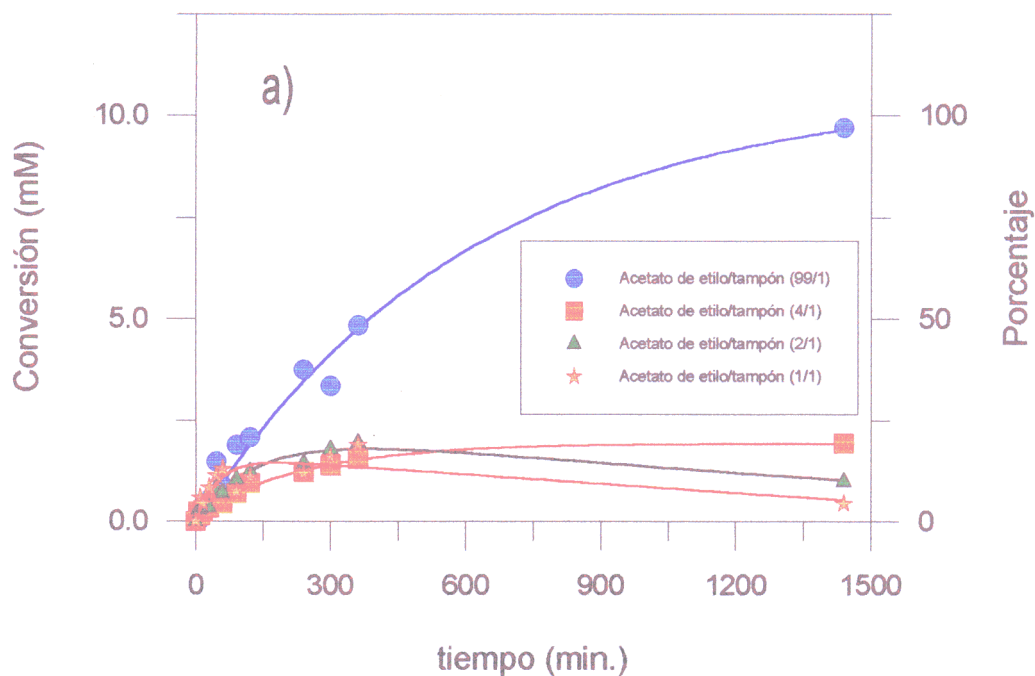
Figuras 72.- Influencia de la proporción de acetato de etilo en la síntesis de Bz-L-Tyr-L-Leu-NH₂, empleando 0.046 mg de enzima/ml (1.6 mg de derivado AGU1-CT/ml) como catalizador. a) Péptido; b) ácido.



Figuras 73.- Influencia de la proporción de acetato de etilo en la síntesis de Bz-L-Tyr-L-Leu-NH₂, empleando 0.097 mg de enzima/ml (3.4 mg de derivado AGU1-CT/ml) como catalizador. a) Péptido; b) ácido.



Figuras 74.- Influencia de la proporción de acetato de etilo en la síntesis de Bz-L-Tyr-L-Leu-NH₂, empleando 0.24 mg de enzima/ml (8.85 mg de derivado AGU1-CT/ml) como catalizador. a) Péptido; b) ácido.



Figuras 75.- Influencia de la proporción de acetato de etilo en la síntesis de Bz-L-Tyr-L-Ala-NH₂, empleando 0.24 mg de enzima/ml (8.85 mg de derivado AGU1-CT/ml) como catalizador. a) Péptido; b) ácido.

equivalentes a 0.043, 0.097 y 0.24 mg de enzima/ml), mientras que en la **Tabla 37** se resumen los principales parámetros de las mismas.

Tabla 37.- Comparación de la proporción de acetato de etilo en la actividad enzimática del derivado AGU1-CT en la síntesis del péptido Bz-L-Tyr-L-Leu-NH₂ y T=25° C.

Ent.	AcOEt/tampón	tiempo (h.)	% Péptido	% Ácido	Pep./Ac.
1		[Enz]=0.240 mg/ml			
1a	1/1	5*	67	30	2.2
1b	2/1	5*	50	48	1.0
1c	4/1	24	60	40	1.5
1d	99/1	5	90	10	9.0
2		[Enz]=0.097 mg/ml			
2a	1/1	24	65	30	2.2
2b	2/1	24	38	35	1.1
2c	4/1	24	83	15	5.5
2d	99/1	24	85	10	8.5
3		[Enz]=0.046 mg/ml			
3a	1/1	24	65	30	2.2
3b	2/1	24	55	25	2.2
3c	4/1	24	53	20	2.6
3d	99/1	24	30	15	2.0

* A tiempos mayores se observa actividad amidásica

De los datos indicados en la **Tabla 37** deducimos que un aumento en la cantidad de enzima añadida (derivado inmovilizado) reduce, fundamentalmente, el tiempo necesario para

alcanzar la máxima relación péptido/ácido y de igual forma, favorece la acción amidásica. Las mejores relaciones péptido/ácido se consiguen con las concentraciones de enzima más altas, cuando el porcentaje de agua presente en la reacción es mínimo (entradas 1d y 2d). Este resultado parece lógico, debido a la poca cantidad de agua presente en el medio (1%) capaz de competir con el nucleófilo en la deacilación del complejo acil-enzima, para así originar ácido como producto no deseado de la reacción. (159).

Cuando la concentración de enzima es baja (entradas 3), no existe una diferencia apreciable en la relación péptido/ácido al variar el porcentaje de disolvente.

Otro efecto interesante que debe reseñarse, y que se manifiesta más notoriamente cuando las concentraciones de enzima son bajas, es el hecho de que a medida que aumenta el porcentaje de disolvente orgánico, disminuyen las velocidades de síntesis y de hidrólisis (Figura 72): después de 24 h. (Tabla 37, entrada 3d) sólo se ha consumido un 45% de ester, mientras que en el mismo tiempo, para la misma concentración de enzima y una proporción de 1/1 AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, el ester consumido alcanza el 95% (entrada 3a). Este hecho está relacionado con una disminución de k_{cat} al descender la cantidad de agua del medio (268), lo cual desactiva la enzima inmovilizada sobre el soporte hidrofílico.

Si empleamos un nucleófilo con carácter más hidrofílico como es la *L*-alaninamida (40 mM) (Tabla 38) (Figura 75), empleando el derivado AGU1-CT en condiciones similares al estudio realizado con *L*-leucinamida, observamos que los resultados son peores, disminuyendo la actividad de síntesis en todas las proporciones (disolvente/fase acuosa), salvo en 99/1 (v/v), donde se obtienen mejores relaciones péptido/ácido que en el caso de la *L*-leucinamida.

Este hecho debe atribuirse al alto carácter hidrofílico (89% de agua en peso, determinada según Karl-Fischer) del soporte. En estos sistemas con poca adición externa de agua, prácticamente todo el agua presente en el medio se encontrará en las proximidades del derivado, por lo que el reparto del nucleófilo entre las dos fases favorecerá la aproximación de la *L*-alaninamida (más hidrófilo) a las moléculas de enzima, a diferencia de lo que sucede para el nucleófilo H-*L*-Leu-NH₂, el cual es más hidrófobo y por lo tanto permanece en mayor proporción en la fase orgánica, alejado de la enzima.

Tabla 38. - Comparación de la proporción de AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, en la actividad enzimática del derivado AGU1-CT (8.85 mg de derivado/ml equivalentes a 0.24 mg de enzima/ml) en la síntesis del péptido Bz-L-Tyr-L-Ala-NH₂ a 25° C de temperatura.

AcOEt/tampón	tiempo (h.)	% Péptido	% Ácido	Pes./ac.
1/1*	6	19	29	0.6
2/1*	6	20	32	0.6
4/1	6	16	27	0.6
99/1	24	99	1	99.0

* A tiempos mayores se observa actividad amidásica

Si empleamos los derivados AGU2-CT y AGM1-CT, a una concentración de 8.85 mg de derivado/ml, equivalentes a 0.076 mg de enzima/ml en reactor, recordando que éstos presentan mayor actividad específica en la hidrólisis de BTEE (Tabla 34, Sección IV.2.1) observamos que también conducen a una mayor conversión que el derivado AGU1-CT en la síntesis del dipéptido modelo Bz-L-Tyr-L-Leu-NH₂, empleando AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M en proporciones: 97/3, 1/1, (v/v) y tampón Tris saturado con acetato de etilo, como se representa en las Figuras 76 y 77. De igual forma, como ocurría con el derivado AGU1-CT, la velocidad de síntesis aumenta con el porcentaje de medio acuoso (265) (Tabla 39).

La concentración de enzima utilizada en los ensayos realizados con los derivados AGU2-CT y AGM1-CT es relativamente baja (8.85 mg de derivado/ml equivalentes a 0.076 mg de enzima/ml). La misma cantidad de derivado empleada se corresponde, en el caso de AGU1-CT, con una concentración proteica de 0.24 mg de enzima/ml, (Tabla 37, entradas 1). Observando conjuntamente los resultados obtenidos en estas condiciones (Tablas 37 y 39), con los derivados de menor carga enzimática (AGU2-CT y AGM1-CT), se comprueba que el comportamiento del catalizador parece correlacionarse con la cantidad de soporte añadido a la reacción. Así, cuando se trabaja a una concentración de 8,85 mg de derivado/ml, en los tres se obtuvieron porcentajes elevados de dipéptido cuando la cantidad de agua es baja.

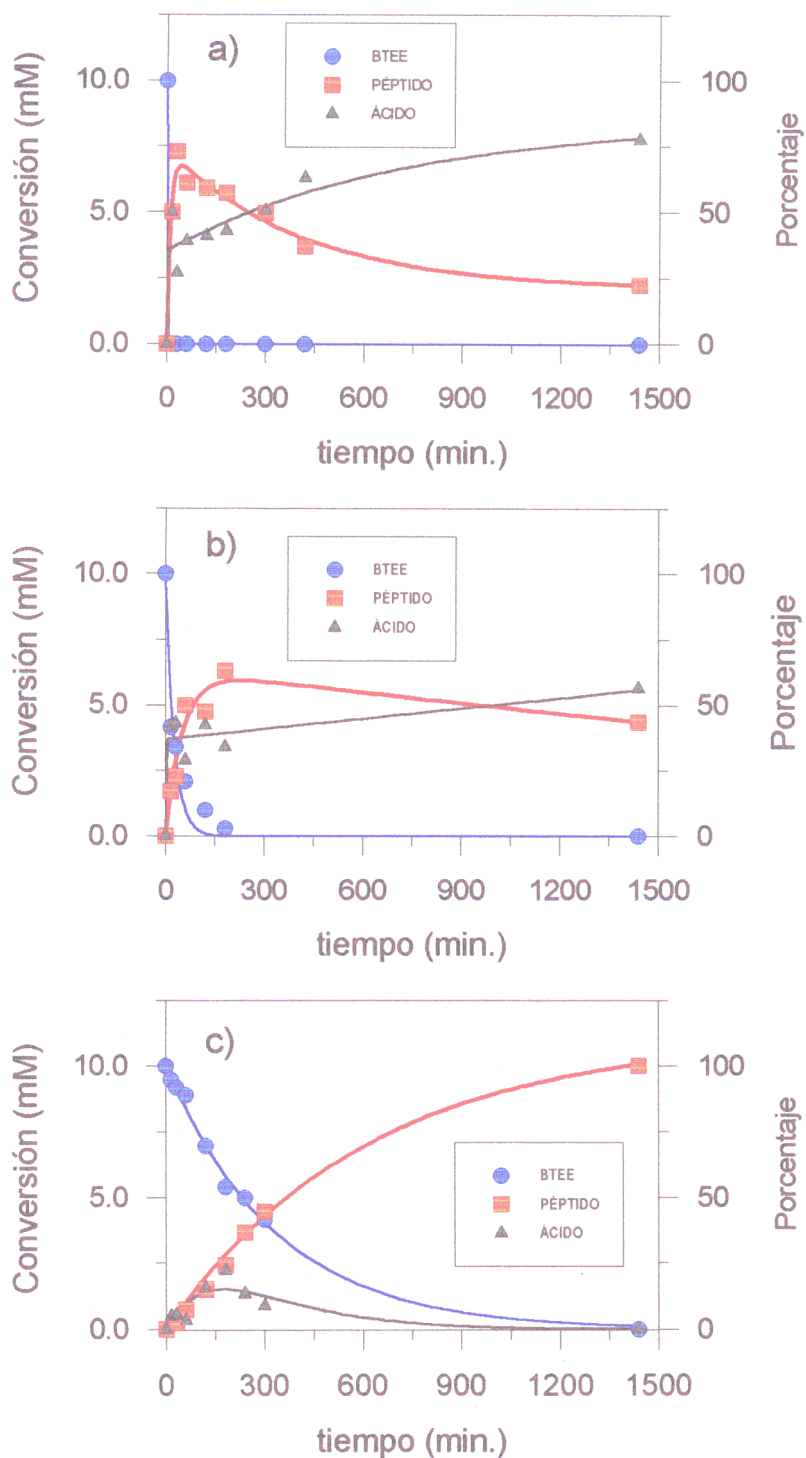


Figura 76.- Síntesis del dipéptido $Bz-L-Tyr-L-Leu-NH_2$, empleando 8.85 mg de derivado AGU2-CT/r1l (0.076 mg de enzima/ml), en un medio AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M. a) Tris pH=9.0, 0.1 M, saturado con acetato de etilo; b) 50/50, (v/v); c) 97/3, (v/v).

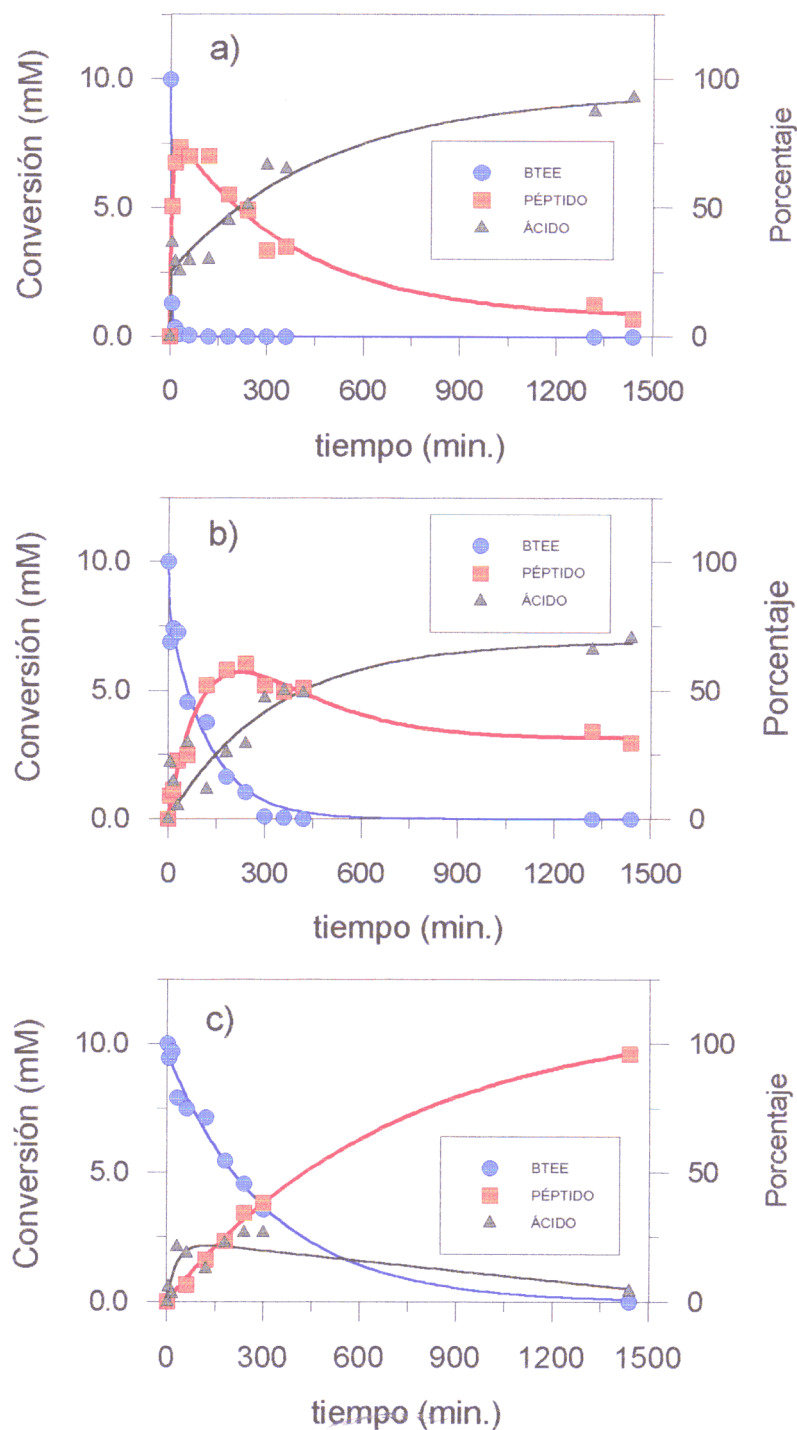


Figura 77.- Síntesis del dipéptido $Bz-L-Tyr-L-Leu-NH_2$, empleando 8.85 mg de derivado AGM1-CT/ml (0.076 mg de enzima/ml), en un medio AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M. a) Tris pH=9.0, 0.1 M, saturada con acetato de etilo; b) 50/50, (v/v); c) 97/3, (v/v).

Tabla 39.- Comparación de la proporción de AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M en la actividad enzimática de los derivados AGU2-CT y AGM2-CT (0.076 mg de enzima/ml equivalentes a 8.85 mg de derivado/ml), en la síntesis del péptido Bz-L-Tyr-L-Leu-NH₂ a 25°C de temperatura.

Ent.	AcOEt/tampón	t (h.)	% Péptido	% Ácido	V ini. ^b	Pépt/Ác.
1 AGU2-CT						
1a	Tampón sat. ^a	0.5*	73	27	0.640	2.7
1b	1/1	3*	63	34	0.142	1.8
1c	97/3	24	99	1	0.018	99.0
2 AGM1-CT						
2a	Tampón sat. ^a	0.5*	74	26	1.497	2.8
2b	1/1	3*	58	25	0.100	2.3
2c	97/3	24	93	5	0.015	18.6

* A tiempos mayores se observa actividad amidásica

^a El medio empleado en esta ocasión es tampón (Tris/HCl pH=9.0, 0.1 M) saturado con acetato de etilo.

^b Velocidad inicial de síntesis de péptido en (mM/min.).

Asimismo, se puede observar la aparición de la actividad amidásica en las reacciones relacionadas con mayores porcentajes de agua, a diferencia de lo que ocurría con el derivado AGU1-CT empleando concentraciones próximas a 0.076 mg de enzima/ml (Tabla 37 entradas 2 y 3), donde no existía actividad amidásica a lo largo de toda la reacción.

Por otra parte, también se deben considerar los valores de actividad específica de los derivados; así el derivado AGU1-CT (actividad específica 0.07 mM de BTEE min.⁻¹ mg⁻¹ de enzima, Tabla 34) necesita obviamente una mayor concentración de catalizador en el reactor para producir el mismo efecto que los derivados AGU2-CT (3.3 mM min.⁻¹ mg⁻¹ de enzima) y AGM1-CT (2.8 mM min.⁻¹ mg⁻¹ de enzima, Tabla 34), que son más activos.

Resultados similares a éstos se obtuvieron con los derivados de α -quimotripsina

inmovilizada sobre copolímeros (PE/HEMA) siempre y cuando el porcentaje de injerto sea elevado tal y como se indicó en la **Sección IV.1.5.4**.

La desaparición del éster es casi instantánea cuando el porcentaje de agua en el medio de reacción es igual o superior al 50% para ambos derivados AGU2-CT y AGM1-CT (**Figuras 76 y 77**). El medio con menor proporción de agua conduce a las mejores relaciones péptido/ácido (**Tabla 39**, entradas 1c y 2c), aunque el tiempo empleado para ello sea mayor que en otras proporciones disolvente/fase acuosa, tal y como se comentó para AGU1-CT.

Un hecho de gran relevancia es la disminución de la concentración de ácido en la proporción 97/3, (v/v) AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, debido a la aparición de la reacción de síntesis termodinámicamente controlada, aspecto ya comentado al hablar de los derivados de α -quimotripsina inmovilizada sobre copolímeros, y sobre el que profundizaremos al estudiar la influencia de la concentración de nucleófilo en los procesos de síntesis (**Sección IV.2.4**).

En la **Tabla 39** se comparan los derivados AGU2-CT y AGM1-CT, comprobándose que el derivado unipuntual es el que mejor relación péptido/ácido proporciona (relación péptido/ácido=99), para una proporción 97/3, (v/v) AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M (entrada 1c). Estos resultados están obtenidos con una cantidad de enzima activa relativamente baja (0.076 mg de enzima/ml, que se corresponden con 8.85 mg de derivado/ml). Este hecho podría explicarse por la mayor rigidez que presenta el derivado multipuntual, (232, 265).

Si comparamos el comportamiento de ambos derivados unipuntuales en condiciones experimentales similares, AGU1-CT, (**Tabla 37**, entradas 2d y 3d) y AGU2-CT, (**Tabla 39**, entrada 1c), podemos concluir que el derivado menos cargado con mayor actividad específica esto es, AGU2-CT, nos permite obtener una mayor relación péptido/ácido a las 24 h.

IV.2.3.4.- Influencia de la naturaleza del disolvente.

Se han utilizado cinco disolventes de diferentes valores de $\log P$ (234): 1.1.1-tricloroetano ($\log P = 2.49$), metilisobutilcetona ($\log P = 1.38$), acetato de etilo ($\log P = 0.73$), 1.4-butanodiol ($\log P = -0.92$), y N,N-dimetilformamida ($\log P = -1.01$), a fin de determinar la influencia del carácter hidrófobo/hidrófilo del disolvente en la actividad de los derivados inmovilizados sobre agarosa. En todos los casos se empleó la proporción

disolvente/fase acuosa 99/1 (v/v), por ser la que mejores resultados nos había dado anteriormente. Los resultados aparecen en la **Figura 78**.

Puede observarse (**Figura 78**) que en estas condiciones, empleando 8.85 mg de derivado AGU1-CT/ml, equivalentes a 0.24 mg de enzima/ml, el disolvente más lipóide (1,1,1-tricloroetano) es el que mejores rendimientos nos proporcionó, como ya sucedió con la enzima libre y con los derivados de α -quimotripsina inmovilizada sobre copolímeros de injerto (**Sección IV.1.5.3**).

Por otra parte, no se obtuvo conversión con los disolventes más hidrófilos (N,N-dimetilformamida y 1,4-butanodiol), ya que estos retienen la pequeña cantidad de agua presente en el medio de reacción. Este hecho está de acuerdo con los resultados indicados por Clapés y cols (159): estos autores constatan que en presencia de medios inmiscibles en agua, las máximas conversiones se alcanzan con porcentajes variables (entre 0.1-3%) de fase acuosa, mientras que cuando el disolvente es miscible con agua, se necesitan proporciones de agua mayores al 4%. Otros miembros de nuestro grupo, utilizando derivados de α -quimotripsina inmovilizada sobre agarosa, muy similares a los nuestros, han obtenido buenos rendimientos (50% de péptido en 45 minutos) (209) empleando un 40% de DMF y un 60% de tampón pH=9.0 lo que nos indica que, cuando el disolvente es hidrófilo, se necesita mayor cantidad de agua para obtener rendimientos óptimos.

