

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



---

---

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA

EFECTO DE LA TEMPERATURA Y DISOLVENTES  
ORGÁNICOS SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA LACASA  
DE *Myceliophthora thermophila* MODIFICADA CON  
POLIETILENGLICOL

T E S I S  
PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A

JAVIER ISIDORO LÓPEZ CRUZ

DIRECTOR

DR. GUSTAVO VINIEGRA GONZÁLEZ

CO-DIRECTOR

DR. ANDRÉS HERNÁNDEZ ARANA

ENERO DE 2007

---

*El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana, está incluido en el Padrón Nacional de Posgrado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)*

*El presente trabajo se llevó a cabo en los laboratorio de Biología Molecular de Hongos Filamentosos del Departamento de Biotecnología W-104 y en el laboratorio de Biofísicoquímica R-207, del Departamento de Química de la UAM- Iztapalapa.*

*El alumno de Doctorado Javier Isidoro López Cruz recibió el apoyo económico del CONACYT, con el registro de becario número 169790.*

---

México, D.F. a 4 de enero de 2005

El jurado designado por la  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

**EFEECTO DE LA TEMPERATURA Y DISOLVENTES ORGÁNICOS SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA  
LACASA DE *Myceliophthora thermophila* MODIFICADA CON POLIETILENGLICOL**

que presentó el alumno:

**Javier Isidoro López Cruz**

**Comité Tutorial**

**Director:** Dr. Gustavo Viniegra González

*Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa*

**Co-Director:** Dr. Andrés Hernández Arana

*Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa*

**Asesor:** Dr. Jorge Soriano Santos

*Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa*

**Jurado**

**Presidente:**

Dr. Octavio Loera Corral

*Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa*

**Secretario:**

Dr. Jorge Soriano Santos

*Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa*

**Vocal:**

Dr. Andrés Hernández Arana

*Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa*

**Vocal:**

Dr. Rafael Vázquez Duhalt

*Instituto de Biotecnología UNAM*

---

## **Agradecimientos:**

### *A MIS PADRES:*

*Luisa Cruz Victoria y Teodoro López Martínez, por su apoyo y su ejemplo, que me motivaron a seguir preparándome constantemente.*

### *A MI ESPOSA*

*Que siempre me impulsa con su amor, cuidados y sus palabras de aliento, que siempre tiene confianza en mí y que es mi bandera para seguir adelante.*

### *A MIS HERMANOS:*

*de los cuales he aprendido, que el trabajo constante y la perseverancia son las vías para alcanzar las metas*

*Al Dr. Andrés Hernández Arana, como un modelo de asesor y amigo, por su atención sus sabios consejos para el diseño experimental, preparación de este escrito y por permitirme realizar mi trabajo de investigación con abinco, perseverancia y paciencia en el laboratorio de Biofisiocoquímica. Agradezco a sus colaboradores Dr. Arturo Rojo y Dra. Jacqueline Padilla, por su ayuda en la Homología comparativa de la enzima y a mis compañeros del laboratorio de Biofisiocoquímica.*

*Al Dr. Gustavo Viniestra González, por su crítica fina en este escrito y el apoyo que me brindó para efectuar mis experimentos, que me permitieron formar parte de su grupo de trabajo y muy especialmente por su amistad.*

*Al Dr. Rafael Vázquez Dubalt, por la valiosa cooperación y aporte para realizar la reacción de modificación, que es parte central de esta tesis y Al Dr. Jorge Soriano Santos y Dr. Octavio Loera Corral, por sus comentarios y adecuaciones a esta tesis.*

*A mis grandes amigos del Laboratorio de Biotecnología de Hongos Comestibles Prof. José Ma. Barba Chávez, que me ha permitido desenvolverme como investigador y principalmente por su amistad, apoyo y confianza. A la Profa. Frida Malpica Sánchez, Juan Manuel García Olvera, Vladimir Teodoro Castañeda de León, Ángel Eduardo Márquez y Francisco Villaseñor Ortega por sus valiosos aportes y su amistad.*

*Muchas Gracias...*

	<b>PAGINA</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>6</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>8</b>
<b>INDICE</b>	<b>9</b>
<b>CAPITULO I : INTRODUCCIÓN</b>	<b>10</b>
• La Catálisis Enzimática en Solventes Orgánicos	<b>10</b>
• El Polietilen glicol (PEG)	<b>15</b>
• Los Hongos Termófilos	<b>19</b>
• La Enzima Lacasa	<b>21</b>
<b>CAPITULO II: ANTECEDENTES</b>	<b>23</b>
• La Importancia de la Enzima Lacasa	<b>24</b>
• Mecanismo de Reacción de la Enzima Lacasa	<b>26</b>
• Sustratos y Mediadores de Óxido-Reducción	<b>30</b>
• La Enzima Lacasa en Solventes Orgánicos	<b>32</b>
• La Importancia del PEG y la Modificación Enzimática	<b>39</b>
• El Análisis por Dicroísmo Circular (DC) y por Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB) en Proteínas	<b>47</b>
<b>CAPITULO III: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>50</b>
• Hipótesis	<b>51</b>
• Objetivo General	<b>52</b>
• Objetivos Particulares	<b>52</b>
<b>CAPITULO IV : MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>53</b>
• La Enzima Lacasa y Los Productos Químicos	<b>54</b>
• Extracción y Purificación de la Enzima Lacasa	<b>54</b>
• Determinación de la Proteína Total (Proteína Unida al Colorante) Bradford	<b>55</b>
• Modificación Química de la Enzima Lacasa con PEG <sub>5000</sub>	<b>55</b>
• Titulación de los Grupos Amino Modificados con PEG <sub>5000</sub>	<b>56</b>
• Ensayo para Estimar las Constantes Cinéticas $K_M$ y $V_{MAX}$ de la Enzima Lacasa M <sub>T</sub> L y M <sub>T</sub> L-PEG <sub>5000</sub> con ABTS y DMP	<b>56</b>
• Determinación del Efecto del pH Sobre la Actividad y	
• Estabilidad de la Enzima Lacasa	<b>57</b>
• Determinación del Punto Isoeléctrico ( $pI$ )	<b>58</b>
• Elaboración de un gel en Condiciones Nativas y en un gel SDS-PAGE para la Enzima Lacasa	<b>59</b>

---

• Actividad Zimográfica de la Enzima Lacasa	62
• Estimación de la Temperatura Óptima de la Enzima Lacasa	62
• Determinación de la Termoestabilidad de la Enzima Lacasa	64
• Dicroísmo Circular (DC) de la Enzima Lacasa	64
• Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	65
<b>CAPITULO V: RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>67</b>
• Purificación de la Enzima Lacasa	68
• Características de la Enzima Purificada	69
• Conjugación con PEG <sub>5000</sub> de la Enzima Lacasa M <sub>tL</sub>	72
• Temperatura Óptima y los Parámetros Cinéticos de M <sub>tL</sub> y M <sub>tL</sub> -PEG <sub>5000</sub>	75
• Estabilidad Térmica de M <sub>tL</sub> y M <sub>tL</sub> -PEG <sub>5000</sub>	79
• Cambios Espectrofotométricos del Sitio Activo	84
• Efecto de la Conjugación con PEG <sub>5000</sub> sobre la Movilidad Electroforética y sobre la Estimación del Peso Molecular (PM)	85
• Efectos de la Conjugación con PEG Analizados por Dicroísmo Circular	86
• Cambios de Entalpía entre M <sub>tL</sub> y M <sub>tL</sub> -PEG <sub>5000</sub> por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	90
• Análisis de Homología de las Estructuras de las Enzimas Lacasa	94
• Modelamiento de la Estructura de la Enzima Lacasa de <i>M. thermophila</i> por Homología	93
<b>CAPITULO IV: CONCLUSIONES</b>	<b>97</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>100-113</b>

---

## RESUMEN

En esta tesis se investigó el efecto de la conjugación en la enzima lacasa (EC 1.10.3.2) con polietilen glicol (PEG) y de su estabilidad frente al calentamiento con diferentes solventes, como el agua y sus mezclas con el metanol, etanol y propanol comparándola con la enzima sin conjugación. La enzima lacasa nativa fue extraída y purificada a partir del polvo Deni Lite IIs, comercializado por la empresa Novo Nordisk y producida a través de la expresión heteróloga del gen de la lacasa del hongo termofílico *Myceliophthora thermophila* (MtL) en el hongo *Aspergillus oryzae* (Berka y col. 1997). La enzima fue conjugada a través del acoplamiento covalente de cadenas de metoxi polietilen-glicol (PM=5000) (mPEG<sub>5000</sub>) y se etiquetó como MtL-PEG<sub>5000</sub>. La enzima nativa tuvo un PM de 80 kDa, que fue determinado por cromatografía de filtración en gel y de 110 kDa por SDS-PAGE. La dimerización oxidativa del 2,6 dimetoxifenol (DMP), para producir la correspondiente dibenzoquinona, fue catalizada por MtL en una forma comparable a las reacciones controladas por difusión ( $k_{cat}/K_M \cong 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  y  $E_a \cong 18 \text{ kJ/mol}$ ). Por titulación de los grupos  $\epsilon$ -amino en los residuos de lisina con el ácido picrúlf sulfónico (TNBS), en la enzima MtL-PEG<sub>5000</sub> se cuantificó que se encuentran bloqueados con mPEG<sub>5000</sub> 54% de los grupos, con lo cual sus propiedades hidrodinámicas y de carga fueron diferentes a las mostradas por la enzima MtL. La eficiencia catalítica ( $k_{cat}/K_M$ ) de la enzima conjugada fue similar a la que se determinó en la enzima original, utilizando como sustrato enzimático el compuesto 2,6-dimetoxifenol (DMP); sin embargo,  $k_{cat}/K_M$  disminuyó 2 veces para la reacción de oxidación catiónica con ácido 2',2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS). El valor de la energía de activación ( $E_a$ ) fue similar en ambas preparaciones cuando se utilizó como medio de reacción un amortiguador de fosfatos 50.0 mM a pH 6.0. La velocidad de inactivación térmica,  $k_i$ , de la enzima siguió la ley de Arrhenius ( $k_i = k_i^0 \exp^{-E_i/RT}$ ). La enzima conjugada fue mucho más estable ( $k_i$  y  $E_i$ , menores), que la nativa, cuando se ensayó en una solución de amortiguador y también resistió mejor el efecto desnaturalizante de los alcoholes de cadena corta (metanol, etanol y propanol). Dichas diferencias de estabilidad, siguen la secuencia: propanol > etanol > metanol. En los espectros de dicroísmo circular (CD) en la región UV-lejano, el comportamiento fue similar para MtL y MtL-PEG<sub>5000</sub>, siendo consistente con el de una proteína rica en estructura de hoja tipo  $\beta$  y con poco contenido de estructura  $\alpha$ -hélice. Se presentó un ligero cambio del espectro DC en la región UV-cercano de la enzima conjugada respecto a la enzima nativa, que fue equiparable con la disminución de la polaridad de las cadenas laterales de los residuos de tirosina cuando se efectuó la conjugación. De

---

forma similar, existió un desplazamiento del espectro del CuT<sub>1</sub>, de una  $\lambda \sim 610$  nm para MtL hacia una  $\lambda \sim 575$  nm para MtL-PEG<sub>5000</sub>. La calorimetría diferencial de barrido (CDB) muestra que las entalpías de desnaturalización son pequeñas (6.3 y 7.5 J g<sup>-1</sup>, para MtL y MtL-PEG<sub>5000</sub>, respectivamente), indicativo de una alta estabilidad de los plegamientos tipo hoja  $\beta$  en las lacasas. Sin embargo la enzima conjugada mostró una mayor estabilidad, ya que el valor de la temperatura media de desplegamiento, que fue 2 °C mas alta que la de la enzima MtL. En alcoholes al 30%, la lacasa pegylada mostró una ligera disminución en la constante de inactivación  $k_i$ , comparado con la enzima original. Este comportamiento fue causado por una disminución en la entropía de activación de la reacción de desnaturalización. Los resultados pueden ser explicados a través de una estabilización entrópica por el PEG debida a restricciones en la movilidad de las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos, lo que provoca un sitio activo más estable.