Por tanto, el disolvente que presenta un valor de $\log P > 2$, proporciona las mayores conversiones tal como se refleja en la bibliografía para otros derivados (233, 269). La escasa conversión obtenida con la metilisobutilcetona ($\log P = 1.38$) en comparación con el acetato de etilo ($\log P = 0.73$), como se comentó en la **Sección IV.2.3.2** debe interpretarse, no en función de consideraciones de hidrofóbia/hidrofília, sino en función de la reactividad química del disolvente hacia los grupos amino libres de la enzima inmovilizada, que provocará una alteración de la superficie de la enzima transformando los grupos hidrófilos ($-\text{NH}_2$ expuestos) en grupos lipóides, por la formación de bases de Schiff, lo cual origina un cambio conformacional de la enzima, obteniéndose una especie presumiblemente menos activa en el proceso. Esta alteración química por formación de iminas ha sido descrito en la bibliografía (259, 270).

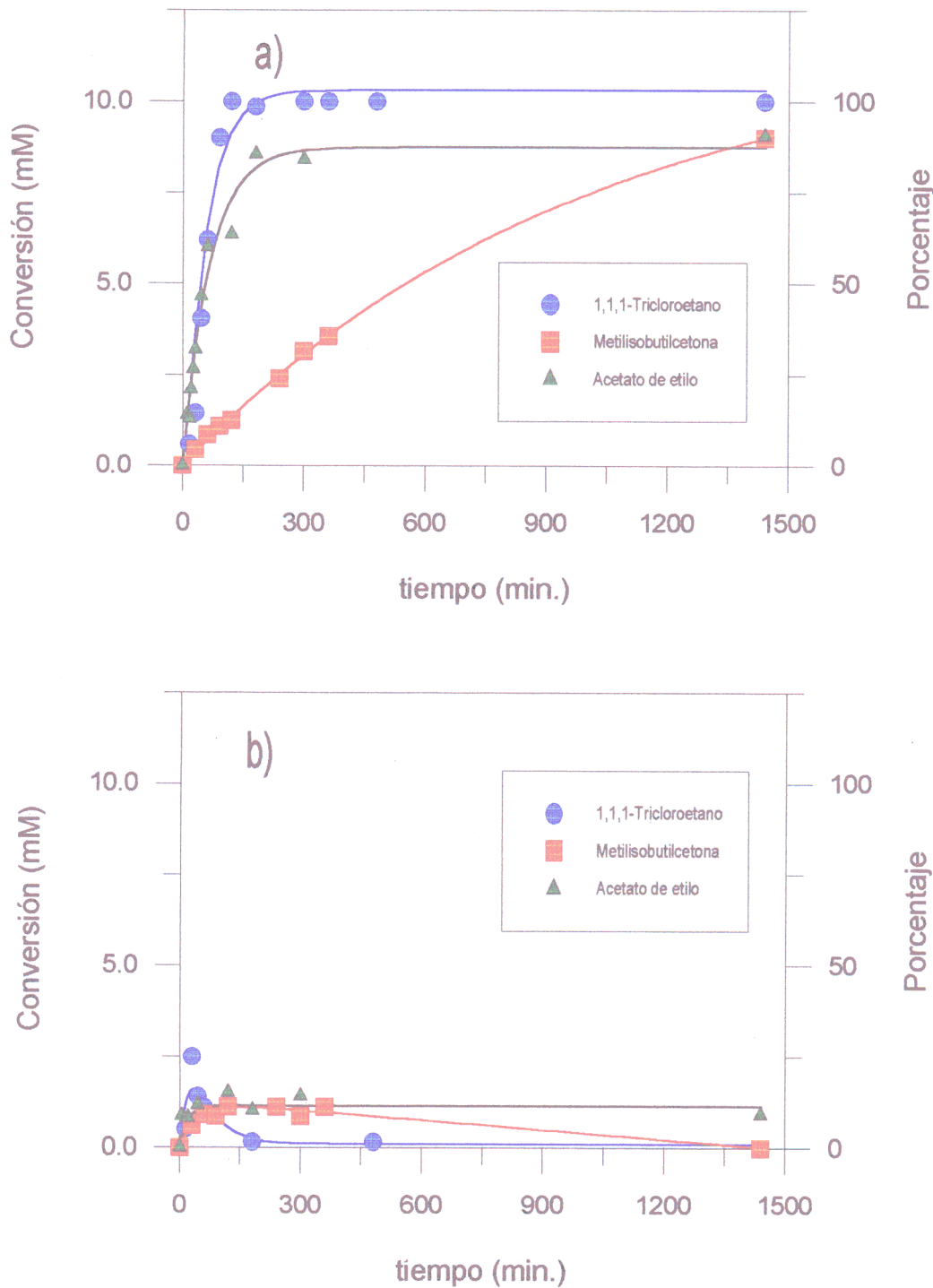


Figura 78.- Influencia de la naturaleza del disolvente en la síntesis del dipéptido Bz-L-Tyr-L-Leu-NH₂, empleando 0.24 mg de enzima/ml (8.85 mg del derivado AGU1-CT) en una proporción de medio (99/1, v/v) disolvente/(tampón Tris/HCl pH = 9.0 0.1 M). a) Péptido; b) ácido.

Esto demuestra que además de las propiedades fisicoquímicas de un disolvente, debemos considerar su posible reactividad hacia el derivado enzimático, tal y como se ha puesto de manifiesto en nuestro grupo de trabajo (138a, 271) y ha sido contrastado por otros autores (272, 273).

Resumiendo, podemos decir que cuando se lleva a cabo la reacción de síntesis peptídica empleando derivados inmovilizados sobre agarosa, el mejor medio será aquel que contenga poca agua, un disolvente muy lipóide y una baja o moderada cantidad de enzima activa.

IV.2.3.5.- Influencia de la concentración de donador de acilo.

Los resultados del estudio de la influencia de la concentración del donador de acilo (desde 0 hasta 20 mM) en la velocidad de la reacción de síntesis del péptido Bz-*L*-Tyr-*L*-Leu-NH₂ para ambos derivados AGU2-CT y AGM1-CT aparecen en la **Figura 79** y en la **Tabla 40**. Donde se puede observar como estos derivados presentan un comportamiento diferente, debido presumiblemente a la diferente estructura del biocatalizador, aunque observando detenidamente la escala del eje de velocidades iniciales, parece que no existe gran diferencia entre ambos derivados.

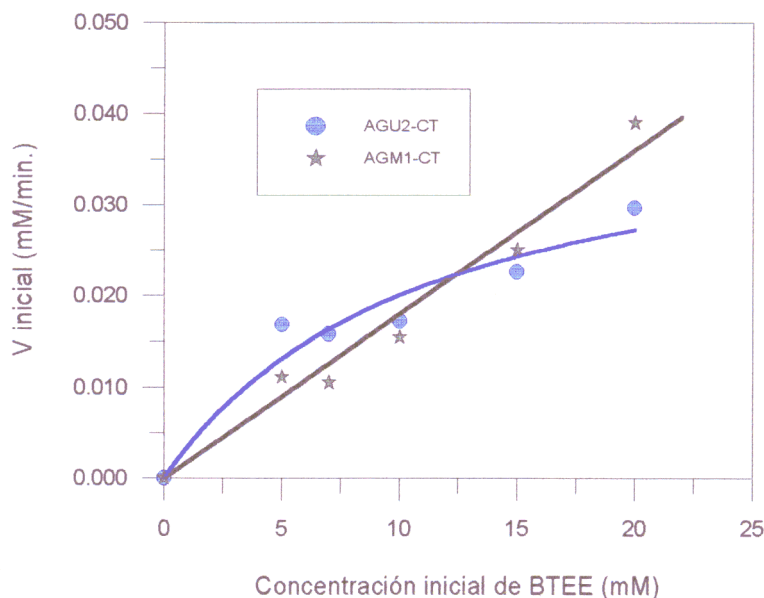


Figura 79.- Variación de la velocidad inicial de síntesis del dipéptido Bz-*L*-Tyr-*L*-Leu-NH₂, en función de la concentración de donador de acilo, *L*-leucinamida 40 mM, AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 97/3, (v/v).

Tabla 40.- Resumen de los parámetros del ajuste en la variación de la concentración de donador de acilo.

Derivado	Pendiente (min. $\times 10^{-3}$)	Ordenada en el origen	R ²
AGU2-CT	0.9 \pm 0.2	0.010 \pm 0.005	0.910
	V _{max} (mM/min.)	K _m	
AGM1-CT	0.04 \pm 0.01	11 \pm 5	0.935

* Con un 99% de confianza la ordenada no es significativa.

En el caso del derivado AGM1-CT los datos nos situarían en el tramo inicial de una curva michaeliana lo que implica un proceso de pseudo primer orden, que se produce, según las clásicas consideraciones de la cinética enzimática, cuando la concentración de sustrato empleada es mucho menor que K_m. Así, debido a que la concentración de donador de acilo empleada no satura en ningún momento al catalizador, el aprovechamiento del mismo es prácticamente óptimo. Pero por otra parte, el derivado AGU2-CT parece que se comporta de forma distinta saturándose pronto, obteniendo bajos valores de V_{max} y K_m aparentes.

IV.2.3.6.-Influencia de la concentración de nucleófilo en la síntesis peptídica

Como ocurrió con los derivados preparados con los soportes (PE/HEMA), se ha realizado un estudio variando la concentración de nucleófilo (H-L-Leu-NH₂) desde 5 mM hasta 50 mM, manteniendo fija la concentración de BTEE en 10 mM, empleando los derivados AGU2-CT y AGM1-CT en un medio AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 97/3, (v/v). Los resultados aparecen representados en las **Figura 80 y 81** y en la **Tabla 41**; mientras que la **Figura 81** recoge una gráfica de la variación de velocidad inicial de la síntesis péptidica frente a la variación de la concentración de nucleófilo, en la **Figura 80** se representan las curvas de progreso en el transcurso de la reacción con los derivados AGU2-CT y AGM1-CT para 5, 10 y 50 mM de L-leucinamida.

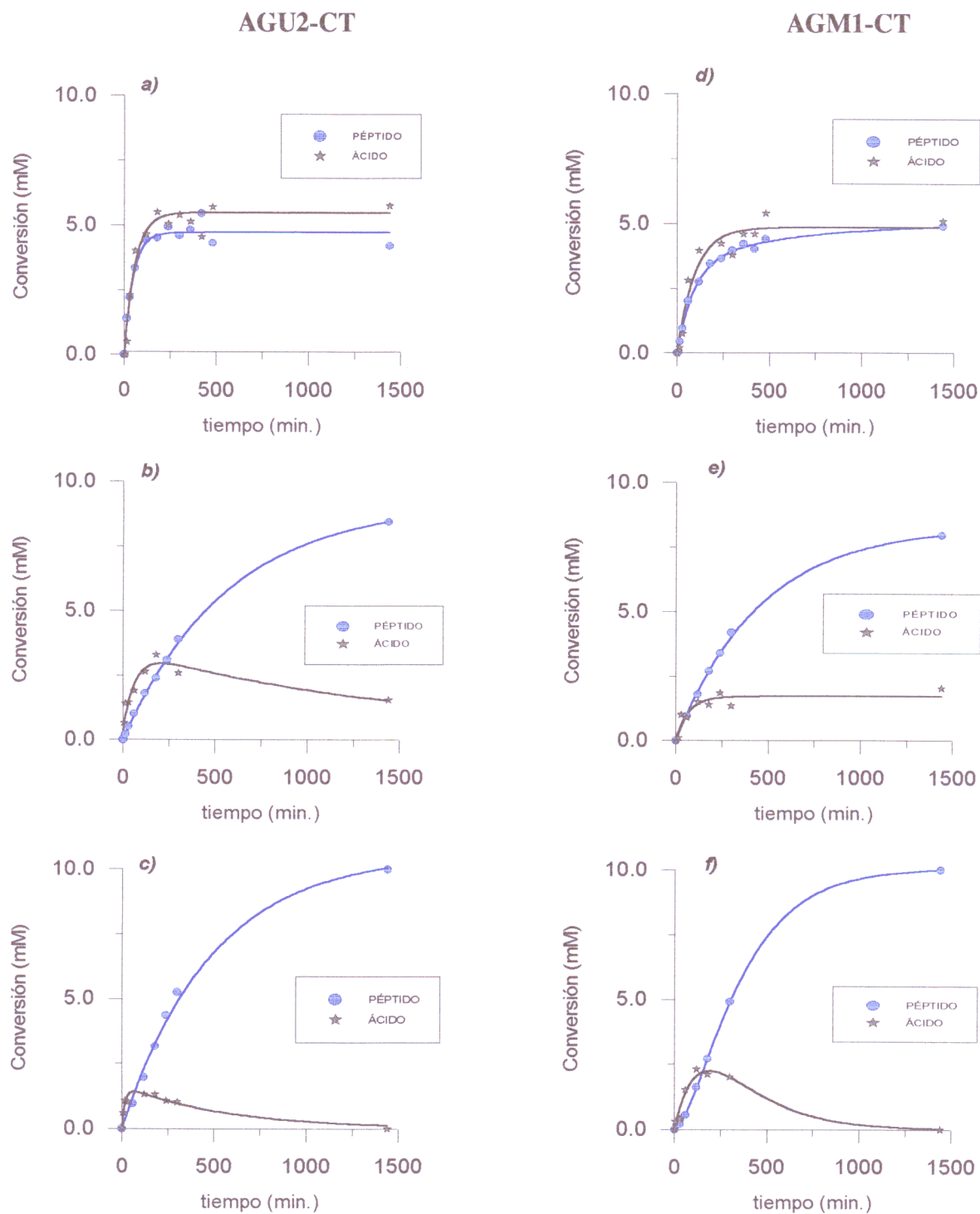


Figura 80.- Síntesis del dipéptido Bz-*L*-Tyr-*L*-Leu-NH₂, empleando 8.85 mg de derivado/ml (0.076 mg de enzima/ml), en un medio AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M 97/3, (v/v) a diferentes concentraciones de nucleófilo. Para el derivado AGU2-CT a) 5 mM; b) 10 mM y c) 50 mM. Para el derivado AGM1-CT d) 5 mM; e) 10 mM; f) 50 mM.

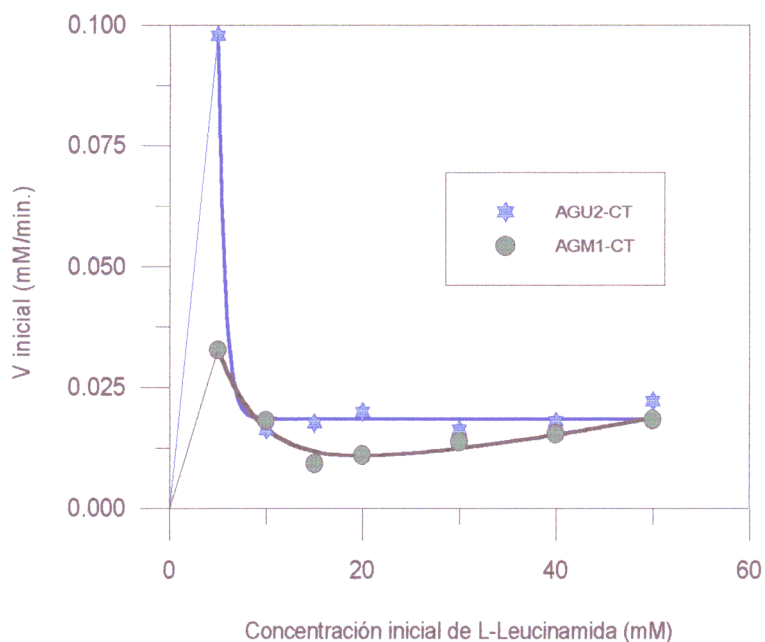


Figura 81.- Variación de la velocidad inicial de síntesis del dipéptido Bz-*L*-Tyr-*L*-Leu-NH₂, en función de la concentración de nucleófilo (40 mM) empleando los derivados AGU2-CT y AGM1-CT (8.85 mg de derivado/ml equivalentes a 0.24 mg de enzima/ml) y como medio de reacción AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M 97/3, (v/v).

Se pudo comprobar cómo el nucleófilo actúa en todo el intervalo de concentraciones como un inhibidor, según se observa en la **Figura 81**, pues al aumentar la concentración de *L*-leucinamida la velocidad inicial de síntesis disminuye. A diferencia de lo que sucedía con los derivados obtenidos sobre soportes poliméricos en los que el comportamiento del nucleófilo era función de su concentración en la reacción (**Ver Figura 52**).

Esta evidente diferencia que existe entre ambos derivados es debida a la composición de los soportes y a la solubilidad que presenta el nucleófilo ($\log P = -0.21$) (159) en el microentorno de la enzima. Así, los derivados preparados con geles de agarosa (con $\approx 89\%$ de agua en su composición como ya hemos comentado), poseen en sus inmediaciones prácticamente todo el agua presente, por lo que la mayoría del nucleófilo se encontrará en las inmediatas proximidades de la enzima.

Esta saturación del microentorno con H-*L*-Leu-NH₂ dificulta el acceso del donador de acilo al subsitio ρ_2 ("ar") del centro activo, creándose una competencia entre el nucleófilo y el donador de acilo.

Tabla 41.- Influencia de la variación de la concentración de nucleófilo en la síntesis del dipéptido modelo Bz-L-Tyr-L-Leu-NH₂, empleando AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 97/3, (v/v) como medio de reacción a una concentración constante de 10 mM de BTEE, y con 8.85 mg de derivado/ml equivalentes a 0.076 mg de enzima/ml.

Ent.	[H-L-Leu-NH ₂] (mM)	t (h.)	% Péptido	% Ácido	V. Ini. ^a	Pép./Áci.
1 Derivado AGU2-CT						
1a	5	6	48	52	0.098	0.9
1b	10	24	85	15	0.016	5.7
1c	15	24	99	1	0.018	99.0
1d	20	24	96	4	0.020	24.0
1e	30	24	98	2	0.016	49.0
1f	40	24	99	1	0.018	99.0
1g	50	24	99	1	0.022	99.0
2 Derivado AGM1-CT						
2a	5	24	49	51	0.032	1.0
2b	10	24	80	20	0.018	4.0
2c	15	24	91	9	0.009	10.1
2d	20	24	80	20	0.011	4.0
2e	30	24	72	22	0.014	3.3
2f	40	24	96	4	0.015	24
2g	50	24	99	1	0.018	99

^a Velocidad inicial de síntesis de péptido, expresada en mM/min.

Este hecho viene corroborado por la obtención de la máxima velocidad inicial de síntesis peptídica en la mínima concentración de nucleófilo (Tabla 41 entradas 1a y 2a).

Observando el aspecto de las curvas de progreso obtenidas (Fig. 80 c, f), puede

apreciarse la presencia de procesos de síntesis bajo control termodinámico, con los porcentajes más elevados de nucleófilo, como se deduce de la desaparición del ácido formado en dichas condiciones (**Fig. 80 f**).

Realizando un estudio similar al llevado a cabo por Jakubke y cols (145) para conocer la afinidad del nucleófilo por el catalizador, se representaron como en el caso de los derivados de α -quimotripsina inmovilizada sobre copolímeros, la relación ácido/péptido en función del logaritmo Neperiano de un cociente de concentraciones de nucleófilo (**Sección IV.1.5.7**), para obtener el parámetro de afinidad nucleófilo-biocatalizador. Pero al igual que sucedía con los derivados inmovilizados sobre copolímeros de injerto los derivados AGU2-CT y AGM1-CT no muestran ningún comportamiento lineal, debido a la presencia de la reacción termodinámica.

IV.2.4.- REACCIONES DE SÍNTESIS DE PÉPTIDOS TERMODINÁMICAMENTE CONTROLADAS

En el apartado anterior se ha justificado la disminución del ácido producido en la reacción en condiciones 97/3, (v/v) medio orgánico fase acuosa, con un exceso de uno de los sustratos (nucleófilo), atendiendo a la posible existencia de una reacción en la que el ácido fuese el sustrato (Síntesis Termodinámicamente Controlada) (Introducción, **Sección I.1.4**). Para corroborar nuestra teoría, se realizaron ensayos con los derivados AGU2-CT y AGM1-CT (8.85 mg de derivado/ml, equivalentes a 0.076 mg/ de enzima/ml), en condiciones en las que el único donador de acilo presente fuese el ácido. Para ello, se empleó como sustrato la N-acetil-*L*-tirosina (Ac-*L*-Tyr-OH), tal y como se reseñó en la Parte Experimental (**Sección III.7.3**). Los resultados quedan reflejados en la **Figura 82** en la cual podemos observar la síntesis de aproximadamente un 50% de dipéptido Ac-*L*-Tyr-*L*-Leu-NH₂ en estas condiciones, tal y como ocurría con los derivados de α -quimotripsina inmovilizada sobre copolímeros (PE/HEMA) de injerto (48% de dipéptido en 240 minutos) (**Sección IV.1.6**).

Como puede verse en la **Fig. 82** existe un periodo de inducción de aproximadamente 500 minutos, en el cual no se produce la aparición apreciable de péptido en ninguno de los dos procesos biocatalizados con el derivado unipuntual ó multipuntual.

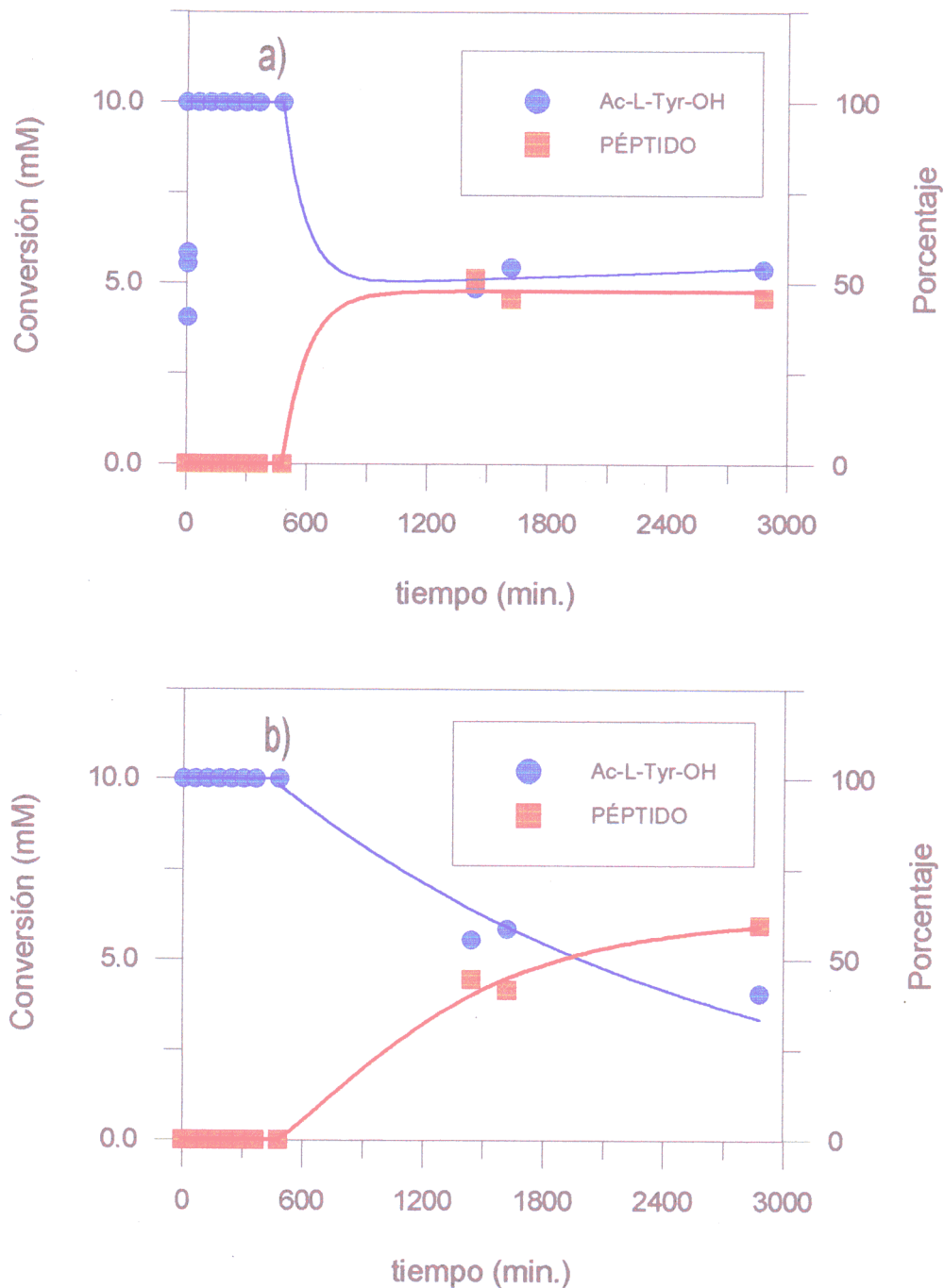


Figura 82.- Síntesis del dipéptido Ac-*L*-Tyr-*L*-Leu-NH₂, bajo control termodinámico, empleando el ácido Ac-*L*-Tyr-OH (10 mM) como donador de acilo y *L*-leucinamida (50 mM) como nucleófilo; medio de la reacción: AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 97/3, (v/v) a) 8.85 mg del derivado AGU2-CT/ml (0.076 mg de enzima); b) 8.85 mg del derivado AGM1-CT/ml (0.076 mg de enzima).