---

## ABSTRACT

In this thesis we investigated the effect of the different solvents, such as methanol, ethanol and propanol, on the thermal stability on the enzyme laccase (EC 1.10.3.2), native and conjugated with poly(ethyleneglycol). The native laccase was extracted and purified from the dust Deni Lite IIs, commercialized by the company Novo Nordisk and produced through the heterologous expression of the gene of laccase from the thermophilic fungus *Myceliophthora thermophila* (MtL) in *Aspergillus oryzae* (Berka et al., 1997). The enzyme that was conjugated through the covalent binding of chains of poly(ethylene glycol) ( $M_r = 5000$ ) (mPEG<sub>5000</sub>) was labeled PEG<sub>5000</sub>-MtL. The native enzyme was found to have a molecular mass of 80 kDa, as determined by gel filtration, and 110 kDa, by SDS-PAGE. The oxidative dimerization of 2,6-dimethoxyphenol (DMP) to produce the corresponding dibenzoquinone was catalyzed by MtL in a manner comparable to that for a diffusion-controlled reaction ( $k_{cat}/K_M = 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  and  $E_a = 18 \text{ kJ M}^{-1}$ ). PEG-MtL was found, by TNBS titration, to have blocked 54% of lysine groups; its hydrodynamic and charge properties were different from those of MtL. Catalytic efficiency ( $k_{cat}/K_M$ ) of PEG<sub>5000</sub>-MtL was similar to that of MtL with DMP as substrate; however,  $k_{cat}/K_M$  was 2-fold reduced for the reaction in which 2',2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) is oxidized to form a radical cation.  $E_a$  values were similar in both enzyme preparations when assayed in buffered solutions. Far-UV CD spectra were similar for MtL and PEG-MtL and consistent with a protein rich in  $\beta$ -sheet structure with negligible content of  $\alpha$ -helices. A blue shift of near-UV CD spectrum for PEG<sub>5000</sub>-MtL as compared to MtL was consistent with the decreased polarity of the tyrosyl side chains upon PEG conjugation. Also the blue band of the copper active site was shifted from  $\lambda \sim 610 \text{ nm}$  (MtL) to  $\lambda \sim 575 \text{ nm}$  (PEG-MtL). Scanning microcalorimetry showed small denaturation enthalpies (6.3 and 7.5 J g<sup>-1</sup> for MtL and PEG<sub>5000</sub>-MtL, respectively), indicating the high stability of the  $\beta$ -sheet folding pattern of laccases. However, PEG<sub>5000</sub>-MtL proved to be more stable, its half-denaturation temperature being 2 °C higher than that of MtL. In 30% alcohol, pegylated laccase showed slower enzyme-activity decay rates than the unmodified enzyme; this behavior was caused by a decrease in the activation entropy of the denaturation reaction. Results can be explained by entropic stabilization by PEG conjugation because of the restricted motion of some surface amino acid side chains, which results in a more stable active site.

---

# **CAPITULO I: INTRODUCCIÓN**

---

## La Catálisis Enzimática en Solventes Orgánicos

Se ha reconocido por muchos años, el tremendo potencial de las enzimas como catalizadores y en particular, se ha incrementado la explotación de estas biomoléculas en sus diversas fuentes, a través de diversas aplicaciones, lo que ha propiciado que su demanda industrial aumente. Existen datos de una gran cantidad de compuestos que podrían ser sustratos de las enzimas y que son insolubles en agua y por ello su transformación se dificulta, ya que la gran mayoría de las enzimas son principalmente solubles en agua. Sin embargo el agua aún en cantidades bajas, es un ingrediente esencial para la catálisis enzimática, ya que les permite a las enzimas tener movimientos conformacionales indispensables para interactuar con el sustrato y que se realice la catálisis.

Cuando el agua se intercambia por solventes orgánicos hidrofóbicos como medio de reacción, ocurren muchos problemas, porque la actividad catalítica de las enzimas se reduce. Klibanov (2001), ha indicado que en ese caso se requiere de formar una capa acuosa limitante, esencial para la actividad catalítica de las enzimas.

De acuerdo con este concepto, existe una relación entre el nivel de hidratación de una enzima, su movilidad y su actividad enzimática, que es dependiente de la composición de la proteína en términos de la polaridad de las cadenas laterales de algunos residuos de aminoácidos. De manera que hay enzimas que son capaces de llevar a cabo reacciones enzimáticas con cantidades de agua inferiores a las que necesitarían otras, es decir diferentes enzimas tienen distintos requerimientos de agua asociada para mantener una actividad catalítica apreciable en el medio orgánico. La polaridad del solvente que rodea a la enzima, establece una determinada capacidad de remover agua en una enzima y por lo tanto influye en su hidratación; aunque por otra parte las enzimas tienen la capacidad de ligar fuertemente una cierta cantidad de agua, la cual no es removida por solventes; está agua fuertemente ligada a la proteína cuando se encuentra en el medio orgánico no es intercambiable con el agua menos ligada o el agua libre y es la que mantiene la conformación catalítica de la enzima.

La contribución de las interacciones débiles interrelacionadas con la estabilidad de las proteínas, se puede entender, fundamentalmente a través de las propiedades del agua.

---

En el seno de una solución acuosa proteica, existe una compleja red de moléculas de agua unidas por puentes de hidrógeno. La optimización y el acomodo de los enlaces de hidrógeno, alrededor de una molécula con un núcleo hidrofóbico, como es la proteína, tiene como resultado la formación de una capa externa de solvatación de agua altamente estructurada en la vecindad inmediata, lo que produce un ligero descenso en la entropía del agua. La asociación entre grupos polares o hidrofóbicos induce la reducción de esta capa de solvatación estructural y por lo tanto se producirá un aumento favorable hacia la entropía, por esta razón las cadenas laterales hidrofóbicas de aminoácidos tienden a empaquetarse en el interior de la proteína evitando su interacción con el medio acuoso.

También, las interacciones hidrofóbicas juegan un papel importante en estabilizar la conformación de las proteínas, ya que dentro de éstas se forma un núcleo densamente empaquetado donde concuerdan una cantidad considerable de cadenas laterales hidrofóbicas.

La contribución aparente de un solo enlace hidrógeno en la estabilidad de la estructura nativa enzimática es pequeña. Pero, la presencia de un único grupo con potencial de formación de puente de hidrógeno, sin la pareja adecuada en el interior hidrofóbico de la proteína, puede ser tan destabilizante como para provocar que las conformaciones que presentan estos grupos, sean a menudo imposibles de adoptar termodinámicamente. Por ello la gran cantidad de los “puentes de hidrógeno”, son importantes para la estabilidad de las enzimas en solución y en solventes (Klivanov, 2001).

De ahí que la mejor forma de establecer el nivel de hidratación de una enzima sea a través del parámetro termodinámico llamado actividad del agua ( $a_w$ ) y no como el contenido total de agua en el sistema y por definición la  $a_w$  determina el equilibrio de la distribución de agua entre los componentes del sistema, además la estabilidad de una enzima es fuertemente dependiente de su nivel de hidratación, correlacionado claramente con el valor de  $a_w$ .

Esto refuerza el hecho de que el nivel de hidratación de una enzima sea altamente dependiente de su capacidad de ligar agua, de acuerdo a la composición de las cadenas laterales de los aminoácidos expuestos en la superficie de la proteína y la correlación entre  $a_w$  (o sus parámetros asociados como es la presión parcial de vapor o humedad relativa).

---

La cantidad de agua absorbida por una proteína, ha sido establecida para diferentes proteínas desde hace muchos años y probablemente la enzima que más se ha estudiado en términos de su hidratación es la lisozima (Bull, 1944).

Las isotermas de adsorción de agua típicas de las proteínas tienen formas sigmoidales y pueden dividirse en tres regiones, que corresponden a los estados relativos de ligamiento del agua. En la primera región de la curva ascendente, el agua está fuertemente ligada a la proteína, en esta región se encuentra la llamada monocapa de agua fuertemente ligada (BET), que de acuerdo a las interpretaciones de este parámetro termodinámico para la hidratación de las proteínas, corresponde a la cantidad de agua adsorbida necesaria para completar la primera etapa de hidratación y a partir de ésta se produce un cambio importante en el calor específico de adsorción de agua ( $\Delta H$ ) que está relacionado con la siguiente capa. Además la movilidad de agua es 100 veces menor que en el agua libre, no existe en esta etapa actividad enzimática; porque el agua está tan fuertemente ligada a la proteína de manera que no puede ser removida por solventes, ni aún por los más polares como el etanol. Esta agua no se reparte hacia el solvente y tampoco se intercambia con el agua menos ligada de los niveles superiores de hidratación, cuando la enzima está en un solvente orgánico. En la segunda región de la curva continua, que también es ascendente, se forman y crecen agregados de moléculas de agua hasta cubrir por completo los grupos polares de las cadenas de aminoácidos de la superficie de la proteína. En esta región la movilidad de la proteína aumenta con el grado de hidratación y para lisozima la actividad empieza a manifestarse a partir de un nivel de hidratación de 0.20 g H<sub>2</sub>O/g proteína a niveles más altos de esta etapa. En la última etapa, correspondiente a un nivel de hidratación de 0.38 g H<sub>2</sub>O /g proteína se forma una monocapa verdadera de agua que cubre la superficie de la proteína. A partir de este nivel ocurre la hidratación máxima o completa, el agua va adquiriendo configuración idéntica al agua libre al igual que su capacidad calorífica, y la movilidad de la proteína es total, es decir, despliega movimientos de dominios, los cuales son cruciales para la actividad enzimática mediante eventos que originan fuerzas fluctuantes entre la proteína y el sustrato.

Por lo tanto existen tres estados, que corresponden: al *agua fuertemente ligada*, que es relativamente rígida e inmóvil y no se intercambia con el agua del medio como ocurre con un medio totalmente acuoso. En contraste, el *agua débilmente ligada* y el *agua libre* sí se intercambian en la proteína en medio orgánico. Por otro lado, la capacidad catalítica de la enzima se incrementa con el nivel de

hidratación en el medio orgánico no solo por el incremento de la flexibilidad de la proteína sino también por un aumento en la polaridad del sitio activo.