Numerosos ensayos demuestran que la naturaleza del soporte influye en el comportamiento de los derivados enzimáticos en la síntesis termodinámicamente controlada (206, 217, 274). Mientras que empleando los derivados obtenidos sobre los geles de agarosa como soportes se necesita un periodo de inducción muy largo, los derivados inmovilizados obtenidos empleando copolímeros como soportes catalizan la síntesis de péptidos ya desde el principio, llegando a un máximo del 48% en péptido en 4 horas y posteriormente disminuyendo hasta un 20% después de 48 horas, tal y como se indicó en la **Sección IV.1.6**.

Este comportamiento puede atribuirse al diferente carácter de los soportes (hidrófilo para la agarosa e hidrófobo para los copolímeros), y al pH de la fase acuosa (pH=9.0). Este elevado pH hace que el ácido se encuentre fundamentalmente en su forma aniónica, inerte, en la fase acuosa (**Esquema 18**) (**Sección I.4.3.1**). Según esto, la especie más hidrófila e inerte (forma aniónica) está cerca del derivado inmovilizado sobre agarosa (hidrófilo), mientras que una pequeña cantidad de forma sin ionizar y activa en este tipo de síntesis (forma -COOH, más lipóide) se encuentra en el disolvente lejos del derivado. Ello justifica la presencia de un período de inducción en este caso, que corresponde al proceso de difusión de la forma no ionizada hacia el derivado inmovilizado sobre agarosa. A medida que comienza la reacción, el equilibrio de la síntesis termodinámica se desplaza a la derecha (**Esquema 17**) (**Sección I.4.2**) y la reacción progresa.

Este periodo de inducción no se observa en los derivados enzimáticos inmovilizados sobre soportes poliméricos (lipóides) que atraen a la forma sin ionizar (activa) y repelen a la ionizada (inactiva).

Como ya hemos comentado en la (**Sección I.4.3.1**) es fundamental el pH en este tipo de reacciones ya que existe un grupo ácido -COOH (donador de acilo) y un residuo básico -NH₂ (nucleófilo) capaces de ionizarse en función del pH. Así pues, debemos optar por una situación de compromiso: por un lado, si el pH es ácido el donador de acilo estará protonado (forma no iónica, activa), pero el nucleófilo también estará protonado (NH₃⁺, inactivo); en cambio, si el pH es alcalino sucede a la inversa: el nucleófilo se encuentra en forma no ionizada (activa) y el donador de acilo desprotonado (inactivo). Por lo tanto, hay que tener en cuenta los pKs de los sustratos y emplear un pH en el cual la concentración de las formas no iónicas sea máxima, lo que generalmente implica un pH próximo a la neutralidad.

IV.3.- SUSTRATOS NO NATURALES

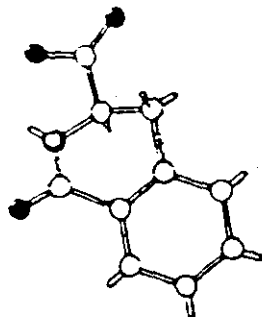
IV.3.1.- INTRODUCCIÓN

Para poder comprender los resultados obtenidos con los sustratos no naturales ensayados, empleando la enzima libre y nuestros derivados inmovilizados, se completará en primer lugar lo expuesto en la Introducción General sobre la selectividad de la α -quimotripsina (Sección I.3.4) con algunos ejemplos que ilustren el tema.

IV.3.1.1.- Sustratos cíclicos derivados de 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina

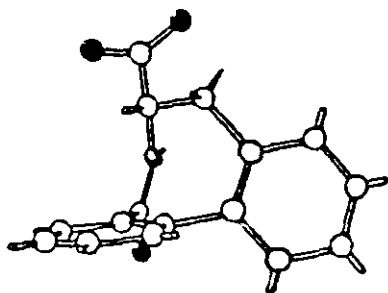
Niemann, Cohen y cols. han estudiado una serie de sustratos cíclicos de α -quimotripsina de especial interés dado que su rigidez estructural permite visualizar mejor el complejo acil-enzima. El 1-oxo-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxilato de metilo fue el primer sustrato de esta serie descrito (Esquema 32, a) (275). La enzima presenta una gran especificidad por los estereoisómeros *D*, puesto que se ha comprobado que para ellos el valor de K_m es 25 veces menor y el de k_{cat} es 200 veces mayor que para la *L*-fenilalanina (105). Más tarde, se vió que la amida cíclica que se une al carbono- α se podía reemplazar por un resto éster sin perjudicar la elevada reactividad del sustrato (276), y se dedujo que este grupo no se situaba en el lugar normal "am" destinado al grupo acilamido. Considerando la teoría de la disposición tetraédrica del lugar de enlace, la conclusión más razonable es que la zona aromática de la isoquinolina debe situarse en el lugar "ar" y el éster metílico se sitúa en el lugar "n", para lo cual los sustratos *D* fuerzan al enlace de la amida cíclica o del éster a situarse en el lugar "h" (276). Esto es mucho más fácil de entender cuando se considera que el lugar "h" no tiene un volumen restringido sino que es un lugar de compresión intramolecular. En los Esquemas 32a y 32b se compara la posible conformación de la isoquinolina con la deducida para el N-formil-*L*-triptófano y se ve que son muy semejantes (18). El anillo de isoquinolina se acomoda muy fácilmente ya, que apunta hacia la parte más alejada de la superficie de la enzima.

a)



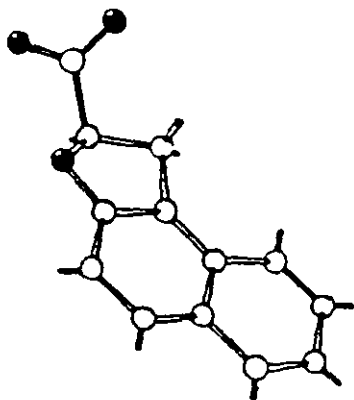
Ácido *D* (-) 1-oxo-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolína-3-carboxílico

c)



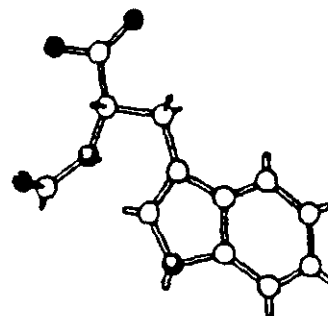
2,2'-bifenilo análogo de benzoyl-*L*-fenilalanina

e)



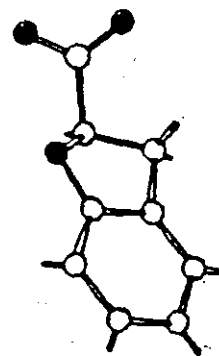
D-1,2-dihidronaftol[2,1-*b*]furano-2-carboxílico

b)



N-formil-*L*-triptófano

d)



Acido *D*-hidrocumarílico

Esquema 32.- Sustratos cíclicos derivados de la 1-oxo-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina.

El **Esquema 32c** muestra un bifenilo con una unión hidrocarbonada, de estereoquímica análoga a la de *L*-fenilalanina. El éster metílico de este compuesto se describió como un buen sustrato para la α -quimotripsina (277), ya que los grupos β -fenilo y carboxilo encajan en el centro activo adoptando una conformación muy similar a la postulada para el triptófano basándose en los datos cristalográficos.

Estos sustratos sugieren que la conformación exacta de los enlaces lábiles amido o éster en relación con la forma que adopta el resto de la molécula en el centro activo determinará la reactividad de un determinado isómero. La teoría de Niemann y Cohen de la estructura tetraédrica del centro activo de la α -quimotripsina en torno al carbono quiral explica la estereoespecificidad por los sustratos *L*. La aparente contradicción que provocaba la *D*-especificidad para el 1-oxo-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxilato de metilo se resuelve cuando se considera la forma general de la molécula del sustrato.

La rigidez de este sustrato hace que la interacción "am" no sea necesaria porque la interacción "ar" mantiene toda la molécula del sustrato en una orientación bastante rígida y definida. La cuestión crucial es saber si el grupo hidrolizable (representado en el **Esquema 32** por el grupo éster apuntando hacia la izquierda) está colocado en la orientación correcta para la catálisis. Puesto que no hay un lugar específico de enlace en el centro activo para los carbonos α y β de la cadena lateral, éstos pueden adoptar tanto la configuración *L* como la *D*, dependiendo de la geometría de los grupos.

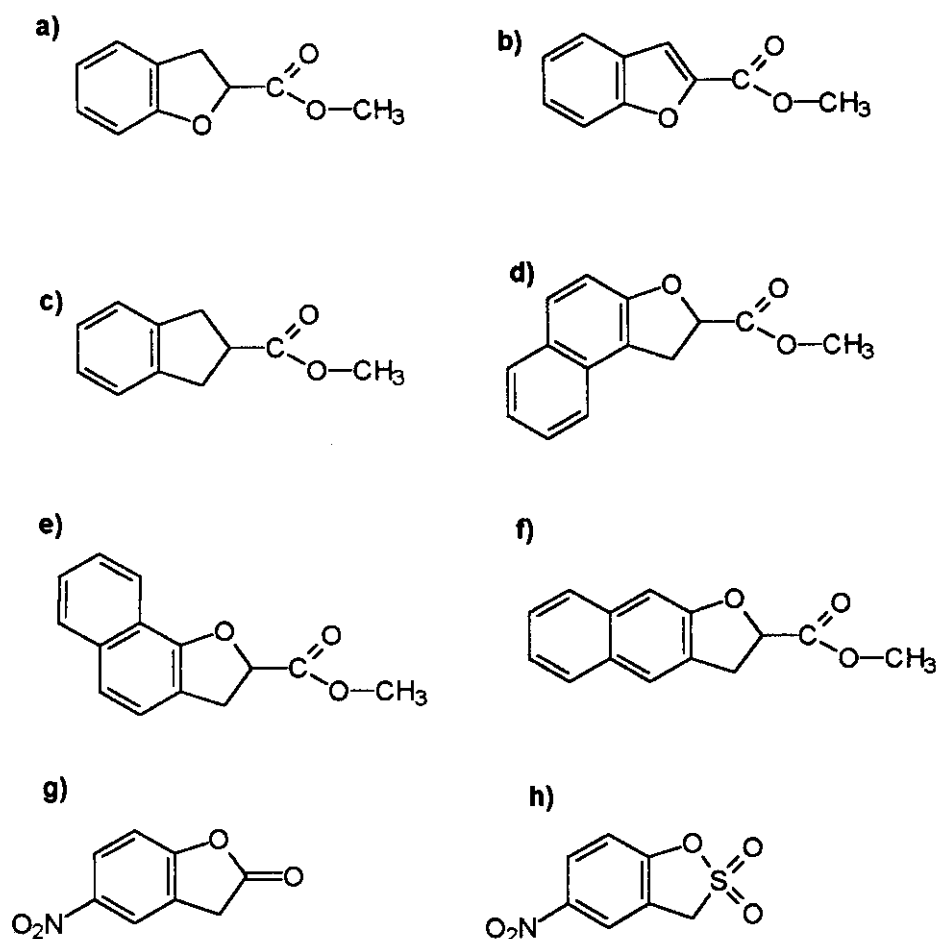
Debido a la existencia de un anillo de tetrahidroisoquinolina esta estructura se debe analizar según la disposición en axial o ecuatorial del grupo éster con respecto al anillo, observando como el isómero *R* en ecuatorial es similar a los sustratos naturales que reconoce la enzima (**Fig. 88 y 89**) (Sección IV.3.2.3).

IV.3.1.2.- Sustratos cíclicos con estructura de hidrocumarilatos

Los derivados del ácido cumárico son otros sustratos cíclicos modelo (**Esquema 33**) (278). En estos sustratos, el carbono asimétrico forma parte de un anillo pentagonal de cumarina (279). Para este compuesto, existe una serie de conformaciones posibles variando desde una donde el grupo éster está casi ecuatorial, hasta otra en que está casi axial. El

dihidrocumarilato de metilo como sustrato de la α -quimotripsina presenta cierta *D*-estereoespecificidad. Como se muestra en el **Esquema 32d**, el estereoisómero *D* puede adoptar una configuración semejante a la propuesta para el 1-oxo-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxilato de metilo. En esta conformación, el carbono carboxílico se coloca casi en el mismo plano que el anillo hexagonal. Parecería igualmente razonable que el isómero *L* se colocara en una conformación similar, en la cual la molécula completa ha rotado, es decir, el grupo $-\text{CH}_2-$ y el $-\text{O}-$ del anillo pentagonal han variado su posición. Sin embargo, esto significaría que el puente de oxígeno se colocaría en una posición inaccesible para la enzima, mientras que el isómero *D* presenta el anillo y el grupo éster en el mismo plano. Esto podría ser una contribución adicional para la distorsión del anillo asimétrico de cumarina. Además los diferentes ángulos de enlace de los $-\text{O}-$ y $-\text{CH}_2-$ darán una orientación ligeramente diferente al grupo éster dentro del centro activo. Todas estas influencias provocan la observada y ligera *D*especificidad. (Las constantes de enlace son semejantes, pero $(k_{\text{cat}})_D/(k_{\text{cat}})_L = 83$ (280)). Ello explica porqué el cumarilato de metilo (**Esquema 33b**) no es hidrolizado por la α -quimotripsina debido a su rigidez y el Indano-2-carboxilato de metilo (**Esquema 33c**) es un sustrato enzimático muy pobre al carecer del átomo de oxígeno (278).

La información más precisa acerca de estos sustratos cíclicos no naturales procede del estudio de una serie de naftalenos homólogos del dihidrocumarilato, en los cuales se ha fusionado un segundo anillo hexagonal al primer anillo bencénico en cada una de las tres posibles posiciones (**Esquema 33d, 33e, 33f**) (280). El estereoisómero *D* (**Esquema 33d**) representado también en el (**Esquema 32e**) es un buen sustrato y presenta una estereoespecificidad muy elevada. La analogía estructural con el triptófano es evidente (280). Debido a la asimetría de la molécula, los efectos estereoquímicos de las diferentes partes del sustrato sobre las constantes cinéticas de esta serie de compuestos pueden separarse, desarrollado así un estudio muy pormenorizado. En el **Esquema 33e** se representa un sustrato pobre con una estereoespecificidad insignificante, mientras que el sustrato *D,L* (**Esquema 33f**) es inerte a la α -quimotripsina. La posición del puente de oxígeno parece ser un factor muy importante a la hora de determinar la reactividad.



Esquema 33.- Sustratos cíclicos derivados de los hidrocumarilatos

IV.3.1.3.- Sustratos cíclicos derivados de sultona

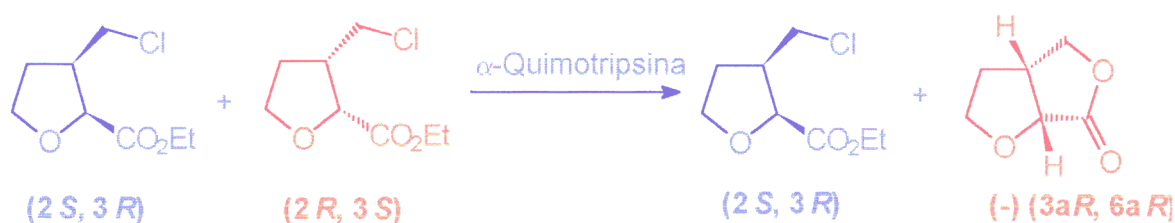
Otro tipo de sustratos rígidos planos son las sultonas y diversas lactonas estudiadas por Kaiser *y cols.* (281, 282) (**Esquema 33g y 33h**). En estas moléculas, el enlace que se va a romper forma parte de un anillo pentagonal que debe ser coplanar con el anillo aromático que va a encajarse en el subsitio "ar". Aunque estos sustratos planos encajan en el modelo cristalográfico de α -quimotripsina de un modo bastante convincente, la forma de las moléculas no es como la propuesta en el **Esquema 32b** y la estereoquímica de la interacción es notablemente diferente a la atribuida a un buen sustrato natural.

IV.3.1.4.- Resolución enantiomérica de compuestos racémicos empleando α -quimotripsina: Aplicaciones

La elevada estereoespecificidad de la α -quimotripsina se ha aprovechado para llevar a cabo la resolución de ésteres o amidas racémicas. Estos resultados han permitido obtener también una información importante a la hora de estudiar la interacción de la enzima con los sustratos no naturales. Existen numerosos ejemplos de este tipo de reacciones, por lo que sólo nos detendremos en las más relevantes (175, 283-289)

IV.3.1.4.1.- Sustratos derivados del tetrahydrofurano

El ejemplo más sencillo lo constituyen los derivados del ácido (*R,S*) tetrahydrofurano-2-carboxílico. Estos sustratos carecen tanto del grupo -CO-NH- (presente en los sustratos convencionales: BTEE) como del anillo aromático. No obstante, se ha comprobado que la α -quimotripsina es capaz de hidrolizar, con altos excesos enantioméricos, el *cis* (2*R*, 3*S*) 3-clorometil-tetrahydrofurano-2-carboxilato de etilo, mientras que el isómero *cis* (2*S*, 3*R*) y los otros dos esteroisómeros *trans* permanecen sin transformarse (283).



Esquema 34.- Reacción de hidrólisis del 3-clorometil-2-tetrahydrofurano-carboxilato de metilo y formación de una lactona bicíclica.

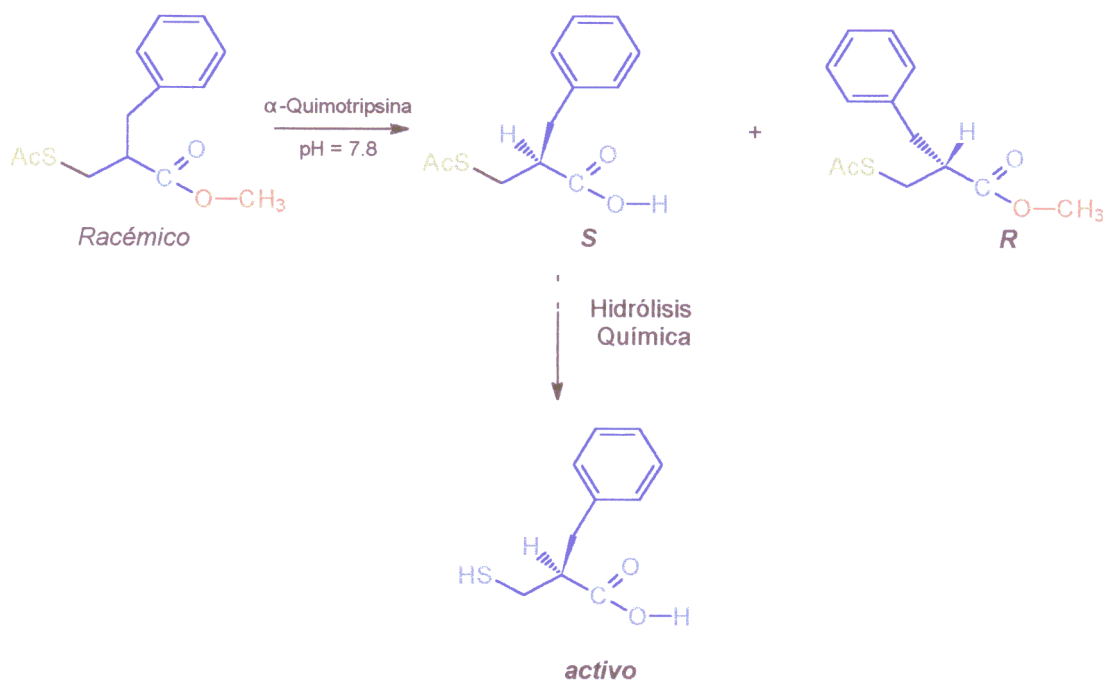
Estos resultados indican que ni el anillo aromático ni el grupo amido parecen ser indispensables para el acto catalítico. Sobre este punto volveremos más adelante, para explicar algunos resultados de la presente Memoria.

IV.3.1.4.2.- Sustratos derivados del ácido 2-bencil-3-mercaptopropiónico

Conociendo la estereoespecificidad de la α -quimotripsina hacia los aminoácidos de la serie *L* (105), se pensó emplearla para la obtención del ácido (*S*) 3-acetiltio-2-bencilpropiónico a partir de una mezcla racémica del correspondiente éster metílico, y obtener en solo tres pasos un inhibidor de la carboxipeptidasa A (CPA) ópticamente activo, mucho más potente que la mezcla racémica (284). La reacción de hidrólisis está descrita empleando tampón fosfato de pH=7.8 durante 12 horas (**Esquema 35**).

De esta manera se puede obtener el isómero *S* en forma de ácido, manteniéndose intacto el éster *R*. La pureza enantiomérica se determinó por RMN empleando $\text{Eu}(\text{hfc})_3$, resultando superior al 98%.

Posteriormente, las actividades inhibitorias (K_i) de ambos isómeros sobre la carboxipeptidasa A fueron determinados y sólo el isómero *S* fue activo, obteniéndose $K_i = 7.8 \times 10^{-9}$ M, mientras que para la mezcla racémica fue $K_i = 1.1 \times 10^{-8}$ M. El isómero *R* puro resultó ser inactivo como inhibidor.