Por otra parte, el solvente influye en el nivel de hidratación de la enzima de acuerdo a sus características de polaridad (**Tabla 1**). Pero solo a los niveles altos de  $a_w$  (más allá de la zona donde el agua está fuertemente ligada a la enzima, donde el solvente es incapaz de removerla); así, los solventes no polares incrementan la cantidad de agua ligada a la enzima, mientras que los solventes polares la reducen para un mismo valor de  $a_w$ . El agua afectada corresponde a las capas secundarias de hidratación, más allá de la monocapa BET (Halling, 1990).

**Tabla 1. Descripción y parámetros de niveles de hidratación de una proteína, basado en la lisozima.**

Hidratación (gH <sub>2</sub> O/g Proteína)	Hidratación (mol H <sub>2</sub> O/mol Proteín) <sup>a</sup>	Hidratación % H <sub>2</sub> O (p/p)	$a_w$	Comentarios
<0.01	< 8	1.0	<0.02	Agua estructural. Parte crítica de la estructura de la proteína
0.01-0.07	8-56	1.0 –6.5	0.02-0.2	Transición de agua en la superficie ordenada a desordenada. Ligada a grupos polares. No disponible como solvente
0.07-0.25	56-200	6.5-20	0.2-0.75	Aglomeración del agua alrededor de grupos polares, dependiente de la composición de cadenas de aminoácidos. Muchas enzimas despliegan actividad
0.25-0.38	200-304	20-27.5	0.75-0.85	Formación de monocapa verdadera y posterior formación de multicapas. Actividad de lisozima 10% de enzima diluida
> 0.38	> 304	> 27.5	>0.85	Agua libre (no ligada)

(Fenema, 1996)

De este modo, la cantidad de agua ligada a una enzima en un medio orgánico está determinada por la  $a_w$  en cualquier solvente, mientras que la actividad catalítica de la enzima se relaciona con el agua ligada a la enzima independientemente del solvente. La capacidad de solvatar a otras especies químicas, como por ejemplo el sustrato, también varía con la  $a_w$  (Bell y col., 1997).

Es por ello, que se han desarrollado un número de aplicaciones para las enzimas en solventes orgánicos, particularmente en procesos químicos, por ejemplo la síntesis de intermediarios

ópticamente activos, reacciones de trans-esterificación, procesos relacionados con la elaboración de alimentos y saborizantes (**Tabla 2**).

**Tabla 2. Causas de la baja actividad enzimática en solventes orgánicos**

Causa	Observación	Remedio
Limitaciones difusionales	Frecuente	Agitación vigorosa de las suspensiones enzimáticas: Utilizar partículas pequeñas de enzimas
Bloqueo del sitio activo	Responsable de una reducida actividad enzimática	Usar partículas cristalinas para inmovilizar enzimas
Cambio conformacional	Ocurre en la liofilización y en otros procesos de deshidratación enzimática	Usar lioprotectantes y conjugados con PEG
Energía de solvatación desfavorable del sustrato	Es severo con sustratos hidrofílicos, puede ser responsable de la disminución de la actividad en 100 veces	Seleccione el solvente hidrofóbico adecuado para producir la interacción favorable entre el sustrato y solvente
Estado de transición inestable	Considerable si el estado de transición enzimática que se desea es favorecido parcialmente por el solvente	Seleccione el solvente adecuado para producir la interacción favorable con el estado de transición.
Movilidad conformacional Reducida	Es severo si se usan solventes anhidros e hidrofóbicos, debido a la exclusión de la capa de agua limitante de la enzima	Optimizar la actividad de agua ( $a_w$ ); hidratar el solvente, usar aditivos o cosolventes con pequeñas cantidades de agua.
pH no óptimo	Puede ser responsable de la reducción de la actividad de al menos 100 veces	Use amortiguador a pH óptimo con fase orgánica para aumentar la actividad enzimática

La tabla se pueden aplicar como medida de prevención hipotética en preparaciones proteicas liofilizadas, entrecruzamiento enzimático cristalino, enzimas inmovilizadas, enzimas suspendidas en solventes orgánicos, (Klivanov, 1997).

Las nociones que se tenían sobre la enzimología no acuosa eran escasas, porque las enzimas son menos activas en solventes orgánicos. Algunas causas comparativas de baja actividad enzimática en solventes orgánicos respecto a la catálisis acuosa se mencionan en la **Tabla 2**. Cabe señalar, que generalmente las enzimas son solubles en agua, pero insolubles en la mayoría de los solventes orgánicos.

---

Esto conduce a usar a la enzima en agua, en solventes orgánicos y en muchas ocasiones, el resultado es una inherente disminución de la actividad enzimática, que puede deberse a las limitaciones difusionales sobre el sustrato o al cambio conformacional del sitio activo o por impedimento estérico.

La energía de unión entre la enzima y el sustrato, es la mayor fuerza motriz para la catálisis enzimática, pero en medios orgánicos puede ocurrir la desolvatación del sustrato debido al efecto hidrofóbico. Aquí el agua actúa como lubricante, siempre y cuando la enzima exhiba la requerida movilidad conformacional para una catálisis óptima. Las propiedades de un solvente que contribuyen a su capacidad de estabilizar los iones por solvatación, no se comprenden del todo, pero sin duda están relacionadas con la polaridad del solvente. Los solventes polares como el agua, metanol, dimetil sulfóxido y otros, son eficaces para solvatar los iones, pero la mayoría de los éteres e hidrocarburos son muy deficientes para ello.

La polaridad de los solventes suele expresarse en términos de la constante dieléctrica ( $\epsilon$ ), que mide la capacidad de un solvente de actuar como aislante de cargas eléctricas. En general, los solventes con baja constante dieléctrica, como los hidrocarburos, son no polares, mientras que solventes con alta constante dieléctrica, como el agua, son polares.

Cuando se tienen 2 especies electrolíticas, dependen de su carga opuesta en solución, con ello existirá una fuerza de atracción entre ellas, que es inversamente proporcional a la  $\epsilon$ .

Los solventes en general acomodan una pequeña cantidad de agua, a causa de su baja constante dieléctrica; lo que permiten formar múltiples puentes de hidrógeno. Con ello se forman fuertes interacciones electrostáticas, aportando como resultado una mayor rigidez en la proteína, de aquí que estas sean menos activas en solventes anhidros e hidrofóbicos.

### **El Polietilen glicol (PEG)**

Proporcionalmente el agua ligada a las enzimas puede ser reemplazada por compuestos o moléculas que puedan interactuar con una mayor fuerza de unión ó que incrementen el número de interacciones cosoluto-proteína y con ello mimetizen el efecto del agua. Estos compuestos



---

pueden ser por ejemplo el glicerol y el etilen glicol, que también pueden formar múltiples puentes de hidrógeno. Otras estrategias de tipo metodológicas para prevenir la desnaturalización de proteínas durante la deshidratación, es la liofilización en presencia de lioprotectantes: como azúcares, PEG, sales inorgánicas (KCl), formar enlaces con éteres o inclusive, complejos de enzimas con detergentes, que coexistan solubles en solventes a través de moléculas anfifílicas, por medio de las cuales las enzimas adopten conformaciones similares a las nativas, pero ahora con estos complejos. Ejemplo de este último tipo de complejos es la conjugación o derivatización enzimática con PEG, motivo de esta investigación.

El PEG es un polímero hidrofílico biocompatible y no tóxico, de fórmula general  $H(OCH_2CH_2)_nOH$ . Su peso molecular varía entre los 200 a 20000 Da y por ello tiene un amplio rango de solubilidades, dependiendo del tamaño de su cadena hidrocarbonada (Zalipsky, 1995). Se ha demostrado que la conjugación con PEG en su forma monometoxilada con proteínas y/o péptidos, incrementa significativamente su duración como agente biológico.

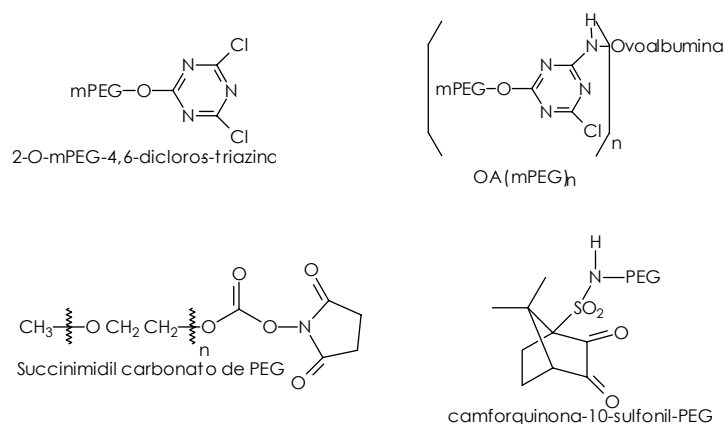
Este compuesto es un polímero similar a los carbohidratos de una glucoproteína. El PEG provee una cubierta protectora que incrementa el tamaño de la molécula, y también reduce su degradación metabólica. La modificación de las proteínas con polímeros anfifílicos como el PEG, ya es usada ampliamente para impartir nuevas propiedades a las proteínas, como, aumentar la solubilidad en solventes orgánicos. También se ha utilizado ampliamente en el campo de la farmacéutica como acoplante protector de fármacos en la sangre, ya que reduce la inmunogenicidad, antigenicidad y no es biodegradable, pues se conserva por un largo tiempo en plasma y permite que los productos sean transportados a través de las membranas de la célula. Pero una vez asimilado el fármaco el enlace se hidroliza y el PEG es rápidamente excretado (Greenwald y col., 1996).

Si se aplica el PEG, para el caso de las proteínas, el grupo  $\epsilon$ -amino de los residuos de la lisina en las proteínas, es generalmente el sitio blanco de los procesos de conjugación del PEG. Estos grupos amino son los más reactivos a valores de pH alcalinos, que es una condición para que se realice la reacción de conjugación; el  $pK_a$  del grupo amino permite que éste se encuentre desprotonado a un pH elevado. La proteína empleada y su estabilidad dictan el pH al cual puede llevarse a cabo la conjugación. A pH elevado, la reacción se puede realizar con mayor rapidez, pero

el ión hidróxido en estas condiciones es un nucleófilo competitivo y el PEG activado puede hidrolizarse antes de que ocurra la aminólisis, lo que compromete la generación del conjugado (Greenwald y col., 1996).

Para efectuar la conjugación, el PEG debe estar activado a través de un “agente pegilante”, éste es un grupo funcional en el PEG, capaz de reaccionar con algunos grupos funcionales de la proteína. También es llamado “agente entrecruzante o aclopante”. Se han utilizado moléculas de PEG activados con agentes entrecruzantes, como el succinimidil carbonato y el ester de *N*-hidroxisuccinimidilo, derivados del PEG halo-sustituídos, ésteres sulfonados de PEG, grupos hidrazido, mercapto-PEG, y los cianuril cloruro derivados, entre otros que son menos específicos y menos estables (Zalipsky, 1995).