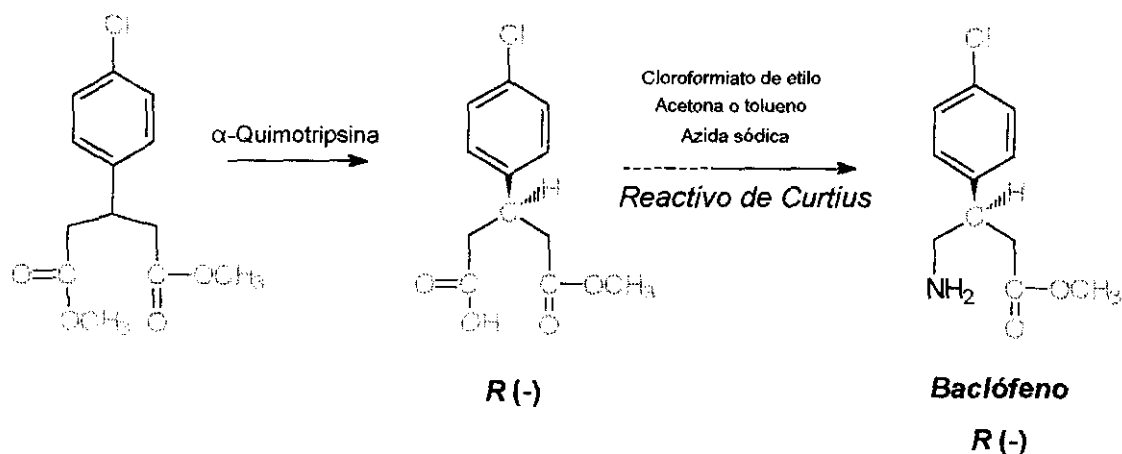
Esquema 35.- Reacción de hidrólisis enzimática del éster (*R,S*) 3-acetiltio-2-bencilpropionato de metilo.

Independientemente de su interés práctico, este proceso puso de manifiesto la elevada quimioselectividad de la α -quimotripsina hacia un grupo éster de estructura relacionada con el ácido 3-fenilpropiónico, en presencia de un enlace lábil como es el grupo tioéster, en condiciones clásicas de síntesis. Ello se debe atribuir a que la α -quimotripsina reconoce preferentemente estructuras "semejantes" a la fenilalanina en lugar de ésteres pequeños tipo acetato.

IV.3.1.4.3.- Sustratos con un centro proquiral. Síntesis de baclófeno.

La síntesis de baclofeno, agonista del GABA cuya actividad esta relacionada con el isómero **R** (-), se ha llevado a cabo satisfactoriamente gracias a la enantioselectividad que presenta la α -quimotripsina, la cual se empleó en la hidrólisis de un diéster con un centro proquiral, como el 3-(4-clorofenil)-glutarato de dimetilo, para dar el monoéster, ópticamente activo.

Se probaron varias enzimas, pero la α -quimotripsina, en medio acuoso, fue la que condujo a los mayores rendimientos, obteniéndose un 85% del monoéster quiral **R** y un $ee > 97\%$ (285).



Esquema 36.- Cuarto paso en la síntesis de baclofeno. Hidrólisis del diéster 3-(4-clorofenil) glutarato de metilo.

IV.3.4.1.4.- Resolución enantiomérica de diferentes aminoácidos racémicos.

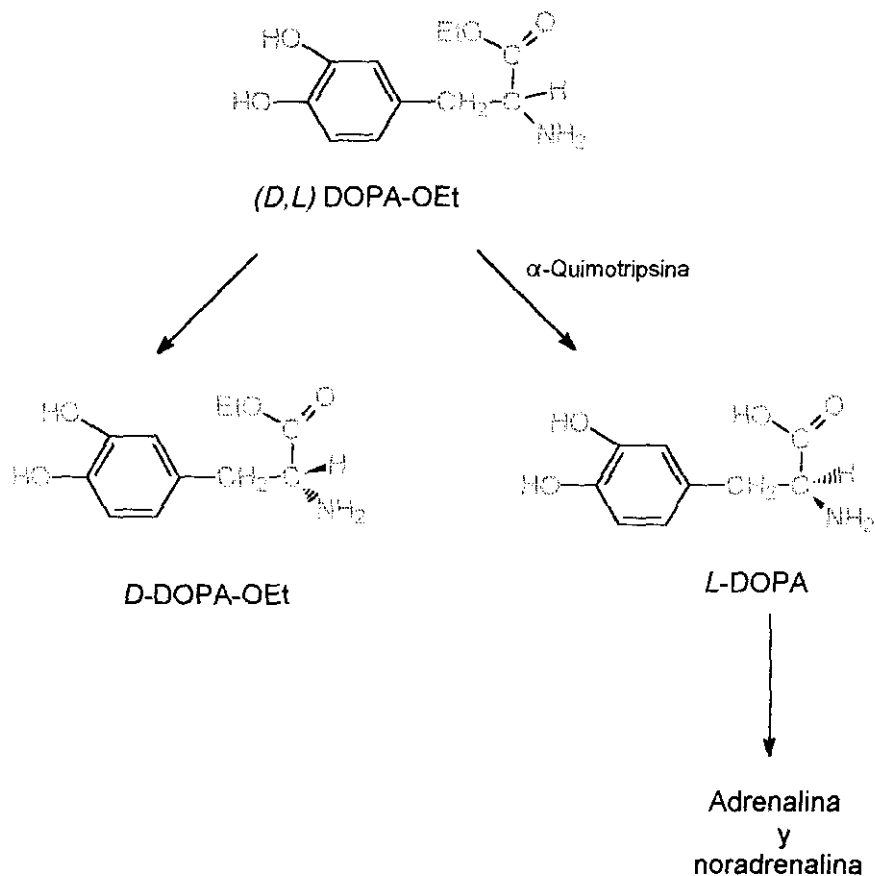
La resolución de mezclas racémicas de aminoácidos ha permitido abaratar los precios de los aminoácidos *D* o *L* enantioméricamente puros. En la **Tabla 42** (175) se resumen los resultados obtenidos en la hidrólisis de mezclas racémicas de varios aminoácidos, empleando α -quimotripsina en acetonitrilo con un 10 % de agua, como catalizador quiral.

Puede apreciarse que los mejores resultados se obtienen con aminoácidos aromáticos, destacando la *L*-DOPA (molécula de gran interés en la terapéutica del Parkinson, (**Esquema 37**), (175, 286, 287).

Tabla 42 .- Resolución de ésteres etílicos de aminoácidos, empleando α -quimotripsina (5 mg) en acetonitrilo/agua (9/1), volumen total = 20 ml y T= 30 °C.

Aminoácido	Rendimiento	e.e./%	<i>E</i>
Tirosina	48	>99	>646
Fenilalanina ^b	46	87	32
Triptofano	43	92	50
Alanina	9	80	10
Valina ^b	5	--	--
Leucina	5	86	14
Treonina ^b	0	--	--
p-Clorofenilalanina	3	82	10
DOPA	50	>99	>1060
Fenilglicina	9	84	12
Ácido 2-aminobutanóico	10	--	--
Ácido 2-aminopentanóico	7	67	5
Ácido 2-aminohexanóico	7	--	--

^b Ester metílico.

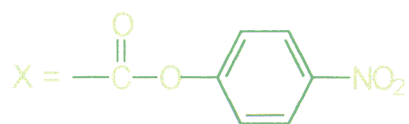
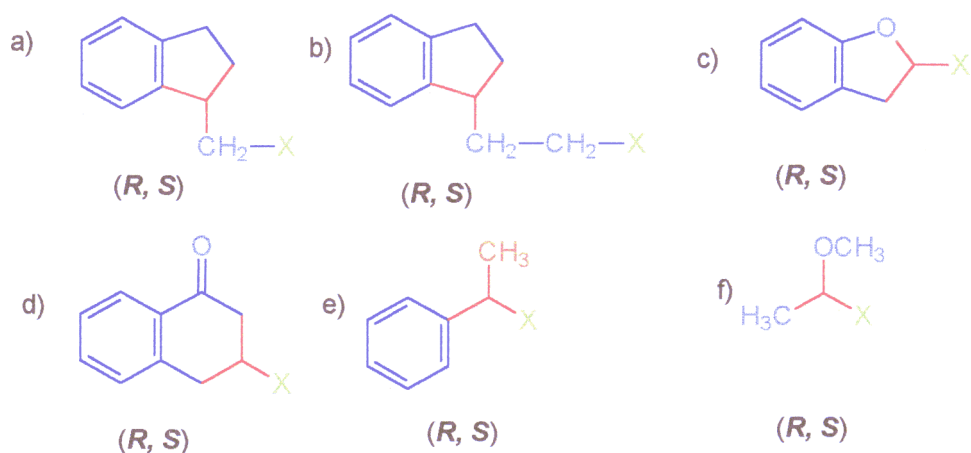


Esquema 37.- Reacción de obtención de *L*-DOPA.

IV.3.4.1.5.- Estudio de las velocidades de deacilación de los dos isómeros de diferentes ésteres de *p*-nitrofenilo con α-quimotripsina

Un ensayo típico de determinación de la estereoselectividad de la α-quimotripsina se ha realizado estudiando la hidrólisis de diferentes ésteres de *p*-nitrofenilo dada la facilidad de seguimiento de reacción en un espectrofotómetro de Ultravioleta-Visible.

En el esquema **Esquema 38** aparecen las estructuras de los diferentes ésteres objeto de estudio:



Esquema 38.- Ésteres de p-nitrofenilo

Tabla 43.- Velocidades de deacilación de diferentes ésteres de p-Nitrofenilo.(288)

Sustrato	Velocidad de deacilación (mM/min.)	V(R)/V(S)
a(R)	1.9×10^{-3}	0.032
a(S)	5.9×10^{-2}	
b(R)	5.2×10^{-3}	0.012
b(S)	4.4×10^{-1}	
c(R)	12	100
c(S)	1.2×10^{-1}	
d(R)	8.4×10^{-2}	2.2
d(S)	3.8×10^{-2}	
e(R)	2.0×10^{-4}	0.08
e(S)	2.4×10^{-3}	
f(R)	1.0×10^{-1}	14
f(S)	7.3×10^{-3}	

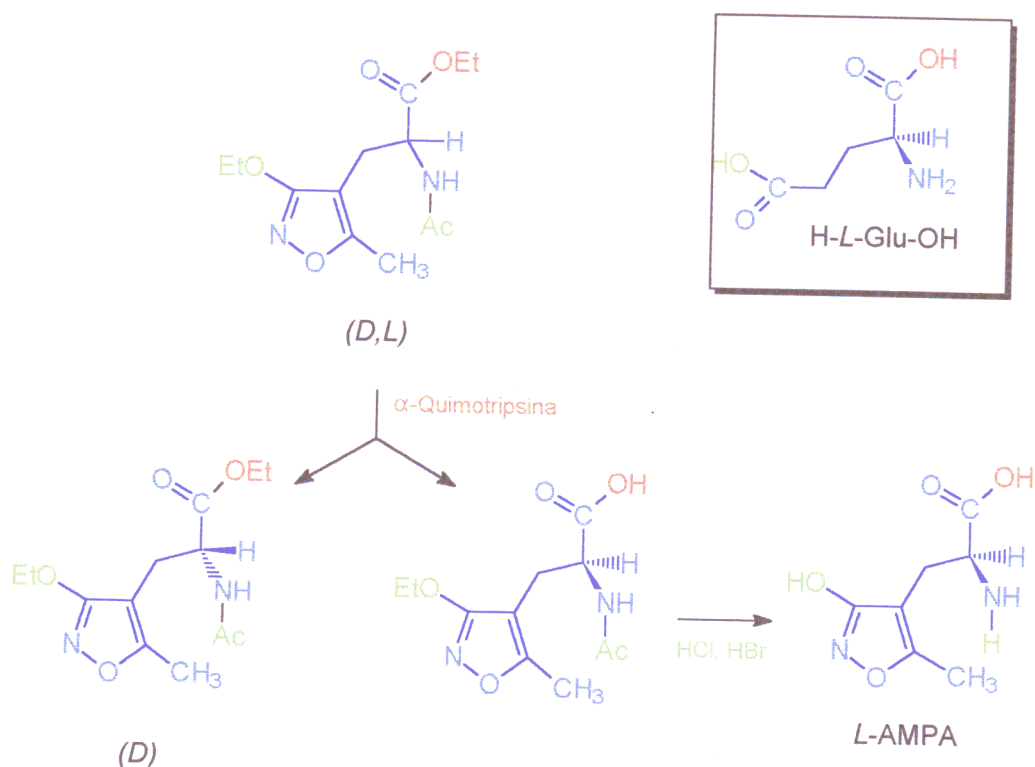
En la **Tabla 43** se observan las diferencias en las velocidades de deacilación de los distintos pares de isómeros, siendo más elevada la velocidad de deacilación para el isómero *S* en el caso de a, b, e, mientras que en los otros tres casos ocurre lo contrario.

Esto indica la importancia de las interacciones con el centro activo, de los sustituyentes del centro estereogénico.

IV.3.4.1.6.- Sustratos relacionados con el H-L-Glu-OH

Se ha sintetizado un análogo del H-L-Glu-OH, el L-AMPA [ácido 2-amino-3-(3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-il) propiónico], diferenciándose del primero por la sustitución del grupo γ -carboxilato por un anillo de isoxazol. Este compuesto es muy útil en procesos de transmisión nerviosa, presentando el isómero *S* (*L*) mayor actividad.

Se han empleado varias enzimas para resolver el paso más complicado de la síntesis del AMPA, como la aminoacilasa y la α -quimotripsina, obteniéndose con ésta última los mejores rendimientos (289).

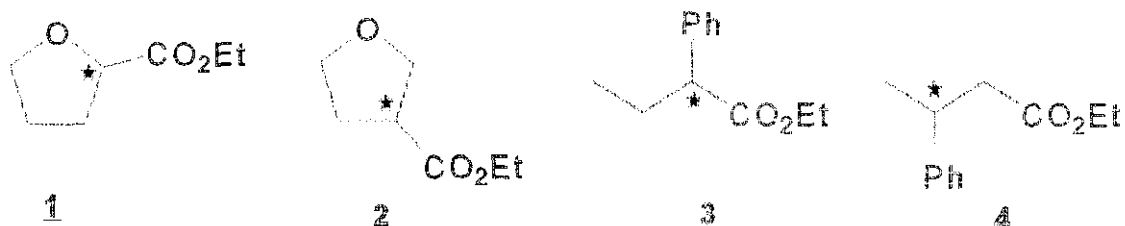


Esquema 39.- Síntesis de AMPA empleando α -quimotripsina.

Ello indica que la α -quimotripsina muestra una considerable estereoselectividad por los ésteres de α -aminoácidos N-acetilados, hidrolizando preferentemente el aminoácido de la serie L con un 99.9 % de e.e.

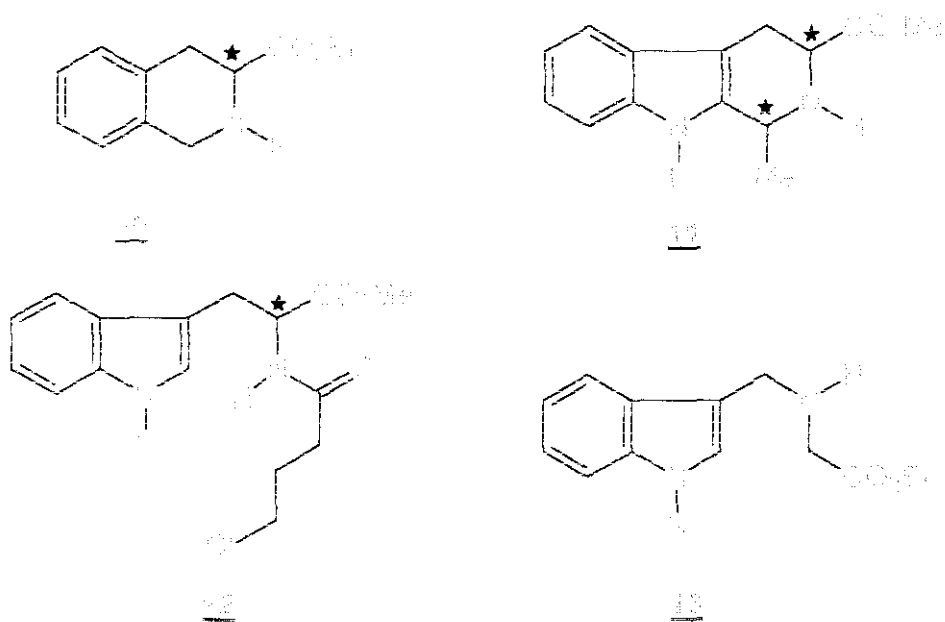
IV.3.2.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A fin de comprobar si los métodos de inmovilización sobre copolímeros y agarosa descritos en esta Tesis Doctoral alteran la estereoselectividad de la enzima inmovilizada con respecto a la enzima nativa, se procedió a comparar la actividad catalítica de la α -quimotripsina nativa e inmovilizada, tanto sobre agarosa (derivado AGM1-CT) como sobre el copolímero de injerto PE/HEMA (derivado C5-CT), frente a sustratos no naturales. Dado que el paso determinante del reconocimiento molecular por parte de la α -quimotripsina es la formación del complejo acil-enzima, se utilizaron ésteres de diversos ácidos como sustratos, sometiendo a procesos de hidrólisis enzimática (siguiendo la metodología descrita en la Sección III.8.2) los siguientes sustratos:



(11)

Ph = etilo,	config. R,	+
	config. S,	-
	(R+S),	±
Ph = benzilo,	(R+S),	±
Ph = hexamilo,	(R+S),	±



Esquema 40. Compuestos con grupos carboxialquilo en su estructura probados como sustratos para la α -quimotripsina

El análisis de los resultados obtenidos se ha realizado atendiendo a la estructura de los sustratos, los cuales han sido divididos en tres clases:

- 1) Sustratos que carecen de anillo aromático (compuestos 1 y 2)
- 2) Sustratos que poseen un resto fenilo en su molécula (compuestos 3 a 9).
- 3) Sustratos que presentan un nitrógeno en el carbono en α respecto al grupo carboxialquilo (compuestos 10, 11, 12 y 13),

IV.3.2.1.- Sustratos que carecen de un anillo aromático.

A lo largo de esta Memoria se han citado en numerosas ocasiones los requerimientos estructurales de los sustratos de la α -quimotripsina (Sección I.3.4). Como se ha indicado anteriormente, no es indispensable la presencia de un anillo aromático en el sustrato que actúa como donador de acilo en la síntesis de péptidos, ya que aminoácidos alifáticos, como la Mal-*L*-Leu-OBz, u otros con carga positiva, como Bz-*L*-Arg-OEt y Bz-*L*-Lys-OMe (252), son

capaces de ser reconocidos por la enzima como donadores de acilo.

Por otro lado, tampoco parece indispensable la presencia de un grupo -NH- en el carbono en α respecto del grupo carboxilo, ya que éste se puede sustituir por un grupo -O- como sucede en los diésteres analizados por Norin y cols (110).

Dado que Udding y cols. (283) describen la hidrólisis del *cis*-3-clorometil-tetrahidrofurano-2-carboxilato de etilo catalizada por la α -quimotripsina como un proceso altamente estereoselectivo hacia el isómero (2*R*, 3*S*) (Esquema 34) (Sección IV.3.1.4.1), Se procedió a realizar la hidrólisis de los sustratos más sencillos referidos a este compuesto, (*R,S*)-tetrahidrofurano-2-carboxilato de etilo (1) y (*R,S*)-tetrahidrofurano-3-carboxilato de etilo (2), empleando enzima nativa. Los resultados aparecen en la Tabla 44, donde se observa que no existe hidrólisis en ningún caso.

Tabla 44.- Resultados obtenidos en la hidrólisis de (1) y (2), empleando α -quimotripsina libre (0.25 mg/ml) como catalizador, [sustrato]= 50 mM, T= 25 °C.

Compuesto	Nombre	tiempo (h.)	% Acido
1	(<i>R,S</i>) tetrahidrofurano-2-carboxilato de etilo	52	0
2	(<i>R,S</i>) tetrahidrofurano-3-carboxilato de etilo	52	0

La comparación de las estructuras de los compuestos (1) y (2) con la del éster éflico de la *N*-benzoil-*L*-tirosina (BTEE), representada en la Figura 83, nos permite comprobar que sólo el isómero (*R*)-(1), posee una disposición espacial semejante del grupo carboxietilo y del -O- del resto de tetrahidrofurano a la del grupo carboxietilo y al -NH- del BTEE. No obstante este sustrato no conduce a reacción. Así pues, un sustrato no natural debe requerir además otros condicionamientos estéricos y electrónicos para ser sustrato de la α -quimotripsina. Estos requerimientos estructurales los podemos deducir de los resultados de Udding y cols. anteriormente mencionados, que indican que el (2*R*, 3*S*) 3-clorometil-tetrahidrofurano-2-carboxilato de etilo es sustrato de la enzima en estado nativo, no sucediendo lo mismo con el estereoisómero (2*S*, 3*R*).

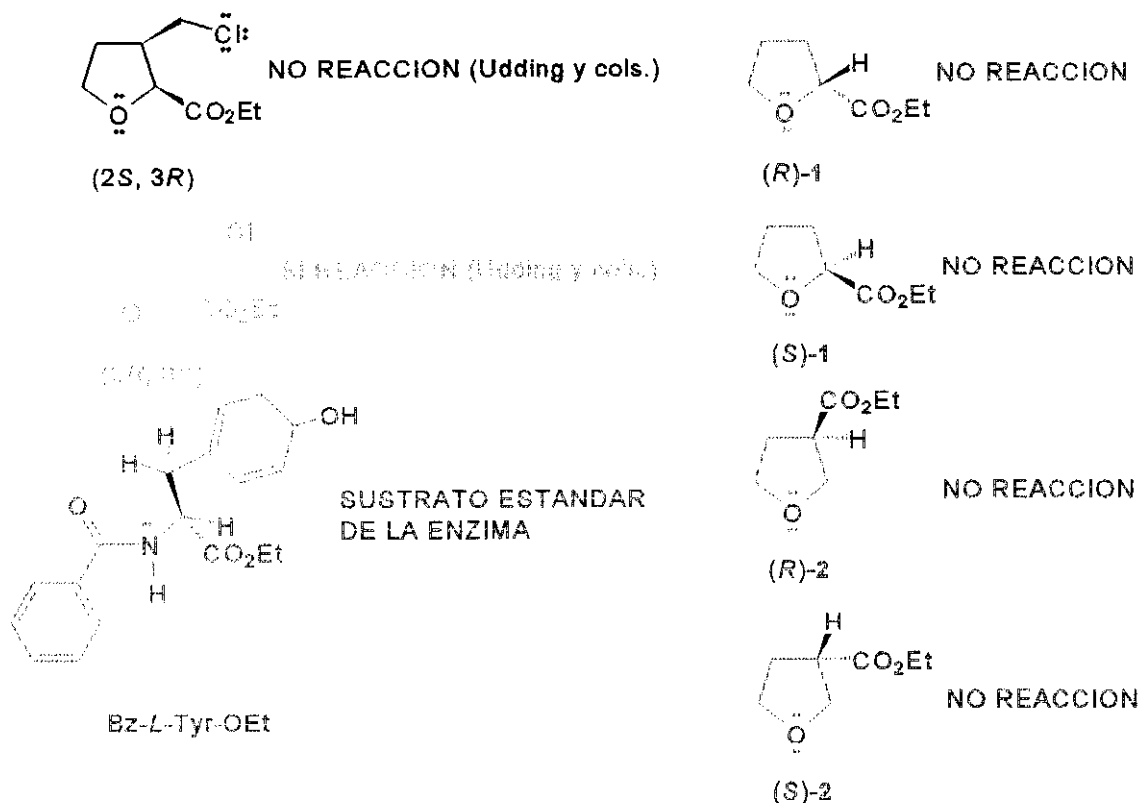


Figura 83. Comparación de la estructura de los sustratos **(1)** y **(2)** con el BTEE y los sustratos descritos por Udding *y cols.*

Comparando ambas estructuras con la del BTEE (**Fig. 83**) observamos como el isómero **(2R, 3S)** coloca el grupo $-\text{COOEt}$ y $-\text{O}-$ del anillo de tetrahydrofurano en la misma disposición relativa que ocupan los grupos $-\text{COOEt}$ y $-\text{NH}-$ en el BTEE. Por otra parte, el cloro, con su alta densidad electrónica, ocupa una posición análoga a la que ocupa el anillo de 4-hidroxifenilo, como se puede observar en los conformeros de mínima energía de estas moléculas, obtenidos mediante Dinámica Molecular (D.M.) empleando el programa de modelización Hyperchem y representados en la **Figura 84**.