El PEG preferentemente se usa en su forma monometoxilada (mPEG) y de tamaño 5000 Da (Veronese y col., 2003), aunque se han usado moléculas de PEG que varía en un intervalo de peso molecular de 6000 Da a 20000 Da, con una estabilidad mayor que produce conjugados similares en solución. Para llevar a cabo la conjugación, primeramente se sintetiza el intermediario activo, por ejemplo el 2-*O*-mPEG-4,6-dicloro-*S*-triazina (**Figura 1**), por medio de la reacción del grupo hidroxilo del mPEG con cloruro cianúrico. Este intermediario mPEG activo, es el que puede entonces reaccionar en proporciones apropiadas y de una manera más selectiva con la proteína (Zalipski, 1995), para formar el conjugado con un grado promedio de modificación deseado (Chung-Ja y col., 1987).



**Figura 1.** Derivados PEG- activados para la modificación de proteínas

Las funciones y estrategias de conjugación tienen un fin, dependiendo del uso del producto final de la modificación (**Tabla 3**).

**Tabla 3. Varias clases de conjugados con PEG y sus aplicaciones**

Conjugados de	Propiedades y aplicaciones
Drogas	Solubilidad mejorada, permeabilidad controlada a través de barreras biológicas, liberación controlada.
Ligando de afinidad	Uso en sistemas de partición de dos fases en la purificación y análisis macromoléculas biológicas y células.
Cofactores	Biorreactores continuos y reciclaje de cofactores moleculares
Péptidos	Aumento de solubilidad y análisis conformacional
Proteínas	Resistencia a la proteólisis, reducida inmunogenicidad y antigenicidad, liberación controlada en sangre. Usos: terapéuticos, solubilidad en solventes orgánicos, biorreactores
Sacáridos	Biotransportadores de drogas
Oligonucleótidos y análogos	Resistencia a nucleasas y permeabilidad en la membrana celular
Lípidos	Preparación de injertos de liposomas
Liposomas y partículas	Liberación controlada en sangre
Biomateriales	Trombogeneidad reducida, proteínas reducidas y adhesión en células

(Zalipski, 1995)

Se han conjugado un gran número de biomoléculas (**Tabla 3**), aunque este tipo de reacciones para la estabilización de biomoléculas se ha empleado amplia y preferentemente en las enzimas (Abuchowski, 1977; Chung-Ja y col., 1987; Varalakshmi y col., 1995; Greenwald y col., 1996; García-Arellano y col., 2002; Vandertol-Vanier y col., 2002), ya que aumenta la versatilidad enzimática de los procesos catalíticos del tipo no acuoso, lo cual ha incrementado el interés por explorar un vasto número de enzimas, que se puedan utilizar en los procesos biotecnológicos novedosos.

En este campo, los hongos y en particular los macro y micromicetos, son fuente atractiva para la producción y obtención rápida de las enzimas, gracias a su gran velocidad de crecimiento en invasión sobre materia orgánica. Los hongos pueden ser clasificados de acuerdo al modo de asimilación de los nutrientes como saprofitos, parásitos y simbióticos, de los cuales los hongos más utilizados son los primeros. Otra clasificación aplicada al reino fungi, relaciona su crecimiento

---

con la temperatura, dividiéndose en psicrófilos, mesófilos y termófilos. Los hongos termofílicos son interesantes por su crecimiento a temperaturas altas y es por ello que actualmente son los más importantes para las aplicaciones biotecnológicas, porque pueden producir enzimas con las mismas propiedades de termoestabilidad, lo que facilita los procesos de catálisis.

### Los Hongos Termófilos

Pocas son las especies de hongos que tienen la capacidad de crecer entre los 45 a 55° C y producir enzimas termotolerantes. Quizás a causa de su grado moderado de termofilia y su hábitat, son poco comunes. Considerando que una vasta mayoría de eucariontes no pueden sobrevivir a una exposición prolongada a temperaturas entre los 40 a 45 °C; la habilidad de solo 30 especies de 50,000 registradas, es una propiedad que merece la atención (**Tabla 4**).

Estos hongos constituyen un grupo fisiológicamente heterogéneo de varios géneros: ficomicetes, ascomicetes, hongos imperfectos y micelio invasivos (Maheshwari y col., 2000). La producción enzimática por cepas de diferentes microorganismos ha hecho posible, que la búsqueda sea menos tediosa. Un ejemplo de ello, es la selección de microorganismos termófilos, que provean de proteínas termo tolerantes a la industria (Wiegant, 1992).

En este rubro el hongo termofílico *Myceliophthora thermophila* (telemorfo= *Thielavia heterothallica*), pertenece a estas 30 especies de hongos termofílicos (**Tabla 4**). El hongo *M. thermophila* descrito por Apinis en 1963, también con el nombre de *Sporotrichum thermophile*, se conoce como productor de enzimas como la celulasa y la enzima xilanasa, proteínas con una pronunciada resistencia térmica.

Actualmente, se sabe que el gen que codifica a la enzima lacasa extracelular termo tolerante de este hongo, fue expresado de forma heteróloga en el hongo micomiceto *Aspergillus oryzae* (Berka y col., 1997), hongo con alta velocidad de crecimiento micelial y clasificado como mesófilo. Este buen proceso biotecnológico fue patentado para aumentar la producción de enzima lacasa en una forma comercial llamada Deni Lite IIs.

**Tabla 4. Clasificación taxonómica y temperaturas registradas en hongos termófilos**

Hongos (Nomenclatura)	Otros nombres	T <sub>OPT</sub> (°C)	T <sub>MAX</sub> (°C)
<i>Canariomyces thermophyla</i> (Guarro & Samson)		45	
<i>Chaetomium mesopotamicum</i> (Abdullah & Zora)		45	
<i>Chaetomium thermophile</i> (La Touche)	<i>C. thermophilum</i> , <i>C. thermophilum</i>	45-55	58-61
<i>Coonemeria aegyptiaca</i> (Ueda & Udagawa) Mouchacca	<i>Thermoascus aegyptiacus</i> , <i>Paecilomyces aegyptiaca</i>	40	55
<i>Coonemeria crustacea</i> (Apinis & Chesters) Mouchacca	<i>Thermoascus crustaceus</i> , <i>Paecilomyces crustaceus</i>	40	<60
<i>Coonemeria verrucosa</i> (Yaguchi, Someya et Udagawa)	<i>Thermoascus crustaceus</i>	30-40	55
<i>Corynascus thermophilus</i> (Fergus & Siden)	<i>Thielavia thermophyla</i> , <i>Myceliophthora fergusii</i>	50	60
<i>Dactylomyces thermophilus</i> Sopp	<i>Thermoascus thermophilus</i> , <i>Thermoascus aurantiacus</i>	40-45	
<i>Malbranchea cinnamomea</i> (Oorschot & de Hoog)	<i>Trichothecium cinnamomeum</i> , <i>Malbranchea pulchella</i> var. <i>sulfurea</i>	45	57
<i>Melanocarpus albomyces</i> (Cooney & Emerson)	<i>Thielavia</i> o <i>Myrococcum albomyces</i>	45	57
<i>Melanocarpus thermophilus</i> (Abdullah & Al-Bader)	<i>Thielavia minuta</i> var <i>thermophyla</i>	35	50
<i>Myceliophthora hinnulea</i> (Awao & Udagawa)		40-45	>50
<b><i>Myceliophthora thermophila</i> (Apinis) van Oorschot</b>	<b><i>Sporotrichum thermophilum/thermophile</i>, <i>Chrysosporium thermophilum</i>, <i>Myceliophthora indica</i>, <i>Corynascus heterothallicus</i></b>	<b>45-50</b>	<b>55</b>
<i>Myriococcum thermophilum</i> (Fergus) van der Aa		45	53
<i>Paecilomyces varioti</i> Bainierb		50	55
<i>Rhizomucor miehei</i> (Cooney & Emerson) Schipper	<i>Mucor miehei</i>	35-45	57
<i>Rhizomucor pusillus</i> (Lindt) Schipper	<i>Mucor pusillus</i>	35-45	55
<i>Scytalidium thermophilum</i> (Cooney & Emerson)	<i>Torula thermophila</i> , <i>Humicola grisea</i> var. <i>thermoidea</i> , <i>Humicola insolens</i>	40	58
<i>Stilbella thermophila</i> Fergus		35-50	55
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	<i>Thermoascus aurantiacus</i> sensu Cooney & Emerson ( <i>misapplied name</i> )	49-52	61
<i>Thermomyces ibadanensis</i> Apinis & Eggins		42-47	61
<i>Thermomyces lanuginosus</i> Tsiklinskaya	<i>Humicola lanuginosa</i>	45-50	60

**Tabla 4. Clasificación taxonómica y temperaturas registradas en hongos termofilicos (continuación)**

Hongos (Nomeclatura)	Otros nombres	T <sub>OPT</sub> (°C)	T <sub>MAX</sub> (°C)
<i>Thermomyces stellatus</i> (Bunce) Apinis	<i>Humicola stellata</i>	40	50
<i>Thielavia terrestris</i> (Apinis) Malloch & Cain	<i>Allescheria terrestris</i> , <i>Acremonium alabamensis</i>	40-45	52
<i>Talaromyces byssochlamydioides</i> Stolk & Samson	<i>Paecilomyces byssochlamydioides</i>	40-45	>50
<i>Thielavia australiensis</i> Tansey & Jack		35-40	50
<i>Thielavia pingtungia</i> Chen K.-Y. & Chen Z.-C.		40	>50
<i>Talaromyces emersonii</i>	<i>Geosmithia emersonii</i> ; <i>Talaromyces duponti</i>	40-45	55
<i>Talaromyces thermophilus</i>	<i>Penicillium duponti</i>	45-50	60

(Maheshwari y col., 2000)

### La Enzima Lacasa

Las enzimas lacasas son cuproproteínas que catalizan la oxidación de una variedad de compuestos fenólicos, concomitantemente a la reducción de O<sub>2</sub> hasta H<sub>2</sub>O. Esta enzima (EC. 1.10.3.2), pertenece al grupo de las oxidasas de polifenoles (Thurston, 1994) y se encuentra presente en plantas superiores, tales como *Rhus vernicifera*, *Rhus sucedánea*, *Lactarius piperatus* y *Prunus persica*, en cultivos de tejidos vegetales de *Acer pseudoplatanus* y en el xilema del pino *Pinus taeda* (Sato y col., 2001). En familia de los hongos tales como *Polyporus versicolor*, *Pholiota*, *Podospora anserina* *Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans* y *oryzae*, en *Coprinus cinereus*, hongos de pudrición blanca y *Pyricularia oryzae* (Gardiol y col., 1998) y en hongos del género *Pleurotus*, *Agaricus* y *Lentinula*. Algunos reportan la presencia de lacasas en insectos, por ejemplo la enzima presente en la hemolinfa del mosquito *Anopheles stephensi*, aunque esto se ha tratado con precaución ya que probablemente no sea una lacasa (Sidjanski y col., 1997). La enzima lacasa puede excretarse al medio donde crecen las hifas, que agrupadas forman colonias del hongo llamadas micelio del hongo y degradar la lignina de la madera, en ausencia de las enzimas lignino peroxidasa y manganeso peroxidasa, enzimas que generan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, producen moléculas altamente reactivas y por lo tanto tóxicas (Heinzkill y col., 1998), por lo que el micelio del hongo debe protegerse, función también asociada con la lacasa, promoviendo la polimerización estos compuestos antes de que entren a las hifas del hongo.

Por lo anterior la enzima lacasa es una de las más investigadas, desde el punto de vista evolutivo, porque tiene una actividad ligada a tres diferentes sitios con cobre que poseen diferentes estados de oxidación.

---

El sitio catalítico con un proceso evolutivo temprano, en las enzimas lacasas, proveniente de diversas fuentes fúngicas, muestra mucha divergencia y muchos investigadores las agrupan con base en sus sitios catalíticos, aunque todavía existe discordancia en su clasificación. El sitio catalítico en las enzimas lacasas de muchos hongos parece conservado, aunque comparativamente el resto de la molécula muestra una variabilidad muy amplia que se estudiará en la siguiente capítulo.

---

# **CAPITULO II:**

# **ANTECEDENTES**



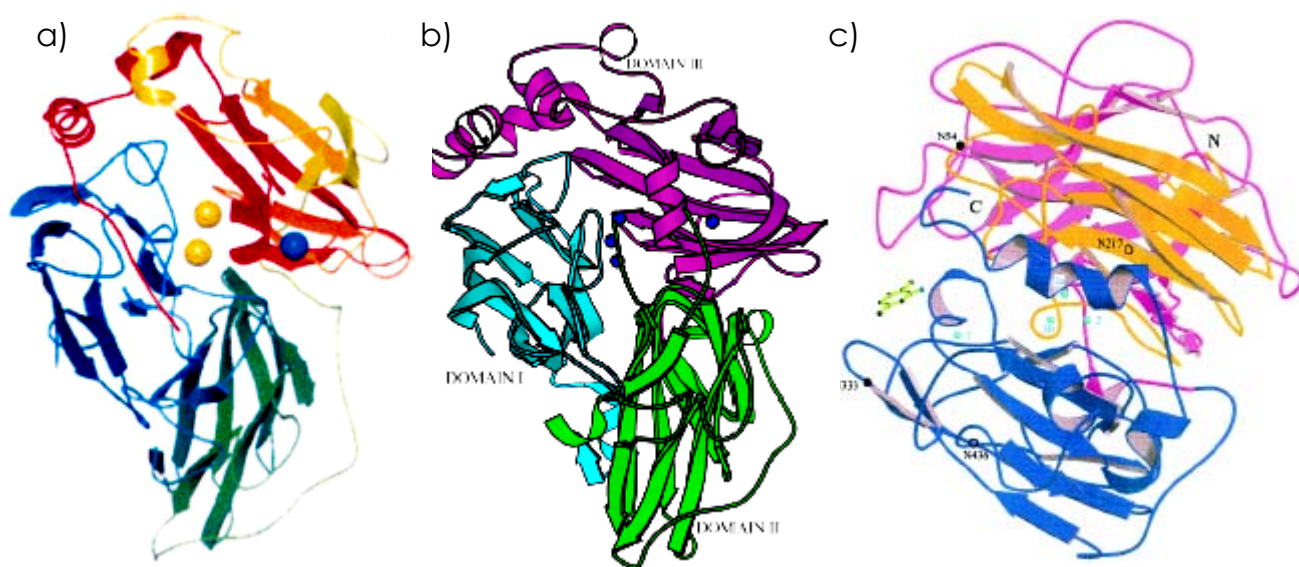
---

## La Importancia de la Enzima Lacasa

La enzima lacasa pertenece a las enzimas multicúpricas, en las cuales se incluyen otras enzimas como la ascorbato oxidasa y la ceruloplasmina. La enzima lacasa fue primeramente descrita por Yoshida (1883) y fue caracterizada como una oxidasa metálica por Bertrand (1985), esto la coloca como una de las enzimas más antiguamente descritas. La enzima lacasa ha sido involucrada en diversos procesos biológicos y metabólicos, como es la pigmentación conidial (Clutterbuck, 1972), la degradación de lignina, la patogenicidad y la formación de cuerpos fructíferos (Leatham y Stahmann, 1981). Forma parte de las reacciones de polimerización para la construcción de las paredes celulares en las plantas, aunque también esta vinculada con la degradación de la pared celular de las plantas por acción y crecimiento de los hongos, otras funciones de la enzima son la esclerotización de insectos, la melanización bacterial y la virulencia relacionada con la melanina en humanos (Williamson, 1994). Entre sus aplicaciones biotecnológicas se pueden mencionar, el bioblanqueamiento de la pulpa de papel (Reid, 1991), la detoxificación de suelos y aguas contaminadas, bioremediación (Ruggiero y col., 1989), la clarificación de los vinos (Lante y col., 1992) la producción de alcohol a través de la expresión de forma heteróloga en levaduras (Larsson y col., 2001), la interconversión de intermediarios químicos (Agematu y col., 1993), la producción de químicos a partir de la lignina (Sannia y col., 1986) y su uso como biosensor para el monitoreo de la oxidación e identificación de fármacos en el organismo (Bauer y col., 1999). Se ha documentado la presencia de lacasas en varios de los hongos, que también se han clonado, secuenciado y depositado numerosas secuencias de enzimas lacasas en genotecas. En muchas especies de hongos la presencia de esta enzima puede ser constitutiva o inducible. Usualmente las lacasas se procesan en el citoplasma, pero en otras instancias biológicas se ha reportado la secreción y excreción de éstas al medio.

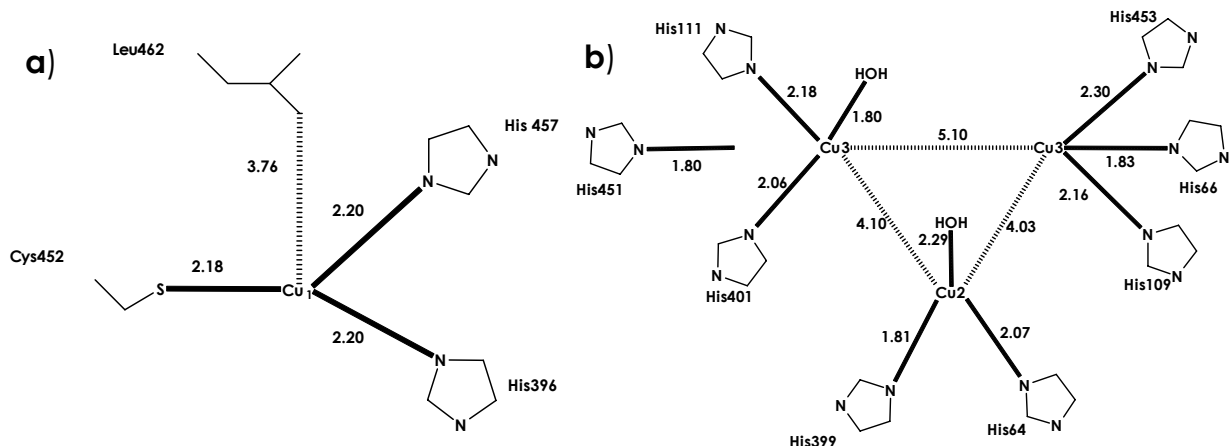
Aunque la estructura del sitio activo parece estar conservada en todas las lacasa, existe una gran diversidad en el resto de la estructura de la proteína y en la cadena glucosídica que la acompañan. En la **Figura 2** se muestra una representación tridimensional. La enzima lacasa contiene cuatro iones cobre (Cu): un Cu tipo 1 ( $\text{CuT}_1$ ) o azul, color que es debido a las uniones covalentes  $\pi$  (Agostinelli y col., 1995) y que absorbe a una longitud de onda 600 nm, un Cu tipo 2 ( $\text{CuT}_2$ ) y dos iones  $\text{Cu}^{2+}$  tipo 3 ( $\text{CuT}_3$ ) acoplados binuclearmente. En sus estados oxidados los  $\text{CuT}_1$  y  $\text{CuT}_2$ ,

exhiben señales específicas en los espectros de resonancia paramagnética de electrones (EPR). Por el contrario hay dos  $\text{CuT}_3$  que no son paramagnéticos.



**Figura 2.** (a) Representación tridimensional de la enzima lacasa de *Coprinus cinereus*. La figura está coloreada desde el N terminal (azul) hasta el C-terminal (rojo). Los átomos cobre se muestran en esferas con el sitio  $\text{CuT}_1$  azul y su par  $\text{CuT}_3$  en amarillo (Mayer y Staples, 2002) y (b) Representación tridimensional de la lacasa de *Rigidoporus lignosus*, los cobres se muestran en forma de esferas color azul (Garavaglia y col., 2004). c) Enzima lacasa de *Trametes versicolor*, el dominio 1 está coloreado de naranja y el dominio 2 de magenta y los Cu en color rosa (Bertrand y col., 2002)

El  $\text{CuT}_1$ , en su estado oxidado, absorbe fuertemente la luz a 610 nm (Andreasson y Reinhammar, 1976), mientras que los  $\text{CuT}_3$  lo hacen a 340 nm (Andreasson y col., 1976). El  $\text{CuT}_1$  está unido a un átomo de azufre perteneciente a un residuo de cisteína, a dos anillos de imidazol de los residuos de histidina y a un azufre del residuo de metionina. El  $\text{CuT}_2$  esta ligado al menos a dos grupos imidazol de los residuos de la histidina (Lu y col., 1992). Los  $\text{CuT}_3$  están enlazados a tres nitrógenos, de los cuales al menos uno es de un grupo imidazol del residuo de la histidina y a un cuarto ligando que puede ser  $\text{H}_2\text{O}$  u  $\text{OH}^-$  (Garavaglia y col., 2004) (**Figura 3**).



**Figura 3.** Representación de los centros Cu, especificando las distancias entre cada átomo relevante. (a) CuT<sub>1</sub> y (b) Esquema del sitio trinuclear CuT<sub>2</sub>/T<sub>3</sub> (Lu y col., 1992).

## Mecanismo de Reacción de la Enzima Lacasa

La enzima lacasa oxida los sustratos, removiendo un electrón a la vez y generando radicales libres, los cuales puede polimerizarse (Bourbonnais y Paice, 1990). Estos electrones de las oxidaciones individuales son almacenados temporalmente en el sitio activo, en su estado totalmente reducido, que así contiene un total de cuatro electrones. De esta forma la enzima puede transferir estos electrones al oxígeno molecular para formar agua (Andreasson y col., 1976).

Durante la oxidación de los sustratos, el CuT<sub>1</sub> es el aceptor primario de electrones y al menos uno de los dos electrones procede de este sitio y que son requeridos para reducir el sitio T<sub>3</sub> aceptor de un par de electrones. La velocidad de la reacción en el sitio CuT<sub>1</sub> es la limitante de la velocidad total de reacción (Andreasson y Reinhammar, 1979).