Puede apreciarse en estas figuras que la distancia entre el carbono en *orto* del anillo aromático del 4-hidroxifenilo en el conformero de mínima energía del BTEE y el nitrógeno

es de 4.82 Å (**Fig. 84**), siendo esta distancia casi idéntica a la que existe en el isómero (**2R**, **3S**) del 3-clorometil-tetrahidrofurano-2-carboxilato de etilo entre el oxígeno del anillo heterocíclico y el cloro (4.32 Å). Algo similar sucede en la distancia existente entre el carbono en *orto* del anillo de 4-hidroxifenilo y el carbono del grupo carboxilato del BTEE (3.69 Å), y la que existe entre el cloro y el carboxilato en el citado isómero (3.73 Å).

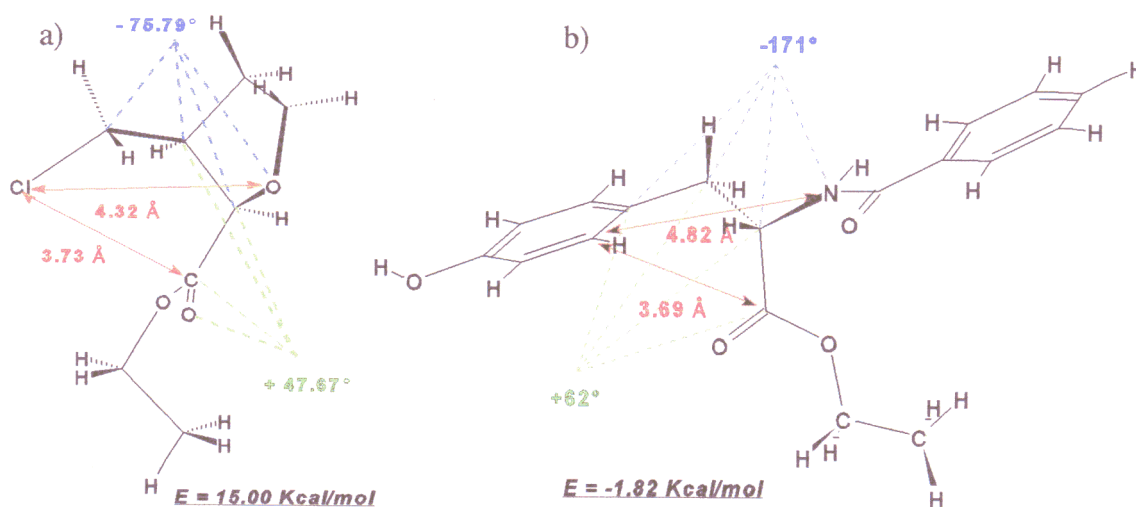


Figura 84. Comparación de la estructura del (**2R**, **3S**) 3-clorometil-tetrahidrofurano-2-carboxilato de etilo (a) y el BTEE (b)

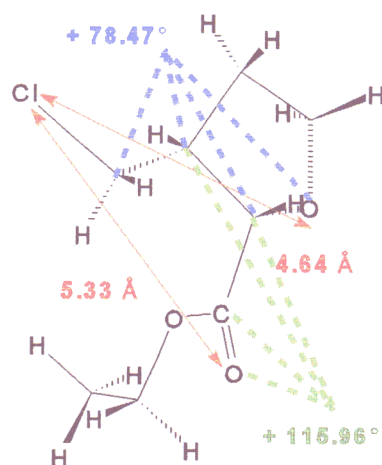
Por otro lado, los principales ángulos diedros de ambas moléculas, representados en la **Figura 84** muestran en ambos compuestos el mismo signo, lo cual nos lleva a postular similitudes geométricas entre el BTEE y el isómero (**2R**, **3S**) del 3-clorometil-tetrahidrofurano-2-carboxilato de etilo al existir giro libre en el BTEE alrededor del enlace $-(RHN)C^*(COOR)-CH_2-Ph(4-OH)$.

Estas analogías geométricas permiten explicar porqué los otros isómeros no condujeron a reacción enzimática a Udding y cols. (283). Ello se debe a que:

- i) El grupo $-COOEt$ no tiene la posición adecuada, configuración (**2S**).
- ii) El cloro no coincide con el grupo 4-hidroxifenilo del BTEE, debido a la configuración (**3R**).

Estos hechos se pueden visualizar en el **Esquema 41**, donde se muestra el confórmero

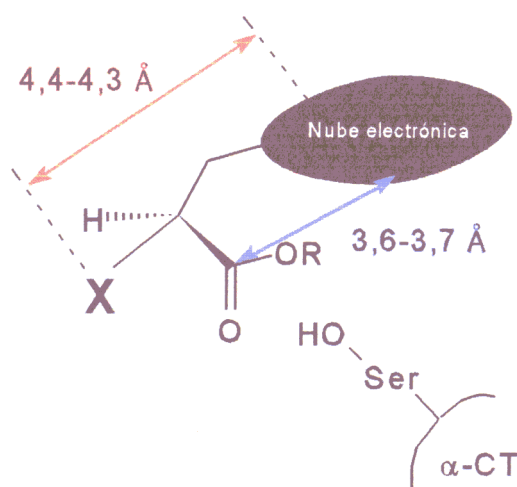
de mínima energía del isómero (2*S*, 3*R*) del 3-clorometil-tetrahidrofurano-2-carboxilato de etilo, el cual no es sustrato de la enzima, y se aprecia que las distancias son diferentes y los ángulos diedros son igualmente distintos.



Esquema 41. Conformerio de mínima energía del (2*S*, 3*R*) del 3-clorometil-tetrahidrofurano-2-carboxilato de etilo.

IV.3.2.2.- Sustratos que presentan un resto fenilo en su molécula

De lo deducido hasta ahora, podemos concluir que los requerimientos estructurales necesarios para que un sustrato no natural sea reconocido por la α -quimotripsina son los que aparecen indicados en la siguiente representación esquemática



Esquema 42.- Requerimientos estructurales de compuestos para ser reconocidos por la α -quimotripsina

A fin de explorar la importancia relativa del heteroátomo (X ó N) y de la presencia del anillo aromático en el reconocimiento del sustrato no natural por la enzima se procedió a realizar la hidrólisis de los ésteres (*R,S*) 2-fenilbutirato de etilo y (*R,S*) 3-fenilbutirato de etilo (**Esquema 40**, **3** y **4**), sin obtener ningún resultado positivo (**Tabla 45**), lo que significa que los sustratos no naturales necesitan algún resto rico en electrones (-NH- u -O-) en el carbono en α respecto al carboxilo para ser reconocidos como tales por la enzima, requisito que no cumplen los compuestos (**3**) y (**4**),

Tabla 45.- Resultados obtenidos en la hidrólisis de los derivados del ácido fenilbutírico, empleando α -quimotripsina libre (0.25 mg/ml).

Compuesto	Nombre	tiempo (h.)	% Acido
3	(<i>R,S</i>) 2-fenilbutirato de etilo	52	0
4	(<i>R,S</i>) 3-fenilbutirato de etilo	52	0

Para comprobar esta suposición, se realizó la hidrólisis de diversos mandelatos de alquilo (**Esquema 40**, compuestos **5** a **9**), mostrándose los resultados en la **Tabla 46**. Estos ésteres pueden considerarse análogos de los aminoácidos por sustitución isostera del -NH₂ por -OH.

Puede observarse que tanto el isómero (*R*) como el (*S*) del mandelato de etilo (compuestos **5** y **6**) son hidrolizados en la misma proporción tanto por la enzima nativa como por los derivados inmovilizados. Por otra parte, de los resultados obtenidos en la hidrólisis del (*R, S*) mandelato de etilo (**7**) con los anteriormente citados, podemos deducir que tanto la α -quimotripsina nativa como ambos derivados inmovilizados carecen de enantioselectividad respecto a este sustrato, pues los dos enantiómeros son hidrolizados a la misma velocidad. Ello implica que ambos isómeros pueden unirse al centro de la α -quimotripsina de dos formas distintas tal y como se muestra en el **Esquema 43**:

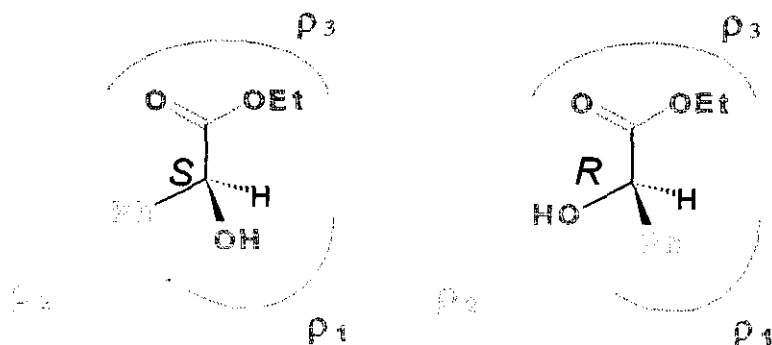
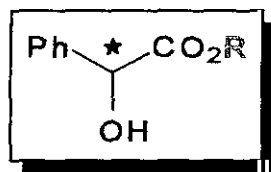
Esquema 43. Reconocimiento del (*R,S*)-mandelato de etilo en el centro activo de la α -quimotripsina.

Tabla 46.- Resultados obtenidos en la hidrólisis de diversos mandelatos de alquilo empleando α -quimotripsina libre (0.25 mg/ml) o inmovilizada (C5-CT, 0.053 mg de enzima/ml; AGM1, 0.076 mg de enzima/ml). Temperatura 25 °C ; [éster]=50 mM.



	R	Config.	Catalizador	% Acido (h.)	V. inicial (mM/min.)
5	Et-	(<i>R</i>)	α -CT	95 (20)	0.109
5	Et-	(<i>R</i>)	C5-CT	99 (40)	0.078
5	Et-	(<i>R</i>)	AGM1-CT	99 (44)	0.117
6	Et-	(<i>S</i>)	α -CT	98 (20)	0.214
6	Et-	(<i>S</i>)	C5-CT	99 (40)	0.141
6	Et-	(<i>S</i>)	AGM1-CT	99 (44)	0.04
7	Et-	(<i>R,S</i>)	α -CT	95 (20)	0.095
7	Et-	(<i>R,S</i>)	C5-CT	99 (40)	0.282
7	Et-	(<i>R,S</i>)	AGM1-CT	99 (44)	0.226
8	Bn-	(<i>R,S</i>)	α -CT	13 (52)	0.003
8	Bn-	(<i>R,S</i>)	C5-CT	0 (44)	0
8	Bn-	(<i>R,S</i>)	AGM1-CT	6 (44)	0.001
9	Isoamilo	(<i>R,S</i>)	α -CT	9 (52)	0.001
9	Isoamilo	(<i>R,S</i>)	C5-CT	0 (44)	0
9	Isoamilo	(<i>R,S</i>)	AGM1-CT	15 (44)	0.001

Por tanto, el centro ρ_1 puede recibir un grupo hidrófilo como el hidroxilo (enantiómero **S**) ó hidrofobo como el fenilo (enantiómero **R**), interaccionando ambos con la His₅₇ colocada en esa posición, por enlaces de hidrógeno en el primer caso o por interacción π - π entre anillos en el segundo. Esta explicación se avala por el hecho de que el aminoácido serina es reconocido como donador de acilo, ocupando el grupo -OH el lugar destinado al anillo aromático (252). Este resultado ya fue anticipado por Norin y cols. (110) mediante calculos teóricos de M.D. No obstante, pensamos que nuestra explicación es más plausible que la postulada por estos autores, para los cuales el verdadero sustrato es el enantiómero (**R**), mientras que el (**S**) es hidrolizado porque el fenilo es desplazado del sitio hidrofóbico (el ρ_2 en la nomenclatura de Hansch) por el resto -OEt. No obstante, al no disponer de programas de cálculo para revisar los datos de Norin y cols. obtenidos por M.M. estudiando la interacción enzima sustrato, no podemos desmentir su explicación de manera categórica.

La inmovilización de la enzima, tanto sobre geles de agarosa como sobre polímeros no altera la enantioselectividad del biocatalizador, como se deduce de la **Tabla 46**. En general, podemos decir que el isómero **S** se hidroliza a mayor velocidad que el isómero **R**, tal y como se deduce de los valores de velocidades iniciales de hidrólisis tanto para α -quimotripsina libre como inmovilizada sobre el copolímero C5. Este hecho es explicable porque la interacción del isomero **S** es análoga a la postulada por Hein y cols (105) para los **L** aminoácidos. Así pues, podemos pensar que el isomero **S** es rápidamente hidrolizado, pasando posteriormente la enzima a actuar sobre el isómero **R**.

Por lo que se refiere al tamaño de la cadena del alcohol que se encuentra esterificando al ácido mandelico podemos afirmar que, tanto para la enzima nativa como para la enzima inmovilizada, a medida que aumenta el tamaño disminuye la conversión (**Tabla 46**), según la ordenación relativa:

- Etilo >>> - isoamilo \approx bencilo

Estos resultados parecen estar en contradicción con la abundante evidencia, tanto experimental como teórica, basada en cálculos de D.M. y M.M., de la interacción de la α -quimotripsina con ésteres de los diversos alcoholes (110), que apuntan hacia el hecho de que

en dicha interacción, el grupo -OR se dirige hacia el exterior del centro activo, en cuyo caso no deberíamos observar ninguna influencia del tamaño de la cadena (266).

Dado que todos los sustratos estudiados son hidrolizados en mayor o menor grado, el tamaño de la cadena y/o su estructura electrónica no deben ser factores limitantes de la interacción de los ésteres con la α -quimotripsina, nativa o inmovilizada sobre el soporte hidrófilo (AGM1-CT). Más bien pensamos que existe un fenómeno controlado por la lipofilia de las cadenas más que por el tamaño de las mismas. Si comparamos los valores de $\log P$ de las cadenas (calculados utilizando las constantes fragmentarias, $\log P = \sum d_{i1} - \sum F$).

$\text{Log}P_{\text{Etilo}}$	=1.55
$\text{Log}P_{\text{Bencilo}}$	=2.41
$\text{Log}P_{\text{Isoamilo}}$	=3.17

podemos decir que los ésteres de cadenas de gran hidrófobicidad conducen a menor conversión, lo cual apunta hacia problemas difusionales del sustrato, en el medio acuoso del microentorno, tanto en el caso de la α -quimotripsina nativa como inmovilizada sobre agarosa.

La baja actividad enzimática observada con los derivados inmovilizados sobre polímeros para $R = \text{isoamilo}$ o bencilo (Tabla 46) puede atribuirse de igual forma a problemas difusionales, y a la interacción del soporte hidrófobo con el éster lipóide dificultándose el acceso al centro activo de la enzima.

Así pues podemos concluir, con los datos expuestos hasta ahora, que los sustratos no naturales necesitan para interaccionar con la enzima grupos ricos en electrones en el carbono en α respecto al grupo éster, los cuales han de interaccionar con los subsitios ρ_1 y ρ_2 , tal y como se representa esquemáticamente en la Figura 85.

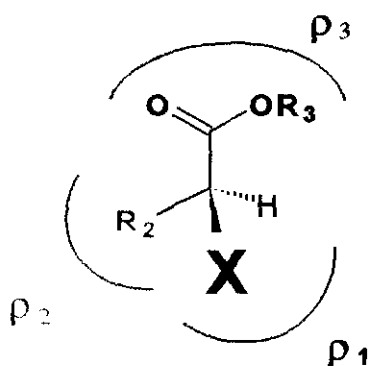


Figura 85. Acoplamiento de los sustratos no naturales en el centro activo de la α -quimotripsina

Asímismo, de los resultados obtenidos con los isómeros (*R*) y (*S*) de los mandelatos de etilo deducimos que tanto el subsitio ρ_1 como ρ_2 pueden reconocer a un fenilo como el sustituyente de mayor volumen, ya que ambos estereoisómeros eran hidrolizados a una velocidad semejante.

IV.3.2.3.- Sustratos con un nitrógeno en el carbono en α con respecto al grupo carboxialquilo

Para profundizar en estos aspectos se procedió a estudiar la hidrólisis de una serie de moléculas que tienen un grupo -NH en el carbono en α con respecto al grupo carboxialquilo, tales como el (*R, S*) 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxilato de etilo (**10**), el (*R,S*) 1-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1H- β -carbolina-3-carboxilato de metilo (**11**), el (*S*) N-(4-clorobutiril)-triptofanato de etilo (**12**), y el (*S*) (3-indolilmetil)-glicinato de etilo (**13**) representados en el **Esquema 40**.

El compuesto (**10**) se encuentra estrechamente relacionado con el 1-oxo-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxilato de etilo (**14**), cuyo isómero *S* presenta un valor de $k_{cat}/k_m = 4.3 \times 10^4$ para el reconocimiento enzimático, mientras que el (*R*) arroja un valor de 10^0 (275). Este resultado implica, además, que la enantiopreferencia del sustrato (**14**) (*S* < *R*) esta cambiada con respecto a los análogos del triptófano (*S* > *R*).

Además, la simple comparación de las estructuras (*R*) (**14**) y del sustrato N-formil-*L*-triptófano mostrada en el **Esquema 32** (Sección IV.3.1.1), nos indica una gran similitud entre ambas estructuras, lo que, nos llevaría a concluir que existe una aparente contradicción en la configuración del estereoisómero reconocido por la α -quimotripsina. No obstante Steinz y cols. (18) demostraron que tal contradicción no existe, ya que el anillo heterocíclico adopta una conformación tal que el grupo (-COOEt) adopta una disposición ecuatorial sólo en el caso del isómero (*R*) (**14**), coincidiendo entonces con la posición del grupo éster con el isómero *S* de la tirosina, fenilalanina o triptófano. Por el contrario, el isómero (*S*) (**14**), presentaría en este caso el grupo éster en posición axial (**Figura 86**), y por lo tanto sería menos reactivo.

De ello deducen los autores que el centro hidrofóbico ρ_2 , que reconoce al anillo aromático, es determinante a la hora de predecir qué enantiómero del sustrato no natural es

reconocido. En los esquemas siguientes se representan los conformeros de mínima energía de estos dos estereoisómeros, observándose que el estereoisómero (*R*) es el más similar al BTEE (Fig. 88 y 89).

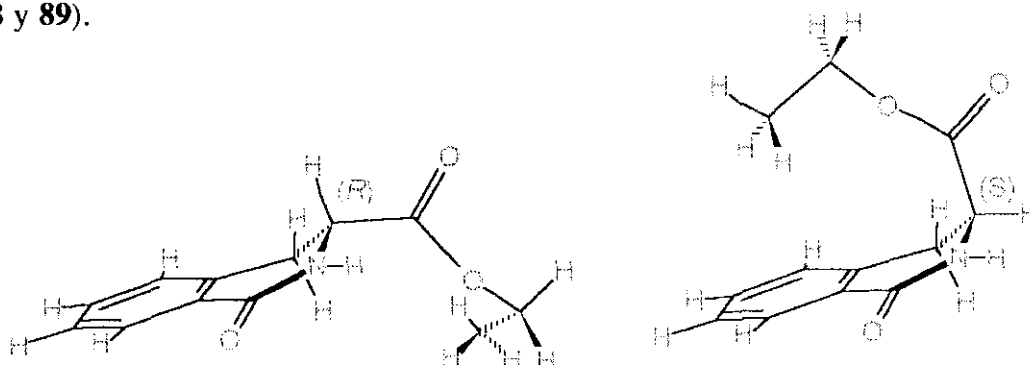


Figura 86.- Conformeros de mínima energía del (*R*) y (*S*) 1-oxo-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxilato de etilo, *R*(14) y *S*(14).

La α -quimotripsina en estado nativo no muestra enantioespecificidad como se deduce de la Figura 90, donde se observa como se obtienen conversiones superiores al 50%. Por el contrario la inmovilización, ocasiona un gran aumento de enantioselectividad (Fig. 90) hidrolizándose el isómero *R* (*ee* > 95%) de forma análoga a lo que sucedía para (14). Esto se debe a que la limitada flexibilidad del ciclo de isoquinolina hace que sólo en el caso del isómero *R* el grupo éster coincida con el grupo éster del BTEE, en el centro activo de la enzima inmovilizada la cual debido a su rigidez no reconoce tan fácilmente al isómero *S*.

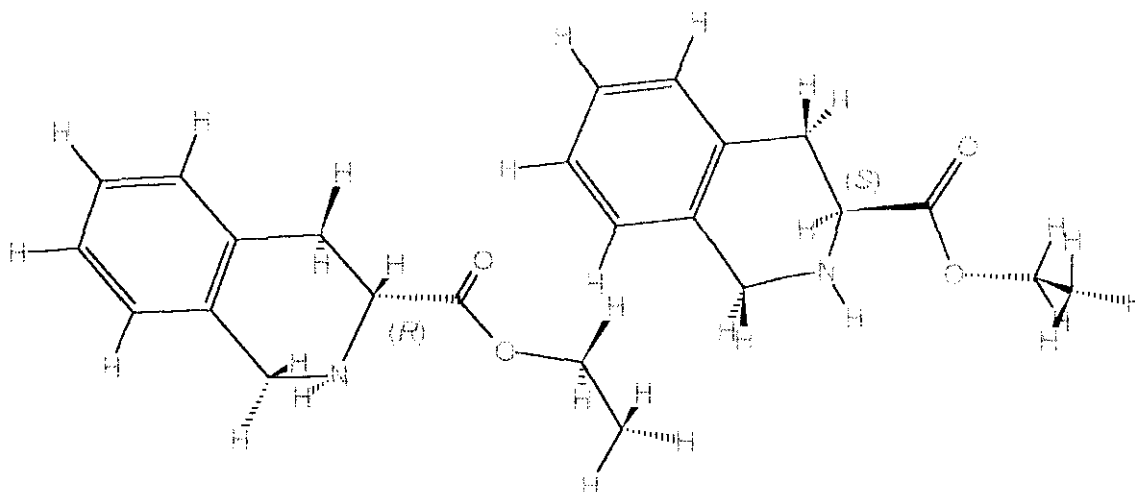
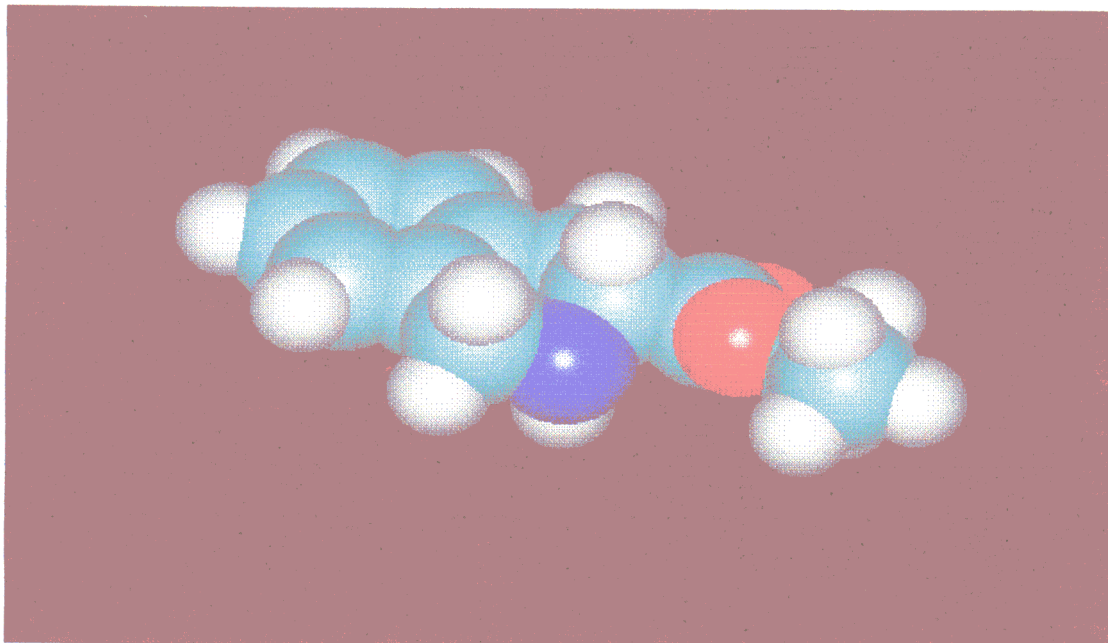


Figura 87. Comparación de los conformeros de mínima energía del *S* y *R*-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3 carboxilato de etilo.

a)



b)

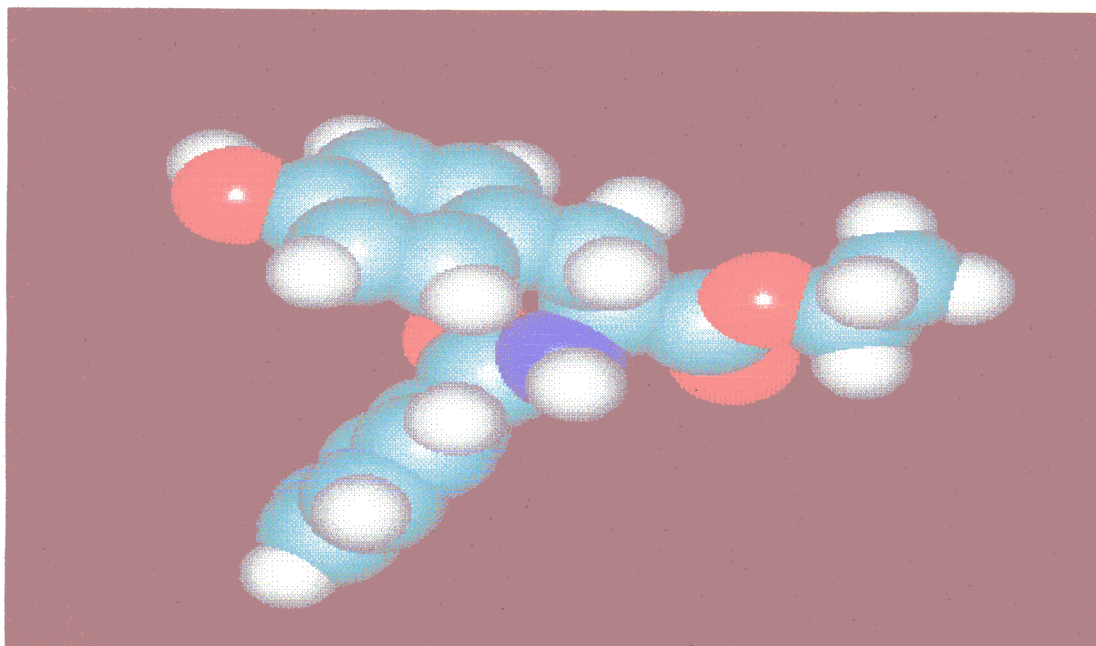


Figura 88. Comparación de los conformeros de mínima energía del (*R*)-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3 carboxilato de etilo (a) y el BTEE (b).

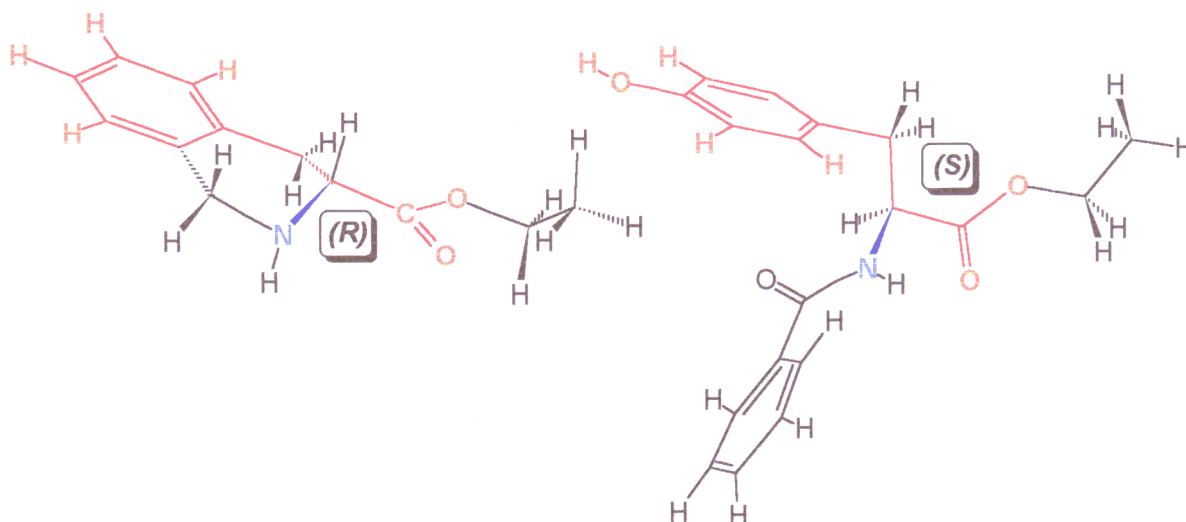


Figura 89. Comparación de los conformeros de mínima energía del (R)-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxilato de etilo y el BTEE.

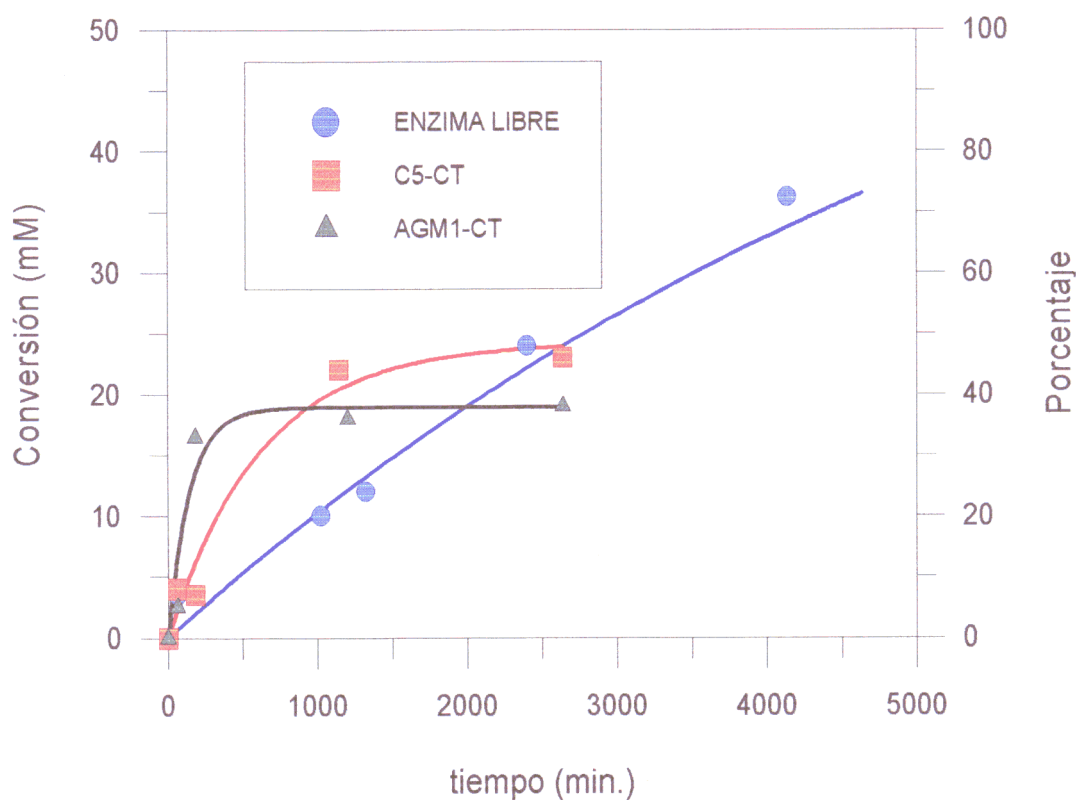


Figura 90.- Curvas de hidrólisis del (R, S) 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3 carboxilato de etilo, (10), empleando enzima libre (0.25 mg de enzima/ml), C5-CT (0.053 mg de enzima/ml) y AGM1-CT (0.076 mg de enzima/ml) como catalizadores.

Tabla 47.- Resultados obtenidos en la hidrólisis del (*R,S*)-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxilato de etilo, (**10**).

Catalizador	tiempo (h.)	% Ácido	V. inicial (mM/min.)
α -CT	44	48	0.011
C5-CT	44	46	0.039
C5-CT	69	78.5	
AGM1-CT	44	38	0.130

El resultado obtenido para la enzima nativa está en la línea de los obtenidos para los mandelatos, donde la ausencia del grupo amido conducía a bajos excesos enantioméricos. Esta afirmación se vería sostenida por los resultados descritos por diversos autores, los cuales señalan la importancia del grupo amida en el proceso de reconocimiento por parte de la α -quimotripsina nativa (102, 108), al comprobar que su presencia aumenta la velocidad de hidrólisis en un factor de 10^2 a 10^4 con respecto al sustrato que posee en su estructura restos -O- ó -CH₂- (106, 109), viéndose de igual manera aumentado el exceso enantiomérico obtenido. Dado que los cálculos de M.D. (110) y los análisis por Rayos X del complejo α -quimotripsina-N-formil-triptofano indican que el -CO de la amida no interacciona con la proteína, mientras que sí existe una interacción entre el resto -NH- con el carbonilo del residuo Ser₂₁₄ de la enzima, pensamos que el papel del grupo amida ha de relacionarse con un pK_a relativamente ácido en el grupo -CO-NH-, el cual favorecería la formación del puente de hidrógeno con el carbonilo de la Ser₂₁₄, mientras que este enlace de hidrógeno se vería dificultado en el caso de una base -CH₂-NH-CH₂, como sucede para el sustrato (**10**). Este hecho conduciría a un reconocimiento del sustrato menos estereoespecífico, como ya hemos comentado. Estos hechos no suceden para los derivados inmovilizados, donde la mayor rigidez enzimática parece conducir a un reconocimiento más selectivo hacia uno de los enantiómeros.

El *Cis* (1, 3) 1-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1H- β -carbolina-3-carboxilato de metilo (**11**) (Tabla 48) también fue ensayado como posible sustrato de la α -quimotripsina, con resultados negativos. La falta de reactividad observada podría explicarse atendiendo a las siguientes

consideraciones:

I) La α -quimotripsina reconocería con preferencia al anillo indólico, ya que el subsitio ρ_2 es fundamental, formando un enlace de hidrógeno entre el -NH- indólico y el hidroxilo del resto de Ser₁₈₉ (33), lo cual haría que el grupo éster no pudiera interactuar con la Ser₁₉₅.

II) La interacción del grupo metoxicarbonilo con la Ser₁₉₅ haría que el anillo no interaccionara con el subsitio hidrofóbico ρ_2 .

Estos hechos aparecen reflejados en el esquema siguiente, que recoge el conformero de mínima energía calculado para el compuesto (11).

III) La presencia de un resto metilo en la posición 1 dificulta la aproximación de la Ser₁₉₅ al grupo ester del sustrato, al igual que sucede en compuestos con sustituyentes en el carbono α , en los que se dificultan o debilitan las interacciones entre el grupo -CONH- y los residuos Ser₂₁₄ y Tyr₁₄₆ de la enzima (Figura 91) (102, 106, 109).

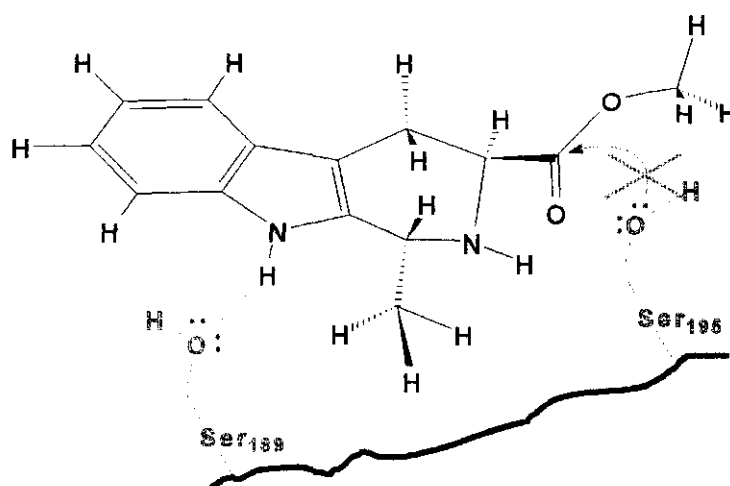


Figura 91. Conformer de mínima energía del *cis* (1, 3) (*S*)-1-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1H- β -carbolina-3-carboxilato de metilo

Dada la extrema rigidez de la molécula, no pueden cumplirse estos requisitos estéricos a la vez, por lo cual no se pueden producir las interacciones enzima-sustrato necesarias y no

se obtiene la hidrólisis deseada.

Seguidamente, se realizaron las mismas reacciones que en los casos anteriores empleando el (*R, S*)-*N*-(4 clorobutilil)-triptofanato de etilo (**Esquema 40, 12**) consiguiendo unos resultados realmente sorprendentes, que aparecen reflejados en el esquema siguiente y en la **Tabla 48**:

Tabla 48.- Resultados obtenidos en la hidrólisis del N, (4-clorobutilil)-L-triptofanato de metilo.

Catalizador	t (h.)	% (15)	% (16)	% (17)
α -CT	16	55	5	40
C5-CT	40	70	25	5
AGM1-CT	44	87	--	13

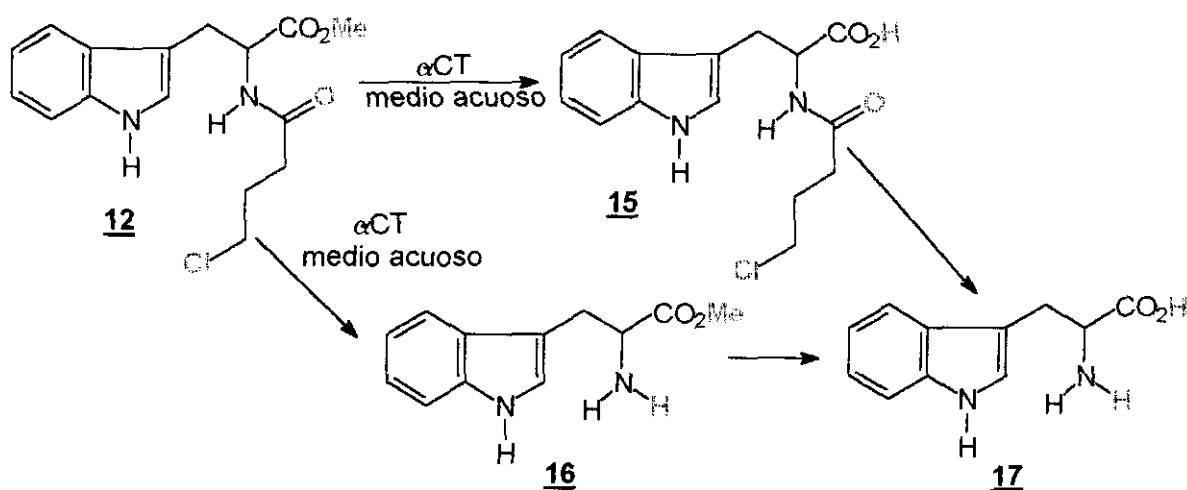


Figura 92. Productos obtenidos en la hidrólisis enzimática del sustrato (12)

Además del producto esperado (**15**), se obtuvieron otros dos (**16**) y (**17**), lo que indica que también ocurre la ruptura del enlace amido, quedando desprotegido el grupo amino, efecto que nunca se ha observado en presencia de un grupo éster, cuando el grupo protector del NH_2 es una cadena alifática como en el caso del acetilo (Ac-*L*-Trp-OEt) ó bien presenta un anillo

aromático como en el resto benzoilo (BTEE). Pensamos que ello se debe a la presencia del cloro en la cadena del resto acilo, el cual, como ya comentamos anteriormente, es capaz de sustituir al anillo aromático en el subsitio ρ_2 ("ar") como sucedía en el caso del 3-clorometil-tetrahidrofurano-2-carboxilato de etilo. Ello permitiría que este sustrato adoptase varias conformaciones diferentes en el reconocimiento por el centro activo, tal y como se indica a continuación (Figuras 93 y 94).

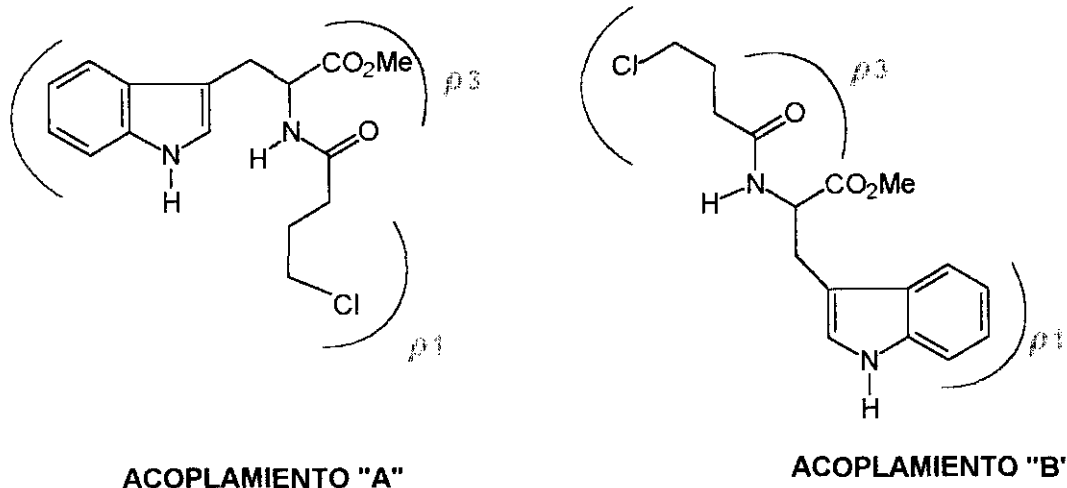
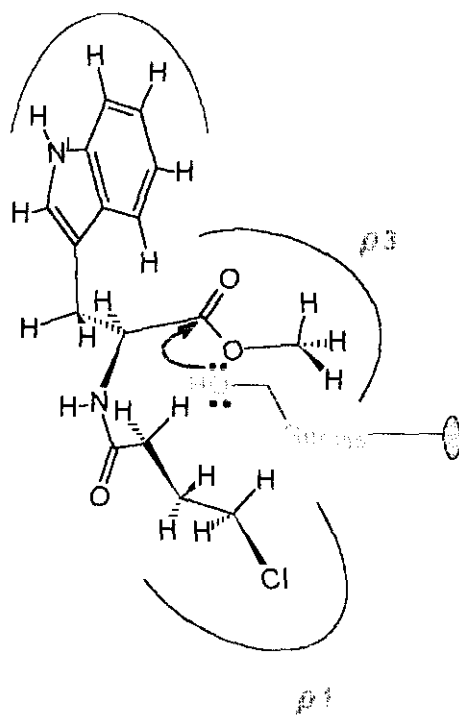


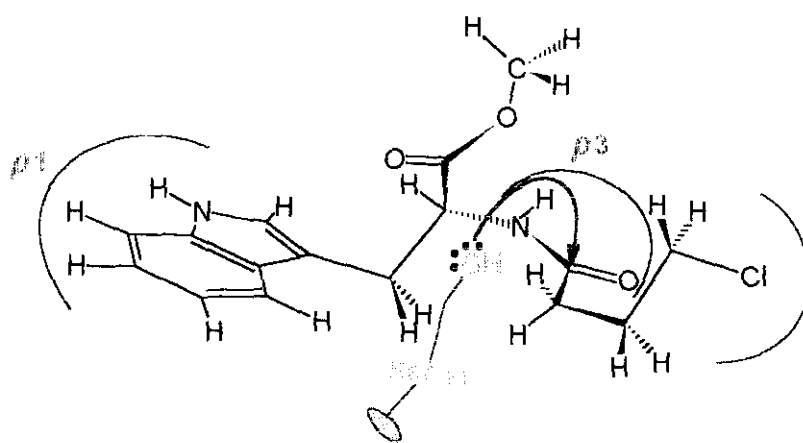
Figura 93. Dos posibles acoplamiento A y B del (*R*, *S*) N-(4 clorobutil)-triptofanato de etilo en el centro catalítico de la α -quimotripsina.

Esto implica, además, dos posibles interacciones con la Ser₁₉₅ del centro activo, como se esquematiza en la Figura 93, por lo que pueden ocurrir las hidrólisis tanto del grupo éster como del grupo amida. Aunque se ha descrito la hidrólisis del acetato de p-nitrofenilo (actuando la enzima como una simple esterasa y no como una proteasa), (67, 288) (Introducción, Sección IV.3.1.4.5), este grupo acetilo no hidroliza en el caso del N-acetil-*L*-triptofanato de etilo, sustrato enzimático, donde sólo se puede dar la interacción A, ya que el grupo acetilo no es capaz de ocupar el subsitio ρ_2 , ya que el anillo aromático dirige la disposición de la molécula en el centro activo, no dándose el acoplamiento B.

Estos resultados son coherentes con los obtenidos con los (*R*) y (*S*) mandelatos de etilo donde ya comentamos que los grupos ricos en electrones fenilo y -OH eran intercambiables entre los centros ρ_1 y ρ_2 , lo cual conduía a bajos excesos enantioméricos en la hidrólisis de estos ésteres.



ACOPLAMIENTO "A"



ACOPLAMIENTO "B"

Figura 94. Interacciones del conformero de mínima energía del N-(4-clorobutiril)-triptofanato de metilo con el centro activo.

Finalmente, se intento hidrolizar el compuesto (13) (Esquema 40), en las mismas condiciones que los anteriores, sin obtener exito alguno, resultado que parece lógico, ya que, este compuesto no es un derivado del triptófano si no de la glicina, cuyos esteres, como han comentado numerosos autores se hidrolizan muy lentamente con la α -quimotripsina (100). Además este compuesto presenta la dificultad añadida frente a la glicina de poseer un anillo aromático, que fija la molécula al centro activo dificultando el acercamiento del grupo ester al hidroxilo de la Ser₁₉₅ y las interacciones del grupo amino con la Ser₂₁₄.