La fuerza motriz de la reacción de oxidación de la enzima lacasa, está dada por un potencial redox propio en el sitio CuT<sub>1</sub> y un bajo potencial redox del sustrato (Xu, 1996). El CuT<sub>2</sub> es necesario para la oxidación aeróbica del sitio CuT<sub>3</sub> reducido, además de que permite al sitio CuT<sub>3</sub> funcionar

---

como aceptor de dos electrones. El papel del  $\text{CuT}_2$  no ha sido especificado en detalle, se cree que puede participar en la transferencia de uno de los electrones requeridos para reducir el sitio  $\text{CuT}_3$ .

En el mecanismo catalítico de la enzima lacasa, se propone que el  $\text{CuT}_2$  estabiliza a un intermediario en la reducción de  $\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$ ; lo que indican que el  $\text{CuT}_2$  es parte del sitio de reducción del oxígeno en la enzima. Esto sugiere que la inhibición de la enzima a un valor de pH elevado, se debe a la formación de un complejo de  $\text{CuT}_2\text{-OH}$ . En estas condiciones, el sitio  $\text{CuT}_3$  está constituido por un par de Cu no paramagnéticos, que concomitantemente forman el sitio aceptor de dos electrones. Este ión Cu no puede permitir la reducción del sitio  $\text{CuT}_3$ , hasta que el grupo OH se disocie o forme una molécula de agua.

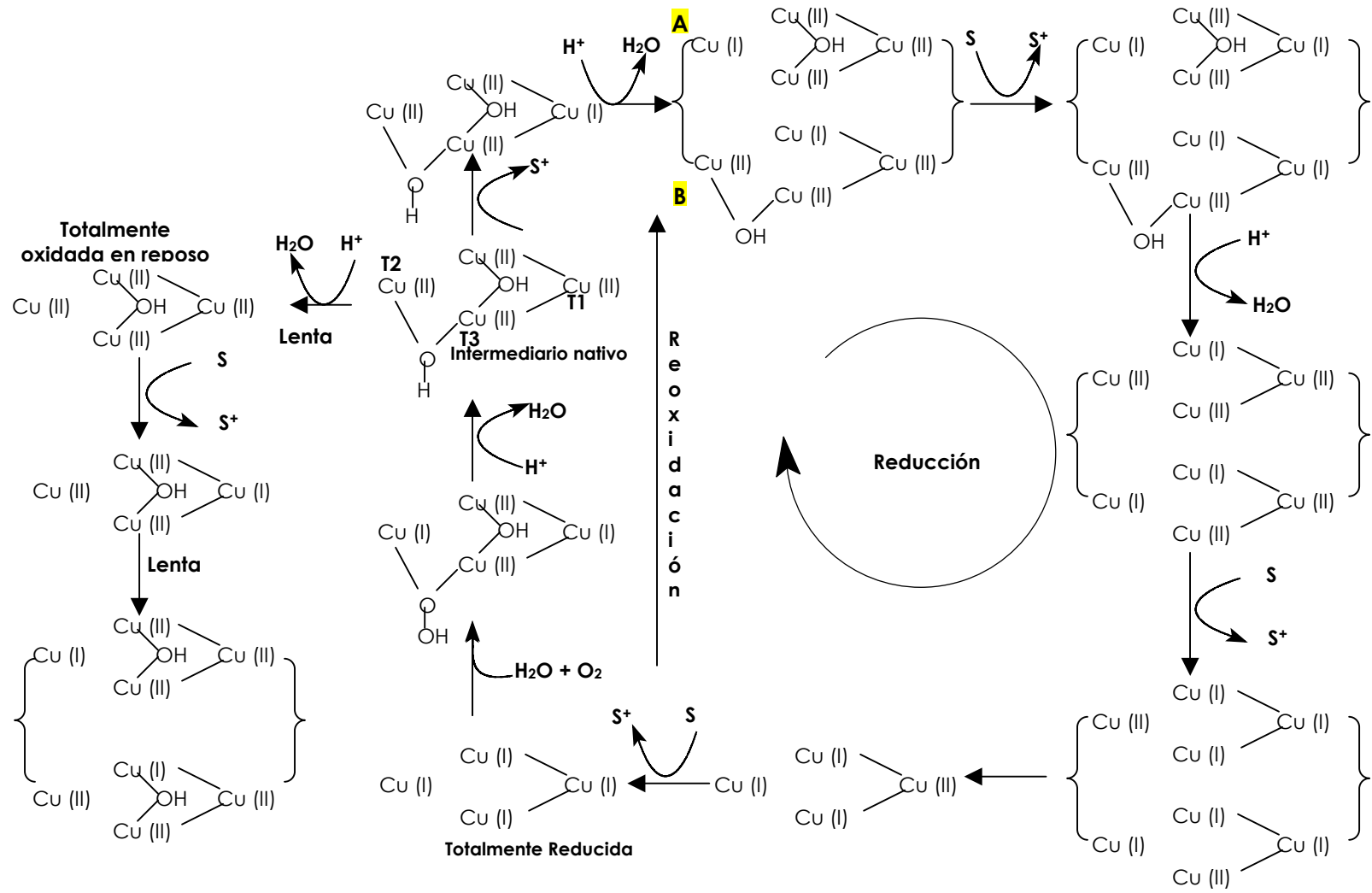
A valores bajos de pH, una de las moléculas de  $\text{H}_2\text{O}$  formadas en la reoxidación de la enzima, que se encuentra en estado reducido, parece enlazada al sitio  $\text{CuT}_2$  y es un ligando intercambiable en este sitio (Andreasson y Reinhammar, 1979). Algunos estudios han indicado, que durante el funcionamiento catalítico en la enzima lacasa, el sitio  $\text{CuT}_3$  se une inicialmente al  $\text{O}_2$  para su posterior reducción con  $4e^-$  a  $\text{H}_2\text{O}$ , vía una reducción del peróxido intermediario con  $2e^-$  (Penner y col., 1984).

La enzima lacasa puede ser inhibida por halógenos ( $\text{F}^- > \text{Cl}^- > \text{Br}^-$ ), porque limitan la accesibilidad a los átomos del sitio  $\text{CuT}_2/\text{T}_3$ , esto también incluye al  $\text{I}^-$ , porque reacciona con el sitio  $\text{CuT}_1$  (Xu, 1996). Existen evidencias de que el  $\text{CuT}_2$ , está involucrado en la interacción de  $\text{O}_2$  con el sitio  $\text{CuT}_3$  (Solomon y col., 1996), ya que una molécula de peróxido se une a un solo Cu en el sitio  $\text{CuT}_3$  en la lacasa, y además que el hidroperóxido, no se une fuertemente en esta geometría sin la presencia del  $\text{CuT}_2$ , el cual aparentemente estabiliza el complejo  $\text{CuT}_3$ -hidroperóxido para su posterior reducción a  $\text{H}_2\text{O}$ .

Andreasson y sus col. (1976), plantearon que en el mecanismo de re-oxidación de la lacasa, el oxígeno recibe tres electrones de la enzima reducida en una reacción rápida y se forma un intermediario de oxígeno, por ejemplo un radical  $\text{OH}^*$ . El  $\text{CuT}_2$  es oxidado más lentamente que los otros dos donadores. La descomposición del intermediario parece estar acoplada a la re-oxidación del  $\text{CuT}_2$ , indicando la transferencia de electrones entre las dos especies con subsecuente formación de  $\text{H}_2\text{O}$ .

---

Se ha realizado una revisión sobre el mecanismo catalítico de la enzima lacasa y se ha propuesto que la velocidad de oxidación del sustrato, es dependiente del potencial reductor de este último, implicando que la transferencia de electrones del sustrato al sitio  $\text{CuT}_1$ , es la etapa que determina la velocidad en el número de recambio. Existen dos posibles mecanismos propuestos (ver **Figura 4**): A) el  $\text{CuT}_1$  transfiere su electrón al  $\text{CuT}_2$  y el  $\text{CuT}_1$  y se reduce nuevamente; a su vez estos dos Cu transfieren sus electrones al  $\text{CuT}_3$ ; el  $\text{CuT}_1$  se vuelve a reducir y transfiere su electrón al  $\text{CuT}_2$ , el  $\text{CuT}_1$  se reduce nuevamente, dando finalmente como resultado la enzima en la forma totalmente reducida. B) El grupo trinuclear es reducido secuencialmente por etapas a la transferencia de electrones del sitio  $\text{CuT}_1$  (el orden en que los tres Cu del sitio trinuclear son reducidos no se conoce aún) (Solomon y col., 1996; Durán y col., 2002).



**Figura 4.** Ciclo catalítico de la lacasa mostrando el mecanismo para la reducción y reoxidación de los sitios del cobre. Dos posibles mecanismos: **A)** T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub> juntos reducen el par T<sub>3</sub>. **B)** Cada cobre en el centro trinuclear es reducido secuencialmente por los electrones transferidos por el sitio T<sub>1</sub>. (Solomon y col., 1996 y Durán y col., 2002).