Así pues, la naturaleza electrónica de los sustituyentes juega un papel importante a la hora del reconocimiento del sustrato por los subsitios ρ_1 y ρ_2 , controlando la estereoquímica del proceso. Todo ello nos lleva a concluir que el centro ρ_2 ó "ar" no es tan específico para anillos aromáticos como se pensaba hasta la fecha, ya que puede reconocer a grupos ricos en electrones tales como $-\text{CH}_2\text{-Cl}$ y $-(\text{CO})\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-Cl}$.

Por otro lado, la presencia de un $-\text{NH}-$ no parece ser tan indispensable a la hora del reconocimiento de la molécula por la α -quimotripsina, pudiendo ser sustituido por un $-\text{O}-$ u $-\text{OH}$ que también son reconocidos por el subsitio ρ_1 . Por el contrario, sí parece ser muy importante para el control estereoquímico del proceso de hidrólisis la presencia de un grupo amido $-\text{NH-CO-R}$ ($\text{R} =$ alquilo ó fenilo), el cual interacciona con los restos Ser₂₁₄ y Met₁₉₂, según describen de Norin y cols (110).

Así pues, creemos que este estudio ha servido para modelizar la interacción α -quimotripsina-sustrato no natural dando un paso significativo respecto a lo realizado hasta la fecha por el grupo de trabajo con derivados de fenilalanina sustituidos en el anillo aromático (290).

V.- CONCLUSIONES

V.- CONCLUSIONES

1) Empleando la "metodología secuencial" se han obtenido derivados inmovilizados de α -quimotripsina sobre copolímeros, superiores en cuanto a:

- a) carga enzimática
- b) actividad retenida
- c) actividad específica

a los descritos hasta ahora en la bibliografía.

2) El grado de injerto y/o el porcentaje de hidrólisis del copolímero alteran drásticamente la micromorfología del soporte, permitiendo así obtener catalizadores con propiedades diferentes.

3) La naturaleza del soporte (hidrófilo/hidrófobo), influye de forma decisiva en las propiedades catalíticas de los derivados inmovilizados, tanto en procesos de síntesis de péptidos como en la hidrólisis de ésteres.

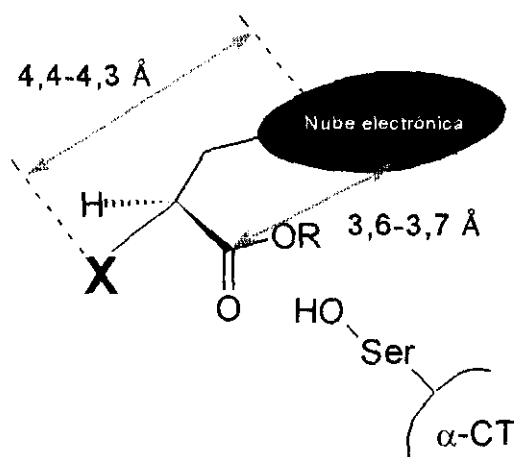
4) Se ha desarrollado una metodología operativa de síntesis de péptidos en que combinando la hidrofobicidad del disolvente con la hidrofilia/hidrofobia de los sustratos y productos podemos extraer el péptido en la fase orgánica y llevar a cabo procesos de síntesis continuos de gran sencillez operativa a nivel preparativo.

5) Utilizando la combinación de la síntesis de péptidos cinética y termodinamicamente controlada, nuestros derivados inmovilizados conducen a una alta relación péptido/ácido.

6) Estos derivados pueden ser reutilizados más de 10 ciclos, en procesos de síntesis de 24 h. cada ciclo, con rendimientos y relaciones péptido/ácido satisfactorios.

7) Se ha optimizado la síntesis de varios dipéptidos variando la naturaleza tanto del nucleófilo como del donador de acilo.

8) Empleando sustratos no naturales hemos determinado una serie de requerimientos estéricos y electrónicos que deben cumplir estos sustratos para ser reconocidos por la α -quimotripsina.



9) La inmovilización de la α -quimotripsina realizada en la presente Tesis Doctoral no altera la enantioselectividad de la misma, como hemos comprobado tanto con sustratos naturales como con sustratos no naturales. Asimismo, la enantioselectividad hacia los sustratos no naturales se incrementa por efecto de la inmovilización al rigidificarse la molécula de enzima.

VI.- BIBLIOGRAFÍA

VI.-BIBLIOGRAFÍA

- 1 (a) C. Walsh, en *Enzymatic Reactions Mechanisms*, Freeman, San Francisco, 1977.
(b) A. Fersht en *Enzyme Structure and Mechanism*, Freeman, New York, 1985.
- 2 (a) H. Yamada, S. Shimizu; *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* **27**, 1988, 622.
(b) C.-H. Wong; *Science* **244**, 1989, 1145.
(c) C. W. Hutchinson; *Trends Biotech.* **8**, 1990, 348.
- 3 A. L. Margolin; *Enz. Microb. Biotech.* **15**, 1993, 266-80.
- 4 E. Fisher; *Ber. Detsch. Chem. Ges.* **24**, 1894, 2683.
- 5 D. Koshland, P. Boyer; *Ann. Rev. Biochem.* **37**, 1968, 374.
- 6 M. Dixon, E.C. Webb en *Enzymes*, Academic Press, New York. 1985.
- 7 (a) T. E. Creighton en *Proteins: Structure and Molecular Properties*, Freeman, San Francisco 1986 cap. 6.
(b) I. H. Segel en *Enzyme Kinetics*, Wiley, New York, 1975.
- 8 (a) K. Mosbach; *Method. Enzymol.* **44**, 1976.
(b) K. Mosbach; *Method. Enzymol.* **135-137**, 1987.
(c) I. Chibata en *Inmobilized Enzymes*, Wiley, New York, 1978.
- 9 (a) W. Gerhartz en *Enzymes in Industry*, VCH, Berlin, 1990.
(b) R. Wu y L. Grossman; *Method. Enzymol.* **153-155**, 1987
(c) D. V. Goeddel; *Method Enzymol.* **185**, 1990.
- 10 G. Carrea; *Trends Biotech.* **2**, 1984, 102.
- 11 (a) E. Antonini, G. Carrea y P. Cremones; *Enz. Microb. Technol.* **3**, 1981, 291.
(b) M. D. Lilly; *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **32**, 1982, 162.
(c) K. Martinek, A. V. Levashov, Y. L. Khmel'nitsky, N. L. Klyachco y I. V. Berezin; *Science* **218**, 1982, 889.
- 12 H. Neurath en *Proteolytic Enzymes*, (Eds. J. Beynon, J. S. Bond), IRL Press. 1989 cap. 1.
- 13 M. Rovey y P. Desnuelle; *Biochem. Biophys. Acta.* **13**, 1953, 300.
- 14 W. J. Dreyer y M. Neurath; *J. Biological Chem.* **217**, 1955, 527.
- 15 B. S. Hartley; *Nature.* **201**, 1964, 1284.

- 16 B. S. Hartley y D. L. Kauffman; *J. Biochem.* **101**, 1966, 229.
- 17 B. Meloun, I. Kluch, V. Kostka, L. Moravek, Z. Prusik, J. Vanecek, B. Keil y F. Sorm; *Biochem. Biophys Acta.* **130**, 1966, 543.
- 18 T. A. Steitz, R. Henderson y D. M. Blow; *J. Mol. Biol.* **46**, 1969, 337.
- 19 D. E. Koshland, Jr., D. H. Strumayer y W. J. Ray; *Brookhaven Symp. Biol.* **15**, 1962, 101.
- 20 F. J. Kézdy, J. Feder y M. L. Bender; *J. Am. Chem. Soc.* **89**, 1967, 1009.
- 21 B. W. Matthews, P. B. Sigler, R. Henderson y D. M. Blow; *Nature* **214**, 1967, 652.
- 22 P. B. Sigler, D. M. Blow, B. W. Matthews y R. Henderson; *J. Mol. Biol.* **35**, 1968, 143.
- 23 J. J. Birktoft, B. W. Matthews y D. M. Blow; *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **36**, 1969, 131.
- 24 J. Kallos y D. Rizok; *J. Mol. Biol.* **7**, 1963, 599.
- 25 D. H. Strumeyer, W. N. White y D. E. Koshland; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **50**, 1963, 931.
- 26 P. B. Sigler, B. A. Jeffery, B. W. Matthews y D. M. Blow; *J. Mol. Biol.* **15**, 1966, 175.
- 27 J. D. Bernal, I. Fankuchen y M. Perutz; *Nature.* **141**, 1938, 523.
- 28 J. Donohue; *Proc. Acad. Sci. U. S.* **39**, 1953, 470.
- 29 G. Nemethy, D. C. Phillips, S. J. Leach, y H. A. Scheraga; *Nature.* **214**, 1967, 363.
- 30 L. Pauling Y B. Corey; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **37**, 1951, 729.
- 31 D. M. Blow; *J. Biochem.* **112**, 1969, 261.
- 32 J. J. Birktoft, D. M. Blow, R. Henderson, y T. A. Steitz; *Phil. Trans. Roy. Soc London.* 1970, B257, 67.
- 33 D. M. Blow en *Enzymes*, 3^a Edic., 1971, cap. 6, p. 185-247.
- 34 B. W. Matthews, P. B. Soler. R. Henderson y D. M. Blow; *Nature.* **214**, 1967, 652.
- 35 P. B. Soler, B. A. Jeffery, B. W. Matthews y D. M. Blow; *J. Mol. Biol.* **15**, 1966, 175.
- 36 D. M. Blow y T. A. Steitz; *Ann Rev. Biochemistry.* **39**, 1970, 63.
- 37 G. L. Rossi y S. A. Bernhard; *J. Mol. Biol.* **49**, 1970, 45.

- 38 H. L. Oppenheimer, B. Labouesse y G. P. Hess; *J. Biol. Chem.* **241**, 1966, 2720.
- 39 J. Kraut, L. C. Sieker, D. F. High y S. T. Freer; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **58**, 1957, 34.
- 40 G. P. Hess, J. McConn, E. Ku, G. McConkey; *Phil. Trans. Roy. Soc. London.* 1970, B257, 89.
- 41 C. Ghelis, J. Labouesse y B. Labouesse; *Biochem. Biophys. Res. Com.* **29**, 1967, 101.
- 42 J. Rupley, W. J. Drever y Neurath; *Biochem. Biophys. Acta.* **18**, 1955, 162.
- 43 H. Parker y R. Lumry, *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 1963, 483.
- 44 J. McConn, G. D. Fasman y G. P. Hess; *J. Mol. Biol.* **39**, 1969, 551.
- 45 A. Himoe, P. C. Parks y G. P. Hess; *J. Biomol. Chem.* **242**, 1967, 919.
- 46 J. R. Garel y B. Labouesse; *J. Mol. Biol.* **47**, 1970, 41.
- 47 S. T. Freer, J. Kraut, J. D. Robertus, H. T. Wright y N. H. Xuong; *Biochemistry.* **9**, 1970, 1997.
- 48 J. Kraut; "*Enzymes*". **3**, 1971, Cap. 5, Ed. Boyer Pd. Academic Press.
- 49 M. L. Bender y K. C. Kemp; *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 1957, 116.
- 50 D. W. Ingles y J. R. Knowles, *J. Biochem.* **108**, 1968, 561.
- 51 R. Henderson; *Ph. D. Comunicación*, Universidad de Cambridge. 1969.
- 52 S. A. Bernhard y Z. H. Tashjian; *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 1965, 1806.
- 53 G. P. Hess en *Enzymes* 3ª Edic. **3**, 1971, 213.
- 54 E. F. Jansen, M. D. Nutting y A. K. Balls. *J. Biol. Chem.* **179**, 1976, 201.
- 55 N. K. Schaffer, S. C. May y W. H. Summeson; *J. Biol. Chem.* **202**, 1953, 67.
- 56 R. Henderson; *J. Mol. Biol.* **54**, 1970, 341.
- 57 H. Weiner, W. N. White, D. G. Hoare y D. E. Koshland Jr. *J. Am. Chem. Soc.* **88**, 1966, 3851.
- 58 D. M. Blow, J. J. Birktoft y B. S. Hartley; *Nature.* **221**, 1969, 337.
- 59 M. W. Hunkapiller, S. H. Smallcombe, D. R. Whitaker y J. H. Ricards; *Biochemistry* **12**, 1973, 4732.
- 60 W. W. Bachovchin, R. Kaiser, J. H. Richards y J. D. Roberts; *P. Natn. Acad. Sci. USA* **78**, 1981, 7323.
- 61 M. A. Porubcan, W. M. Westler, I. B. Ibañez y J. L. Markley; *Biochemistry.* **18**,

- 1979, 4108.
- 62 A. A. Kossiakoff y S. A. Spenger; *Biochemistry*. 1981, 20, 6462.
- 63 W. J. Rutter, S. J. Gardell, S. Rocznik, D. Hilvert, S. Sprang, R. J. Fletterick y C. S. Craik; *Protein Engineering*, Ed. Alan R. Liss, Inc, New York. 1987.
- 64 P. Carter y J. A. Wells; *Nature*, 332, 1988, 564.
- 65 W. B. Lawson y H. J. Schramm; *J. Am. Chem. Soc.* **84**, 1962, 2017.
- 66 F. J. Kézdy, G. E. Clement y M. L. Bender; *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 1964, 3690.
- 67 B. S. Hartley y B. A. Kilby; *J. Biochem.* **50**, 1952, 672.
- 68 F. J. Kézdy y M. L. Bender; *Biochemistry*. **6**, (1), 1962, 1097.
- 69 L. Michaelis y M. L. Menten; *Z. Biochem.* **49**, 1913, 333.
- 70 H. Gutfreund; *Enzymes Physical Principles.*, Ed. Wily and sons, New York 1972.
- 71 F. J. Kézdy y E. T. Kaiser; *Methods in Enzymology* **19**, 1970, 3.
- 72 M. L. Bender, G. R. Schonbaum y B. Zerner; *J. Am. Chem. Soc.* **84**, 1962, 2540.
- 73 G. R. Schonbaum, B. Zerner y M. L. Bender; *J. Biol. Chem.* **236**, 1961, 2930.
- 74 M. Laskowski en *Methods of Enzymology*. Eds. S. P. Colowick, N.O. Kaplan, Academic. Press, Inc., New York, **2**, 1955, 10.
- 75 M. W. Hunkapiller, M. D. Forgac y J. H. Richards; *Biochemistry*. **15**, 1976, 5581.
- 76 A. Kühmann, D. Kukla, P. Schwager, K. Bartels y R. Huber; *J. Mol. Biol.* **77**, 1973, 417.
- 77 D. M. Blow, J. Janin y R. M. Sweet; *Nature* **249**, 1974, 54.
- 78 A. L. Fink y G. A. Petsko; *Adv. Enzymol.* **52**, 1981, 177.
- 79 R. A. Oosterbann, M. Adrichem y J. A. Cohen; *Biochem. Biophys. Acta* **63**, 1962, 204.
- 80 B. S. Hartley y B. A. Kilby; *J. Biochem.* **56**, 1954, 288.
- 81 H. Gutfreund y J. M. Sturtevant; *ibid.* **63**, 1956, 656.
- 82 H. Gutfreund y J. M. Sturtevant; *Proc. Acad. Natl. Sci. U.S.A.* **42**, 1956, 719.
- 83 G. W. Schwert, H. Neurath, S. Kaufman y J. E. Snoke; *J. Biol. Chem.* **172**, 1948, 221.
- 84 G. W. Schwert y T. Takenaka; *Biochem. Biophys. Acta.* **16**, 1955, 570.
- 85 M. L. Bender, G. E. Clement, F. J. Kézdy y H. Heck; *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 1964,

3680.

- 86 H. Lineweaver y D. Burk; *ibid.* **56**, 1934, 658.
- 87 G. S. Eadie; *J. Biol. Chem.* **146**,1942, 85.
- 88 B. Zerner, R. P. M. Bond y M. L. Bender; *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 1964, 3674
- 89 A. Himoe, K. G. Brandt, R. J. Desa y G. P. Hess; *J. Biol. Chem.* **244**, 1969, 3483.
- 90 K. G. Brandt, A. Himoe y G. P. Hess; *ibid.* **242**, 1967, 3973.
- 91 J. F. Wootton y G. P. Hess; *J. Am. Chem. Soc.* **84**, 1962, 440.
- 92 A. Himoe, K. G. Brandt y G. P. Hess; *J. Biol. Chem.* **242**, 1967, 3963.
- 93 S. A. Bernhard, B. F. Lee y Z. H. Tashjian; *J. Mol. Biol.* **18**, 1966, 405.
- 94 E. Charney y S. A. Bernhard; *J. Am. Chem. Soc.* **89**, 1967, 2726.
- 95 J. Lenard, R. Hyman, S. Johnson y G. P. Hess; *Anal. Biochem.* **11**, 1965, 30.
- 96 M. Rovey, M. Poilroux, A. Yoshida, P. Desnuelle; *Biochem. Biophys. Acta* **23**, 1957, 608-20.
- 97 N. C. Davis; *J. Biol. Chem.* **223**, 1956, 935.
- 98 G. E. Hein, J. B. Jones y C. Niemann; *Biochem. Biophys. Acta.* **65**, 1962, 353.
- 99 S. Kaufmann y H. Neurath; *Arch. Biochem.* **21**, 1949, 437.
- 100 J. B. Jones, T. Kunitake, C. Niemann y G. E. Hein; *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 1975, 1777.
- 101 R. Jennings y C. Niemann; *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 1953, 4687.
- 102 G. E. Hein y C. Neimann; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **47**, 1961, 1341.
- 103 S. G. Cohen, A. Milovanovic, R. M. Schlutz y S. Y. Weinstein; *J. Biol. Chem.* **244**, 1969, 2664.
- 104 L. Cunningham; *Comp. Biochem.* **16**, 1965, 85.
- 105 G. E. Hein y C. Neimann; *J. Am. Chem. Soc.* **84**, 1962, 4487.
- 106 R. L. Peterson, K. W. Huebele y C. Niemann; *Biochem* **2**, 1963, 947.
- 107 H. R. Almond, D. T. Manning y C. Niemann; *Biochem.* **1**, 1962, 243.
- 108 S. G. Cohen, J. Crossley, E. Khedouri y R. Zand; *J. Am. Chem. Soc.* **84**, 1962, 4163.
- 109 S. G. Cohen, J. Crossiey y E. Khedouri; *Biochem.* **2**, 1963, 820.
- 110 M. Norin, K. Hult, A. Mattson y T. Norin; *Biocatalysis* **7**, 1993, 131-147.

- 111 C. Hansch, C. Grieco; C. Silipo y A. Vittoria; *J. Med. Chem.* **20**, 1977, 1420-35.
- 112 M. Bergmann y J. S. Fruton; *J. Biol. Chem.* **124**, 1938, 321.
- 113 H. Neurath y G. W. Schwert; *Chem. Rev.* **46**, 1950, 69.
- 114 H. T. Huang y C. Niemann; *J. Am. Chem. Soc.* **73**, 1951, 1541.
- 115 D. T. Manning y C. Niemann; *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 1958, 1478.
- 116 S. G. Cohen, J. Crossley, E. Khedouri, R. Zand y L. H. Klee; *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 1963, 1686.
- 117 T. A. Steitz y R. Henderson (experimentos no publicados)
- 118 D. W. Ingles y J. R. Knowles; *J. Biochem.* **104**, 1967, 369.
- 119 M. L. Bender, F. J. Kézdy y C. R. Gunter; *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 1964, 3714.
- 120 W. Kullmann *Enzimatic peptide synthesis*. Ed. CRC Press, Inc., 1987, 1-3.
- 121 E. Bricas, C. Fromageot; *Adv. Prot. Chem.* **8**, 1953, 1-5.
- 122 I. Gill, R. López-Fandiño, X. Jorba y E. N. Vulfson; *Enz. Microb. Tech.* **18**, 1996, 162-163.
- 123 R. B. Merrifield; *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 1963, 2149-2153.
- 124 R. J. Simonds (Eds.) *Chemistry of Biomolecules: 1992* 98-113.
- 125 J. U. Klein y V. Cerovsky; *Int. J. Pep. Prot. Res.* **47**, 1996, 348-352.
- 126 J. J. García-Domínguez, J. M. García-Anton, F. Reig, G. Valencia; *Química e Industria* **4**, 1981, 289-93.
- 127 (a) B. W. Matthews, C. S. Craik y H. Neurath; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 1994, 4103-05.
- (b) D. Corey y M. A. Phillips; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 1994, 4106-09.
- 128 P. Clapés, J. L. Torres, P. Adlercreutz; *Bioorg. Med. Chem.* **3**, (3), 1995, 245-255.
- 129 M. L. M. Serralheiro, D. M. F. Prazeres y J. M. Cabral; *Enz. Microb. Tech.* **16**, 1994, 1064-1073.
- 130 I. Gill, E. N. Vulfson; *J. Am. Chem. Soc.* **115**, (8), 1993, 3348-49.
- 131 M. Y. Gololobov, V. M. Stepanov y T. L. Voyushina y P. Irina; *Enz. Microb. Tech.* **16**, 1994, 522-28.
- 132 (a) T. Nagashima, A. Watanabe, H. Kise; *Enz. Microb. Tech.* **14**, 1992, 842-47.

- (b) H. Kise, A. Hayakawa; *Enz. Microb. Tech.* **13**, 1991, 584-88.
- 133 M. Capellas, G. Álvaro, M. D. Benaiges, G. Caminal, J. López-Santín, G. González y P. Clapés; *III Congreso Ibérico de Biotecnología*, Eds. F. Fernández-Polanco, P. A. García Encina y cols. 1996, 213-14.
- 134 A. J. Andersen, F. Widmer y J. T. Johansen en *Peptides*, Eds. D Theodoropoulos, W. D. Gruyter, Berlín, 1986.
- 135 W. Kullmann; *Biochemistry* **79**, 1982, 231.
- 136 K. Oyama, K. I. Kihara y Y. Nonaka; *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, **356**, 1981.
- 137 V. Kasche; *Enz. Microb. Tech.* **8**, 1986, 5.
- 138 L. Riechmann y V. Kasche; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **120**, 1984, 686-691.
- 139 L. Riechmann y V. Kasche; *Biochem. Biophys. Acta.* **830**, 1985, 164-172.
- 140 K. Mosbach en *Methods in Enzymology*, **136**, 1987, 280-284.
- 141 A. L. Fink y M. L. Bender; *Biochemistry*, **8**, 1969, 5109-5118.
- 142 K. Wallenfels y P. Malhorta; *Adv. Carbohydr. Chem.* **16**, 1961, 239-298.
- 143 H.-D. Jakubke; *The Peptides* **9**, 1987, 103
- 144 V. Schellenberger y H.-D. Jakubke; *Biophys. Acta* **869**, 1986, 54.
- 145 V. Schellenberger, M. Schuster y H.-D. Jakubke; *Biocatalysis* **4**, 1990, 105-111.
- 146 V. Kasche, U. Haufler y R. Zöllner; *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **365**, 1984, 1435.
- 147 K. Breddam y M. Ottesen; *Calsberg Res. Commun.* **49**, 1984, 473
- 148 H.-D. Jakubke, P. Kuhl y A. Könnel; *Angew. Chem., Int. Ed. Eng.* **24**, 1985, 85-93.
- 149 G. A. Homandberg, A. Mattis y M. Laskowski; *J. Biochem.* **17**, 1978, 5220-27.
- 150 A. Florsheimer, A. Schwarz, D. Steinke, M. Kittelmann, G. Herrmann, M-R. Kula y C. Wandrey; *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **613**, 1991, 633-37.
- 151 R. Fernandez-Lafuente, C. M. Rosell, R. M. Blanco, J. M. Guisán; *Enzyme Microb. Technol.* **13**, 1991, 898-905.
- 152 R. M. Blanco, G. Alvaro y J. M. Guisán; *Enzyme Microb. Technol.* **13**, 1991, 573-583.

- 153 R. Fernandez-Lafuente, G. Alvaro, R. M. Blanco y J. M. Guisán; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **27**, (3), 1991, 277-290.
- 154 P. Clapés, P. Adlercreutz y B. Mattiason; *Biotechnol. Appl. Biochem.* **12**, 1990, 376-386.
- 155 L. Vidaluc, M. Baboulene, V. Speziale, A. Lattes, P. Monsan; *Tetrahedron.* **39**, (2), 1983, 269-274.
- 156 Y. Kimura, K. Nakanishi y R. Matsuno; *Enz. Microb. Tech.* **12**, 1990, 272-80.
- 157 G. Fasman (Ed.), en *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, Physical and Chemical Data*, CRC Press. Cleveland. **1**, 1975.
- 158 V. Kasche y R. Zöllner; *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **363**, 1982, 531.
- 159 P. Clapés, P. Adlercreutz y B. Mattiasson; *J. Biotech.* **15**, 1990, 323-38.
- 160 K. Nilsson y K. Mosbach; *Biotechnol. Bioeng.* **26**, 1984, 1146.
- 161 K. Nilsson, I. Skúladóttir y B. Mattiasson; *Biotech. Appl. Biochem.* **16**, 1992, 182-187.
- 162 V. Tôugu, H. Meos, M. Haga, A. Aaviksaar y H.-D. Jakubke; *FEBS.* **329**, (1, 2), 1993, 40-42.
- 163 D. Ullmann, F. Bordusa, K. Salchert y H.-D. Jakubke; *Tetrahedr. Asymm.* **7**, (7), 1996, 2047-54.
- 164 (a) S. Kamat, E. J. Beckman y J. Russell; *Enz. Microb. Technol.* **14**, 1992, 265-271.
(b) C. R. Wescott y A. M. Klibanov; *Biochem. Biophys. Acta* **1206**, 1994, 1-9.
- 165 P. Cremonesi, G. Carrea, L. Ferrara y E. Antonini; *Eur. J. Biochem.* **44**, 1974, 401.
- 166 R. Z. Kazandjan, J. S. Dordick y A. M. Klibanov; *Biotech. Bioeng.* **28**, 1986, 417.
- 167 K. Martinek, A. N. Semenov y I. V. Berezin; *Biochim. Biophys. Acta* **658**, 1981, 76.
- 168 J. Woodward (Ed.), *Immobilized Cells and Ezymes; A Practical Approach* IRL, Press Oxford, 1985.
- 169 K. Morihara y T. Oka; *J. Biochem.* **163**, 1977, 531.
- 170 K. Morihara, Y. Ueno y K. Sakina; *J. Biochem.* **240**, 1986, 803.
- 171 (a) P. Adlercreutz; *Biochim. Biophys. Acta* **1163**, 1993, 144-48.
(b) P. Lozano, D. Combes y J. L. Iborra; *J. Biotech.* **35**, 1994, 9-18.
- 172 T. Kijima, S. Yamamoto y H. Kise; *Enz. Microb. Tech.* **18**, 1996, 2-6.

- 173 P. Clapés y G. Valencia y P. Adlercreutz; *Enz. Microb. Tech.* **14**, 1992, 575-80.
- 174 V. Dorovska-Taran, C. Veeger y A. J. W. G. Visser; *Eur. J. Biochem.* **218**, 1993, 1013-1019
- 175 Y. Tomiuchi, K. Oshima y H. Kise; *Bull. Chem. Soc. Jpn* **65**, 1992, 2599-2603
- 176 D. B. Volkin, A. Stabli, R. Langer y A. M. Klivanov; *Biotech. Bioeng.* **37**, 1991, 3192-6.
- 177 P. A. Burke, R. G. Griffin y A. M. Klivanov; *Biotech. Bioeng.* **42**, 1993, 87-94.
- 178 P. Clapés y P. Adlercreutz; *Biochem. Biophys. Acta.* **1118**, 1991, 70-76.
- 179 H. Gaertner y A. Puigserver; *Eur. J. Biochem.* **181**, 1989, 207-13.
- 180 A. L. Margolin, D-F Tai y A. M. Klivanov; *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 1987, 7885-7.
- 181 P. A. Fitzpatrick y A. M. Klivanov; *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 1991, 3166-71.
- 182 M. Arroyo, J. M. Moreno y J. V. Sinisterra; *J. Mol Catal. A: Chem.* **97**, 1995, 195-201.
- 183 G. E. Schulz y R. H. Schirmer en *Principles of Protein Structure*, Springer-Verlag, New York, 1979.
- 184 (a) C. Laane, J. Tamper y M. D. Lilly; *Biocatalysis in Organic Media*, Elsevier, Amsterdam, 1987.
- (b) J. Tramper y M. H. Vermue; *Biocatalysis in Non-Conventional Media*, Elsevier Amsterdam, 1992.
- 185 A. Zacks, A. M. Klivanov; *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 1986, 2767-2768.
- 186 A. Zacks y A. M. Klivanov; *J. Biol. Chem.* **263**, 1988, 3194-3201.
- 187 A. Margolin y A. M. Klivanov; *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 1987, 3802-3804.
- 188 M. Therisod y A. M. Klivanov; *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 1986, 5638-5640
- 189 J. S. Dordick; *Enz. Microb. Technol.* **11**, 1989, 194
- 190 R. Z. Kazandjian y A. M. Klivanov; *J. Am. Chem. Soc.* **107**, 1985, 5448-50.
- 191 P. J. Halling; *Enz. Microb. Technol.* **16**, 1994, 178-206.
- 192 P. J. Halling; *Biochim. Biophys. Acta* **1040**, 1990, 225-28.
- 193 L. Kvittingen, B. Sjursnes, T. Anthosen y P. J. Halling; *Tetrahedron* **48**, 1992, 2793-2802.
- 194 M. Norin, J. Boutelje, E. Holmberg y K. Hult; *Appl. Microbiol. Biotech.* **28**, 1988,

- 527-530.
- 195 N. W. Ross y H. Schneider; *Enz. Microbiol. Technol.* **13**, 1991, 370-77.
- 196 T. Yamane, T. Ichiryu, M. Nagata, A. Veno y S. Shimizu; *Biotechnol. Bioeng.* **36**, 1990, 1063-1069
- 197 J. M. Sánchez-Montero, V. Hamon, D. Thomas y M. D. Legoy; *Biochim. Biophys. Acta* **1078**, 1990, 345-50.
- 198 T. Tanaka, E. Ono, M. Ishihara, S. Yamanaka y K. Takinami; *Agric. Biol. Chem.* **45**, 1981, 2387-9
- 199 H. Kitaguchi, A. M. Klivanov; *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 1989, 9272-73.
- 200 M. Reslow, P. Adlercreutz y B. Mattiasson; *Biocatalysis* **6**, 1992, 307-18.
- 201 M. Reslow, P. Adlercreutz y B. Mattiasson; *Eur. J. Biochem.* **172**, 1988, 573-8.
- 202 T. Kawamoto, K. Sonomoto y A. Tanaka; *Biocatalysis* **1**, 1987, 137-45.
- 203 P. Adlercreutz; *Eur. J. Biochem.* **199**, 1991, 609-14.
- 204 R. H. Valivety, P. J. Halling, A. D. Peilow y A. R. Macrae; *Biochim. Biophys. Acta* **1122**, 1992, 143-46.
- 205 R. H. Valivety, P. J. Halling, A. D. Peilow y A. R. Macrae; *Eur. J. Biochem.* **222**, 1994, 461-466.
- 206 D. K. Oladepo, P. J. Halling y V. F. Larsen; *Biocatalysis* **8**, 1994, 283-287.
- 207 V. Kasche, U. Haufler, D. Markowsky, S. Melnyk y A. Zeich; *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **501**, 1987, 97.
- 208 H. Amneus, D. Gabel, L. Näslund y V. Kasche; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **90**, 1979, 1313.
- 209 D. Salvador, J. V. Sinisterra y J. M. Guisán; *J. Mol. Catal.* **62**, 1990, 93-105.
- 210 R. Fernández-Lafuente, C. M. Rosell, V. Rodríguez, C. Santana, G. Soler, A. Bastida y J. M. Guisán; *Enz. Microb. Technol.* **15**, 1993, 546-50.
- 211 S. P. Kumble y C. S. Radamoss; *Biocatal. Biotransf.* **12**, 1995, 281-91.
- 212 M. Alves da Silva, C. G. Beddows, M. H. Gil, J. T. Gutrie, A. J. Guiomar, S. Kotov y A. P. Piedade; *Radiat. Phys. Chem.* **35**, 1990, 98-101.
- 213 J. Bo y X. Ming; *Eur. J. Polym.* **28**, 1992, 827-30.
- 214 K. Nilson, I. Skúladóttir y B. Mattiasson; *Biotech. Appl. Biochem.* **16**, 1992, 182-87.

- 215 M. Otamiri, P. Adlercreutz, B. Mattiasson; *Biotechnol Appl. Biochem.* **13**, 1991, 54-64.
- 216 H. Noritomi, A. Watanabe y H. Kise; *J. Polymer.* **21**, 1989, 147-53.
- 217 K. Mosbach en *Methods in Enzymology*, **137**, 1989.
- 218 (a) J. M. S. Rocha, M. H. Gil y F. A. P. Garcia; *Biocatalysis* **9**, 1994, 157-167.
(b) M. Alves da Silva, H. D. Burrows, S. J. Formosinho, M. H. Gil, A. R. Lourenço, F. J. A. Paula, y A. P. Piedade; *Materials Lett.* **11**, (3,4), 1991, 96-100.
- 219 (a) M. Alves da Silva, M. H. Gil, A. P. Piedade, J. S. Redinha, A. M. Oliveira Brett y J. M. C. Costa; *J. of Polymer Sci. Part A: Polymer Chem.* **29**, 1991, 269-274.
(b) M. Alves da Silva, M. H. Gil y E. Lapa; *J. Appl. Polymer Sci.* **34**, 1987, 871-880.
- 220 T. Omata, T. Lida, A. Tanaka y S. Fukui; *Eur. J. Appl. Microbiol.* **8**, 1979, 143-55.
- 221 S. Fukui y A. Tanaka; *Adv. Biochem. Eng.* **29**, 1984, 1-33.
- 222 H. Maeda, H. Suzuki y A. Yamauchi; *Biotech. Bioeng.* **15**, 1973, 607.
- 223 Y. Tanaka; *ibid.* **24**, 1982, 857.
- 224 F. Yoshii, T. Fujimura y I. Kaetsu; *ibid.* **23**, 1981, 833.
- 225 T. Sato y T. Tosa en *Industrial Application of Immobilized Biocatalysts*, (Eds.) A. Tanaka, T. Tosa, T. Kobayashi, 1993, pp. 3-13
- 226 W. G. Bardsley; *SIMFIT V. 4.0*. A computer program for simulation, curve fitting, statistical analysis and graph plotting using life sciences models. University of Manchester, 1994.
- 227 *Hiperchem TM. V3.0 for windows*. Molecular modeling system. Hipeercube. Inc. and Autodesk, Inc. 1993.
- 228 (a) A. G. Gornall, C. S. Bardawill y M. M. David; *J. Biol. Chem.* **177**, 1949, 751.
(b) H. W. Robinson, C. G. Hogden; *J. Biol. Chem.* **135**, 1940, 707.
- 229 B. F. Erlanger, F. Edel y A. J. Cooper; *Arch. Biochem. Biophys.* **115**, 1986, 206.
- 230 J. M. Guisán, A. Bástida, C. Cuesta, R. Fernández-Lefuente y C. M. Rosell; *Biotechnol. Bioeng.* **38**, 1991, 1144.
- 231 R. M. Blanco, J. M. Guisán y P. Halling; *Biotechnol. Lett.* **11**, 1989, 811.
- 232 R. M. Blanco, J. M. Guisán; *Enz. Micr. Tech.* **11**, 1989, 360-66.
- 233 R. M. Blanco, J. M. Guisán y P. Halling; *Biotechnol. Bioeng.* **40**, 1992, 1092.

- 234 C. Hansch y A. Leo en *Substituent constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology*, (Eds.) Wiley and Sons Inc. 1979.
- 235 V. Kasche en *Proteolytic Enzymes*, (Eds. J. Beynon, J. S. Bond), IRL Press. 1989 cap. 7, p. 128.
- 236 R. Weast (Eds.) *Handbook of Chemistry and Physics*, 1976.
- 237 O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr y R. J. J. Randall, *Biol. Chem.* **193**, 1951, 265.
- 238 (a) A. R. Alcántara, J. V. Sinisterra, C. Torres, J. M. Guisán, M. H. Gil y A. Williams; Congreso Internacional *Biocatalysis in Non-Conventional Media*, (Eds.) J. Tramper 1992.
- (b) A. R. Alcántara, J. V. Sinisterra, C. Torres, P. Romanelli, M. y A. Williams; Congreso Internacional de *Stability and Stabilization of Enzymes*, (Eds.) W. J. J. Van den Tweel, A. Harder y R. M. Buitelaar, Nereland, 1993, 167-174.
- 239 M. Arroyo (Tesis Doctoral) en *Síntesis de ácidos 2-arilpropiónicos homóquiraes mediante la esterificación enantioselectiva catalizada por lipasas inmovilizadas*, Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Farmacia, 1995, pp. 77-78.
- 240 W. Kauzman; *Adv. Protein, Chem.* **14**, 1959, 1-63.
- 241 C. Tandford; *Adv. Protein, Chem.* **23**, 1968, 121-82.
- 242 Y. L. Khmelnskiy, A. V. Levashov, N. L. Klyanchko y K. Martinek; *Enz. Microb. Technol.* **10**, 1988, 710-724.
- 243 J. P. Henley y A. Sadana; *Enz. Microbiol. Technol.* **7**, 1985, 50.
- 244 (a) V. Y. Levitsky, N. S. Melik-Nubarov, V. A. Siksnis, V. Y. Grinberg, T. V. Burova, A. Levashov y V. V. Mozhaev; *Eur. J. Biochem.* **219**, 1994, 219-30.
- (b) V. Y. Levitsky, A. A. Panova y V. V. Mozhaev; *Eur. J. Biochem.* **219**, 1994, 231-36.
- 245 T. Diego, P. Lozano y J. L. Iborra; *III Congreso Ibérico de Biotecnología*, (Eds.) F. Fernández- Polanco et al. Valladolid, 1996, pp. 573-74.
- 246 M. J. Hernáiz, M. Rúa, B. Celda, P. Medina, J. V. Sinisterra y J. M. Sánchez-Montero; *Appl. Biochem. Biotech.* **44**, 1994, 213-29.
- 247 J. M. Guisán, R. M. Blanco, A. Bastida, R. Fernandez-Lafuente, C. Cuesta, P. J.

- Halling; *Ann N. Y. Acad. Sci.* **672**, 1992, 158-166
- 248 M. Arroyo, J. M. Moreno y J. V. Sinisterra; *J. Mol. Catal.* **83**, 1993, 261-71.
- 249 (a) M. J. Cabezas (Tesis Doctoral) en *Síntesis de análogos de aminoácidos y estudio de la alteración del centro activo de la α -quimotripsina modificada*, Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Farmacia, 1993.
(b) V. Cerovsky y H.-D. Jakubke; *Enz. Microb. Technol.* **16**, 1994, 596-601.
(c) G. Ljunger, P. Adlercreutz y B. Mattiasson; *Biocatalysis* **7**, 1993, 279-88.
- 250 Novo enzymes preliminary product information sheet B 347-GB, 400, Junio 1986.
Novo Industri A/S, Novo Alle DK-2880 (Bagsvaerd, Dinamarca)
- 251 P. Clapés, P. Adlercreutz y B. Mattiasson; *Biotechnol. Appl. Biochem.* **12**, 1990, 376-386.
- 252 (a) V. Schellenberger, U. Schellenberger, Y. V. Mitin y H.-D. Jakubke; *Eur. J. Biochem.* **187**, 1990, 163-167.
(b) B. West y C.-H. Wong; *Chem. Soc. Chem. Commun.* 1986, 417-18.
(c) V. Schellenberger, K. Braune y H.-D. Jakubke; *Eur. J. Biochem.* **199**, 1991, 623-636.
- 253 H. F. Gaertner, T. Watanabe, J. V. Sinisterra y A. J. Puigserver; *J. Org. Chem.* **56**, 1991, 3149-53.
- 254 V. Kasche, U. Haufler, L. Riechmann *Methods in Enzymology*, **136**, 1987, 280-92.
- 255 V. V. Mozhaev, Y. L. Khmelnsky, M. V. Sergeera, A. B. Belova, N. L. Klyachko, A. V. Levashov y K. Martinek; *Eur. J. Biochem.* **184**, 1989, 597-602
- 256 R. M. Blanco, P. J. Halling, A. Bastida, C. Cuesta, J. M. Guisán; *Biotechnol. Bioeng.* **39**, (1), 1992, 75-84.
- 257 Y. L. Khmelnsky, F. K. Dien, A. N. Semenov, K. Martinek; *Tetrahed.* **40**, (21), 1984, 4425-32.
- 258 E. R. P. Van, E. O. Kamenskaya, Y. L. Khmelnsky; *Eur. J. Biochem.* **202**, 1991, 379-84.
- 259 (a) V. P. Tochilin, A. V. Maksimenko, V. M. Smirnov, I. V. Berezin, A. M. Klivanov, K. Martinek; *Biochem. Biophys. Acta.* **567**, 1979, 1-11.
(b) K. Moriya, K. Tanizawa, Y. Kanacka; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **162**,

- 1989, 408-14.
- (c) S. S. Wong y C. J. L. Wong; *Enz. Microb. Technol.* **14**, 1992, 866.
- 260 C. Laane, S. Boeren, K. Vos, C. Veeger; *Biotechnol. Bioeng.* **30**, 1987, 81-87.
- 261 A. M. Klivanov; *Annal. Biochem.* **93**, 1979, 1-25.
- 262 M. T. Martín, J. V. Sinisterra, A. Heras; *J. Mol. Catal.* **80**, 1993, 127-36.
- 263 (a) G. Soler, R. M. Blanco, R. Fernández-Lafuente, C. M. Rosell y J. M. Guisán; *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **750**, 1995, 349-56.
- (b) R. M. Blanco, G. Soler, A. Bastida y J. M. Guisán; *III Congreso Ibérico de Biotecnología*, Eds. F. Fernández-Polanco, P. A. García Encina y cols. Valladolid 1996, 563-64.
- 264 (a) K. Dabulis, A. M. Klivanov; *Biotech. Bioeng.* **41**, 1993, 566-71
- (b) P. Sabuquillo, G. Soler, R. M. Blanco, y J. M. Guisán; *III Congreso Ibérico de Biotecnología*, Eds. F. Fernández-Polanco, P. A. García Encina y cols. Valladolid 1996, 557-58.
- 265 R. M. Blanco, J. L. L. Rakels, J. M. Guisán y P. J. Halling; *Biochim. Biophys. Acta.* **1156**, 1992, 67-70.
- 266 A. Dominguez, N. Cabezas, J. M. Sánchez-Montero y J. V. Sinisterra; *Tetrahed.* **51**, (6), 1995, 1827-1844.
- 267 H. Kise y Hayakaw; *Enz. Microb. Technol.* **13**, 1991, 584.
- 268 M. Reslow, P. Adlercreutz y B. Mattiasson; *Appl. Microbiol. Biotech.* **26**, 1987, 1-8.
- 269 P. J. Halling; *Biotech. Bioeng.* **35**, 1990, 691-701.
- 270 (a) V. P. Torchilin, A. V. Maksimenko, V. M. Smirnov, I. V. Berezin, A. M. Klivanov y K. Martinek; *Biochem Biophys Acta.* **567**, 1979, 1-11.
- (b) M. H. Remy, C. Bourdillon y D. Thomas; *Biochim. Biophys. Acta.* **829**, 1985, 69-75.
- 271 J. M. Moreno, J. V. Sinisterra y A. Ballesteros; *J. Mol Catal.* **62**, 1990, 341-351.
- 272 M. Y. Gololobov, T. L. Voyushina y P. Adlercreutz; *Biocatalysis in Non-Conventional Media*, (Eds.) J. Tramper Elsevier Science. 1992, p. 434-442.
- 273 L. Gubicza; *Biocatalysis in Non-Conventional Media*, (Eds.) J. Tramper Elsevier Science 1992, p. 497-504.

- 274 (a) H. H. Weetall; *Appl. Biochem, Biotech.* **41**, 1993, 157-88.
(b) E. Whetje, P. Adlercreutz, B. Mattiasson; *Biotech. Bioeng.* **41**, 1993, 171-78.
- 275 G. E. Hein, R. B. McGriff y C. Niemann; *J. Am. Chem. Soc.* **82**, 1960, 1830.
- 276 S. G. Cohen y R. M. Schultz; *J. Biol. Chem.* **243**, 1968, 2607.
- 277 29.- B. Belleau y R. Chevalier; *J. Am. Chem. Soc.* **90**, 1968, 6864.
- 278 W. B. Lawson; *J. Biol. Chem.* **242**, 1967, 3397.
- 279 A. D. Mighell y R. A. Jacobson; *Acta Cryst.* **17**, 1964, 654.
- 280 Y. Hayashi y W. B. Lawson; *J. Biol. Chem.* **244**, 1969, 4158.
- 281 J. H. Heideman y E. T. Kaiser; *J. Am. Chem. Soc.* **90**, 1968, 1860.
- 282 P. Tobias, J. H. Heideman, K. W. Lo, E. T. Kaiser y F. J. Kézdy; *J. Am. Chem. Soc.* **91**, 1969, 202.
- 283 J. H. Udding, J. Fraanje, H. Hiemstra y W. N. Speckamp; *Tetrah. Asym.* **4**, (3), 1993 425-432.
- 284 D. H. Kim, Y. J. Kim; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **3**, (12), 1993, 2681-84.
- 285 R. Chenevert y M. Desjardins; *Can. J. Chem.* **72**, 1994, 2312.
- 286 K. Oshima, Y. Tomiuchi y H. Kise; *J. Jpn. Oil Chem. Soc.* **41**, (11), 1992, 1141-43.
- 287 G. Ahmed y E. Vulfson; *Biotech. Lett.* **16**, (4), 1994, 367-372.
- 288 K. Tanizawa, H. Yamada, K. Itho y Y. Kanoaka; *Chem. Pharm. Bull.* **39**, (10), 1991, 2748-49.
- 289 B. Nielsen, H. Fisher, B. Ebert; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **3**, (1), 1993, 107-14.
- 290 (a) M. J. Cabezas, C. Del Campo, E. Llama, J. V. Sinisterra y H. Gaertner. *J. Mol. Catal.* **71**, 1992, 261-78.
(b) J. F. Bello, E. F. Llama, C. del Campo, M. J. Cabezas, J. V. Sinisterra, M. S. Arias; *J. Mol. Catal.* **78**, 1993, 91-110.