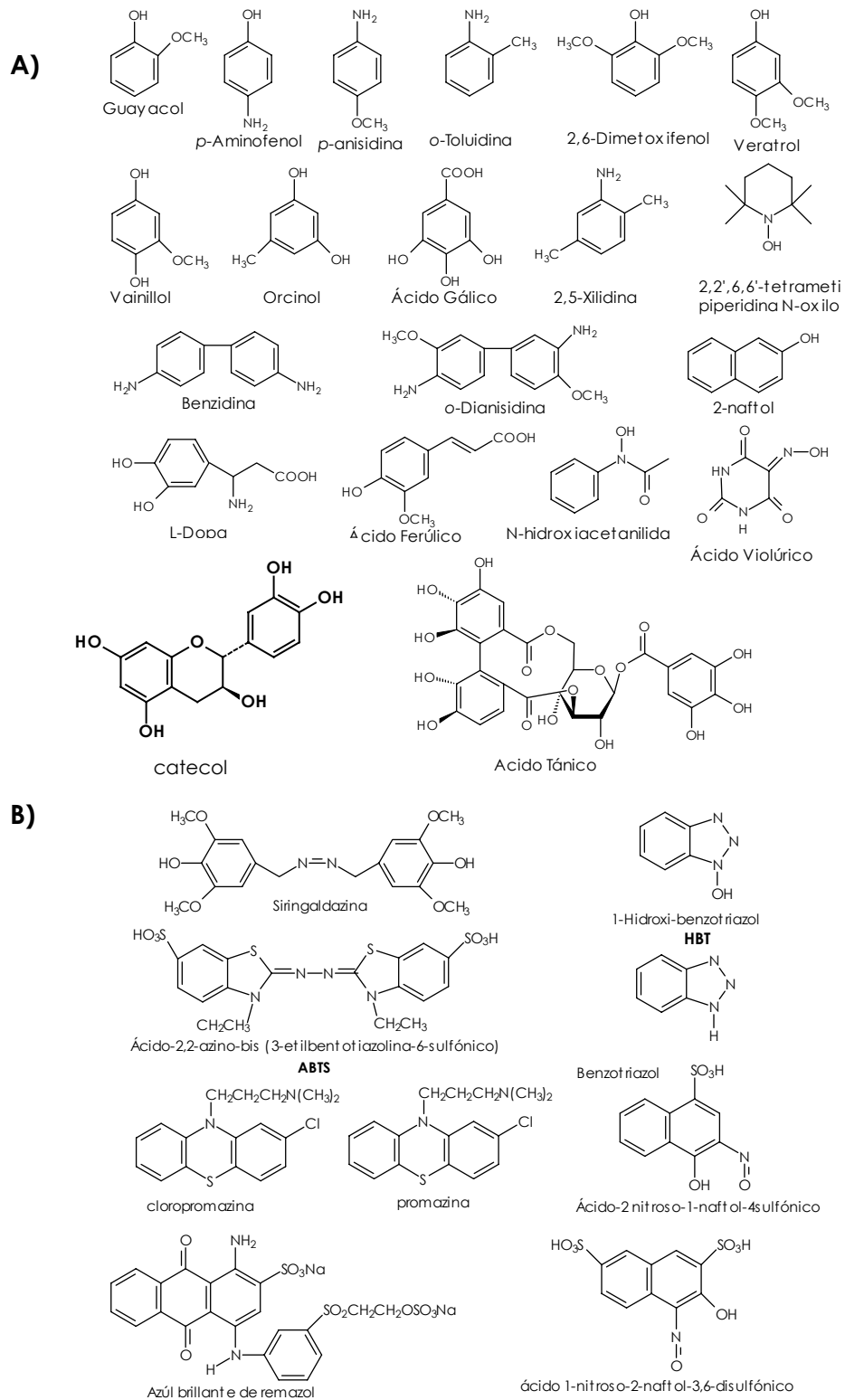
---

## Sustratos y Mediadores de Oxido Reducción.

La lacasa es una polifenoloxidasas que tiene una amplia variedad de sustratos. La enzima ataca polifenoles, fenoles *o* y *p*- metoxi sustituidos, difenoles, hidroquinonas, catecol, guayacol, 2,6-dimetoxifenol (DMP), diaminas, aminofenoles, como la *p*-fenilendiamina y ácido ascórbico, compuestos sintéticos como la [N, N'-bis (3,5-dimetoxi-4-hidroxi-benzilideno hidrazina)] o siringaldazina, el ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbezotialin-6-sulfónico) o ABTS, sustratos específicos de esta enzima; así como la oxidación de varios compuestos con sustituyentes orgánicos diversos.

Otros compuestos oxidables por la enzima lacasa, como las fitoanticipinas, cucurbitacinas y fitoalexinas, que son compuestos que actúan como antibióticos y protectores, presentes en las plantas. (Pezet y col., 1991) (**Figura 5A**).

Por otro lado, un mediador de óxido reducción es un compuesto al cual la enzima le puede sustraer electrones convirtiéndolo en un radical libre, que a su vez oxida otros compuestos dependiendo de su potencial de oxido reducción, sin la participación de la enzima en esta última reacción. Mediante el uso de mediadores de oxido reducción la enzima es capaz de realizar la oxidación de compuestos aromáticos que no puede realizar por sí sola (Bourbonais y col., 1997) (**Figura 5B**).



**Figura 5.** (A) Sustratos oxidables por la enzima lacasa y (B) algunos compuestos mediadores de oxidoreducción sintéticos



---

Recientemente Majcherczyk y Johannes (2000), lograron la oxidación de algunos compuestos hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH), mediante la enzima lacasa de *Trametes versicolor*. Sin mediador la enzima fue capaz de oxidar en cierta proporción los siguientes compuestos, cuya concentración inicial fue de 25 $\mu$ M: acenaftileno 37%, antraceno 18%, benzo [a] pireno 19%, acenafteno 10%, fluoranteno 10%, pireno 8%, benzo[a] antraceno 6%, criseno 10%, benzo[a] fluoranteno 10%, benzo [k] pireno 10% y perileno 10%. Los compuestos que la enzima sola no logró oxidar fueron naftaleno, fluoreno y fenantreno. Sin embargo en presencia del mediador 1-hidroxibenzotriazol (1-HBT) (**Figura 5B**), la enzima oxidó el 100% de acenaftileno, antraceno, benzo[a] pireno, acenafteno, perileno y fluoreno, con un incremento de oxidación de pireno de 8 a 48 % y de benzo[a] antraceno de 6 a 53 %.

La búsqueda de procesos de oxidación en donde la enzima lacasa pueda aplicarse, ha encaminado a efectuar los procesos de oxidación en condiciones complicadas de catálisis. Idealmente en solventes orgánicos, donde la finalidad es la oxidación de sustratos hidrofóbicos, clásicos de esta enzima, en presencia o ausencia de mediadores, y con ello evitar el decremento de la actividad y su desnaturalización.

## La Enzima Lacasa en Solventes Orgánicos

La estabilización de los estados de transición y la especificidad del sustrato para las enzimas, dependen en gran medida de la unión de la enzima con el sustrato y de los componentes catalíticos, que pueden ser afectados por la naturaleza del medio de reacción. Por ejemplo, la presencia de solventes orgánicos en la mezcla de reacción enzimática altera el balance de interacciones hidrofóbicas, comprometiendo la unión del sustrato (*ground state ó estado basal*). Con ello, se ve afectada la energía libre de unión del sustrato con la enzima, siendo la responsable de los grandes cambios tanto en la especificidad del sustrato, como en la enantioselectividad, regioestabilidad y quimoselectividad, que se observan en los diferentes solventes orgánicos.

Las interacciones entre la enzima y el agua que la rodea son cruciales para la catálisis enzimática. En particular cuando a la enzima se le coloca en solventes no acuosos de tipo anhidro, adquiere nuevas propiedades, como una marcada estabilidad, y una alteración de la especificidad del sustrato y la habilidad de catalizar nuevas reacciones. Aunque estos aspectos son comprometedores para el

---

progreso de la bioquímica y de la biotecnología, otros progresos en la enzimología no acuosa, están restringidas por la falta de conocimiento en esta área; específicamente en el papel que juega el agua ligada y libre, asumiendo que en su ausencia, la molécula adquiere una cierta “rigidez”.

Un adecuado contenido de agua en el medio de reacción es crítico y puede optimizar la actividad enzimática. Esto sugiere que el efecto de los solventes orgánicos sobre la enzima, se debe principalmente a las interacciones con la capa limitante de agua que la rodean y que es esencial para la flexibilidad conformacional (Zaks y Klibanov, 1988). Otro problema se relaciona con las interacciones hidrofóbicas entre el sustrato y el solvente y son más difíciles de medir debido al estado hidrofóbico del sitio activo de la enzima (Wangikar y col., 1995).

Una de las aproximaciones más evidentes, es la basada en el uso de mezclas binarias de agua/cosolventes orgánicos que contienen enzimas disueltas o inmovilizadas. Desgraciadamente el uso de esta relación se ve afectada debido a la dificultad de decidir con precisión que solventes se van a usar para la implementación de un proceso biocatalítico.

Para ello Mozaev (1989), formuló un criterio en la década pasada, basado en el efecto desnaturizante que ejercen los solventes hacia la formación de interacciones hidrofóbicas y que son importantes para mantener la conformación nativa de las proteínas, llamada la energía libre de micelización o  $\Delta G_{mic}$ . De acuerdo a este criterio los mejores solventes de las proteínas son el agua, el glicerol y el etilen glicol, pues otros solventes orgánicos actúan como desnaturizantes fuertes. Sin embargo este criterio es en parte creíble, ya que algunos solvente, por ejemplo los alcoholes de cadena alifática corta, no producen la micelización y por ello es imposible determinar el valor de  $\Delta G_{mic}$ .

Khmelnitsky (1991) formuló matemáticamente el proceso de elaboración de un nuevo criterio de selección que puede tener menos limitaciones y que puede medir la hidrofobicidad por métodos físicos, a través del valor del coeficiente de partición ( $P$ ) de las moléculas de cosolvente en un sistema bifásico agua/octanol.

El coeficiente  $P$  es definido como la razón de concentraciones en equilibrio del solvente orgánico en la fase octanol y en la fase acuosa del sistema bifásico ( $P = [\text{cosolv}]_{\text{octanol}} / [\text{cosolv}]_{\text{agua}}$ ).

---

La interrelación claramente indica que valores altos de  $P$  corresponden a cosolventes orgánicos más hidrofóbicos y a un grado más bajo de afinidad entre esos cosolventes y el agua, además de que son más fuertes como desnaturalizantes.

Estos valores puede obtenerse de la literatura. Sin embargo este criterio es solo aplicable a solventes de la misma funcionalidad, por ejemplo alcoholes y polioles. Cuando intervienen solventes de una naturaleza diferente, la correlación no se puede aplicar, por lo cual no puede ser un criterio universal para la selección de solventes.

A partir estos estudios, se supone que tan solo con una delgada capa de agua alrededor de la biocatálisis, es esencial para preservar la estructura tridimensional de la proteína en una forma catalíticamente activa. La actividad enzimática en sistemas no acuosos se correlaciona matemáticamente con el logaritmo del coeficiente de partición ( $\log P$ ) y cuando no, se correlaciona con el parámetro de solubilidad de Hildebrand y la constante dieléctrica. La solubilidad de Hildebrand, esta relacionada con la fuerza total de las interacciones de van der Waals, que se refleja a través de un valor más simple de la solubilidad: el parámetro de la solubilidad de Hildebrand ( $\delta$ ). El parámetro de la solubilidad es un valor numérico que indica el comportamiento relativo de la solvencia de un solvente específico. Se deriva de la densidad cohesiva de la energía del solvente, que a su vez se deriva del calor de la vaporización. El calor de vaporización es la energía requerida para vaporizar el líquido.

Los valores que se derivan de densidades cohesivas de la energía son en calorías/cm<sup>3</sup>, y una más forma más nueva, en unidades internacionales (**SI**), se deriva de presiones cohesivas. La unidad del SI para expresar la presión es el Pa y los parámetros de la solubilidad en el SI de Hildebrand se expresan en MPa (1 mega-PASCAL =1 millón de PASCAL). Este parámetro va aumentando respecto al incremento de polaridad y capacidad de vaporización, así que el agua tendría el máximo valor con 48 MPa (Hildebrand, 1967).

Por otro lado, se ha notado que los solventes con un valor de  $\log P < 2$ , no son favorables para los sistemas enzimáticos, porque causan una fuerte distorsión de las interacciones agua-enzima, que son esenciales para la actividad enzimática. Los solventes con un  $\log P$ , entre 2 y 4 distorsionan

---

débilmente la capa de agua y afectan poco la actividad enzimática. Finalmente los solventes con un  $\log P > 4$ , no son capaces de distorsionar las interacciones agua-enzima, y con ello la biocatálisis se realiza en el estado activo (Vázquez-Duhalt y col., 1992).

Otro criterio que permite evaluar de una manera apropiada, el grado de solvatación de un solvente, es el grado de deshidratación del medio de reacción llamado  $\log C_{50}$ ; donde  $C_{50}$  es la concentración promedio molar de agua residual en una mezcla desnaturizante de agua/cosolvente orgánico, con ello  $C_{50}$  permite una comparación de la eficiencia en la desnaturización de enzimas con solventes de diferente peso molecular en la mezcla y es definido como “umbral de concentración” de cosolvente orgánico a la cual se observa la mitad de la desactivación de la enzima. Así valores bajos de  $\log C_{50}$  corresponden a los mejores cosolventes para la desactivación de la enzima (Mozhaev y col., 1989).

Este criterio fue aplicado por Mozhaev y col. (1989), para medir la dependencia de las actividades catalíticas de las enzimas:  $\alpha$ -quimotripsina, tripsina y la enzima lacasa del hongo *Polyporus versicolor*, en función de la concentración de diferentes cosolventes en mezcla acuosa como son alcoholes, glicoles y formamidas.

Los resultados confirman que la enzima lacasa presentó un  $C_{50}$  de desactivación enzimático aproximado, en las mezclas agua/cosolvente (vol/100 vol), de 2.7 % en acetona, 6.2% en metanol, 5.0% en etanol, 4.4% en propanol, 5.1% en acetonitrilo, 15% en etilen glicol, cuando en las enzimas  $\alpha$ -quimotripsina y tripsina, obtuvieron aproximadamente una unidad porcentual por arriba en todas las mezclas ensayadas.

La polaridad de los solventes también suele expresarse en términos de la *constante dieléctrica* ( $\epsilon$ ), que mide la capacidad de un solvente de actuar como aislante de cargas eléctricas. En general, los solventes de baja constante dieléctrica, como los hidrocarburos, no son polares, mientras que los solventes con alta constante dieléctrica como el agua (80.4), metanol (33.6) etanol (24.3), son polares o también llamados solventes próticos (Mc. Murry, 1993).

En términos de la constante dieléctrica, las propiedades de un solvente que contribuyen a su capacidad de estabilizar los iones por solvatación no se comprenden del todo, pero sin duda están relacionadas con la polaridad del solvente. Los solvente polares, como el agua, metanol,

---

dimetilsulfóxido y otros son eficaces para solvatar iones, pero la mayoría de los ésteres e hidrocarburos son muy deficientes para ello.

En general la actividad catalítica que muestran las enzimas en solventes orgánicos es más baja que en agua, porque los solventes hidrofóbicos tienen una gran tendencia a formar una capa limitante de agua que es poco beneficiosa para la catálisis enzimática y porque las enzimas son insolubles en todos los solventes orgánicos. Los solventes carecen de habilidad de formar múltiples puentes de hidrógeno y con ello proporcionan a las moléculas de enzima mayor rigidez y una reducida flexibilidad estructural (Klibanov, 2001).

La reacción en medio orgánico es usada para promover y controlar la oxidación de sustratos hidrofóbicos. Por ejemplo, para la oxidación del vainillol catalizada por la enzima lacasa, se han utilizado alcoholes de bajo peso molecular, así como dioles y cetonas, pero algunos causan la disminución de la actividad.

Las lacasas en estos solventes generalmente se desnaturaliza y aún así, muchos sustratos han sido oxidados en estas condiciones (Burton, 2003), ya que se presenta la estabilización del “estado basal” del sustrato, llamado también partición favorable del sustrato.

Las investigaciones actuales se han encaminado en determinar directamente la estabilidad de la enzima lacasa purificada en diferentes solventes, con el fin de oxidar compuestos fenólicos, aminas, ácido benzoico y sulfonatos de lignina. Compuestos como el fluoroglucinol, sulfonato de lignina y guayacol, son los sustratos en solución que provocan menos inactivación de la enzima en solución (Mai y col., 2000).

Recientemente, se ha desarrollado un método para estabilizar a la enzima lacasa, mediante el uso de un compuesto surfactante no iónico: el dioleil *N*-D-glucono glutamato. Con el fin de catalizar la oxidación del compuesto *o*-fenilendiamino, se han usado mediadores como el DBT y el ABTS, logrando la catálisis oxidativa realizada en solventes anhidros como: tolueno, isopropil ester, benceno, cloroformo, piridina, alcohol ter-amílico, tetrahidrofurano, dimetoxifenol y 1,4-dioxano. El complejo de enzima-surfactante fue estable en tolueno e isopropil éter (Okazaki y col., 2000), en comparación con los otros solventes ensayados. Este estudio sugirió la formación de conjugados con

---

grupos hidrofóbicos, puede ayudar a la estabilización enzimática, esencialmente si se desea catalizar la oxidación de sustratos complejos e hidrofóbicos en medio orgánico.

Entre los usos potenciales de la enzima lacasa está la oxidación de algunos compuestos tóxicos que son poco solubles como: el catecol, fenantreno, pireno, fluoreno, fluoranteno y benzo[a] pireno. Al respecto el grupo de investigación de Bezabel (1996), emplearon el hongo *P. ostreatus*, para la degradación de estos compuestos hasta obtener CO<sub>2</sub>, responsabilizando a las enzimas, lacasa y manganeso peroxidasa de la oxidación de estos compuestos. El porcentaje de mineralización total atribuido a la enzima lacasa fue de 7.0% de catecol, 3.0% de fenantreno, 0.4% de pireno y 0.19% de benzo [a] pireno, donde el antraceno, fluoreno y fluoranteno, fueron escasamente degradados, 0.2% durante un periodo de incubación de 35 días. Otras aplicaciones efectuadas por Ichinose y su grupo (1999), se dirigieron hacia el estudio de la bioconversión de compuestos recalcitrantes organosulfurados del petróleo, como el 4-metil dibenzotiofeno, utilizando al basidiomicete *Coriolus versicolor*, hongo responsable de la oxidación enzimática de éstos compuestos aromáticos hasta de un 30 %, obteniendo como producto de la reacción enzimática benzoquinonas, hidroxibencenos y otros intermediarios, vía la interacción de las enzimas lacasa, peroxidasa y quinona reductasa. Una posible explicación de esos bajos rendimientos de la enzima lacasa podría ser la limitada solubilidad en agua de estos compuestos.

Por esta razón, las reacciones se ha realizado en mezclas de solventes orgánicos y agua. Sin embargo ya se ha reportado, un valor menor al 2% de actividad de la enzima lacasa en una mezcla equivalentemente proporcional de agua-dioxano, para la oxidación de ABTS. Cantarela y col. (2002), indican que este resultado es contradictorio, ya que en la mezcla de agua-dioxano no desnaturaliza a la enzima, sino que disminuye la estabilidad del producto monocatiónico de la reacción, el ABTS<sup>\*+</sup>, que es un producto de la oxidación primaria del ABTS. Ellos proponen al ácido 3-hidroxiantranílico (HAA), como modelo del sustrato y como cromógeno más apropiado, para medir la actividad oxidativa espectrofotométricamente de esta enzima en la mezcla de solventes.

La oxidación enzimática de compuestos fenólicos en un ambiente no acuoso, han permitido caracterizar mejor a la enzima lacasa. Xiao y su grupo (2003), ensayaron el efecto inhibitorio del dimetil sulfoxido y el ácido trifluoroacético para la oxidación de guayacol, a través de la enzima lacasa

---

purificada del hongo *Trametes sp.*, lo que provocó una inhibición del 3.2 y 39.5% a una concentración de 10 y 25 mM respectivamente, con los desnaturalizantes utilizados.

Otros modelos de compuestos hidrofóbicos contaminantes insolubles en agua, como el 2,2-bis (4-hidroxifenil) propano o BPA, ha sido ampliamente utilizado en la síntesis de polímeros como resinas epóxicas, resinas fenólicas, poliésteres y poliacrilatos. El BPA tiene baja biodegradabilidad y es insoluble en agua, por lo cual, en el grupo de trabajo de Okasaki (2001), se encargó de la oxidación del BPA por medio de la enzima lacasa del hongo *Coriolus versicolor*. Mantuvieron la actividad catalítica de la enzima en medio orgánico, a través de un sistema miceliar reverso, compuesto por bis(2-etilhexil) sulfosuccinato de sodio suspendido en iso-octano. El sistema enzimático catalizó la oxidación del 90% del BPA en 1h y en presencia de 1-hidroxibenzotriazol como mediador hasta el 100% de oxidación y la conformación activa de la proteína se mantuvo. Otros compuestos oxidados por este sistema fueron el *p*-nonil fenol (100%), 4-clorofenol (65%), el 2, 4-diclorofenol, el 2, 4,5- y 2, 4, 6-triclorofenol (33%).

Otros procesos de interés son las polimerizaciones enzimáticas, la síntesis de polímeros naturales, como la celulosa o la apertura de anillos de compuestos, ejemplo de ello, son los compuestos clasificados como macrólidos. Ikeda R y col. (1996), desarrollaron una nueva vía biosintética de polimerización, catalizada por la oxidación enzimática del intermediario de la reacción, llamado ácido siríngico, utilizando la enzima lacasa de *Pycnoporus coccineus*, incubada en medio acuoso con solventes orgánicos como acetona, acetonitrilo, 1,4 dioxano y tetrahidrofurano. El mayor rendimiento de degradación del macrólido poli(2,6-dimetoxi-1,4-oxifenileno) fue del 84% y se realizó en una mezcla enzimática acetona y amortiguador (50:50 v/v) con una pérdida del 60% de actividad de la enzima lacasa. Los efectos de desnaturalización enzimática en presencia de solventes son similares a los obtenidos por la desnaturalización por sales iónicas o no iónicas. El dodecil sulfato de sodio (SDS), cianuro de sodio y la azida de sodio inhiben a la lacasa al 100%, con tan solo una concentración 0.1 mM de estos desnaturalizantes en solución acuosa (Xiao y col., 2003). Los efectos fueron similares utilizando líquidos iónicos miscibles en agua, como el 4-metil-N-butil piridinio tetrafluoroborato o no iónicos insoluble en agua como el 1-butil-3-metil imidazolio hexafluorofosfato para la oxidación de antraceno, catalizada por la lacasa del hongo *Trametes sp.* La lacasa tuvo moderada tolerancia a concentraciones por debajo del 50% de estos solventes ensayados, ya que su aumento causa la precipitación de la enzima (Hinckley y col., 2002).

---

Se han efectuado otros procesos de separación proteica a través de solventes, ya que se pueden aprovechar sus propiedades para cambiar la hidrofobicidad del sistema, provocando un cambio en la constante dieléctrica de la proteína en disolución, lo que altera el ambiente interno de las proteínas y provoca la precipitación. El proceso anterior es favorable cuando se requiere una separación fácil y rápida de las proteínas, pero tiene efectos contraproducentes, ya que la actividad y estabilidad de las enzimas se ven disminuidas. Villaseñor y colaboradores (2004), extrajeron la enzima lacasa del hongo *Myceliophthora thermophila* a través de la precipitación de un polvo comercial llamado Deni Lite IIs. La enzima precipitada con acetona fría al 85%, redujo en 40% la actividad relativa de la enzima. Otros efectos obtenidos por Villaseñor (2004), utilizando cosolventes en el medio de reacción, muestran que la actividad relativa aumenta 27% cuando la concentración de los solventes acuosos como: metanol, etanol e isopropanol, se encuentra en un intervalo entre 5 a 15% (v/v), respecto a la ausencia de estos disolventes. A partir de una concentración de estos solventes por arriba del 20% y también con acetonitrilo, la actividad relativa de la enzima lacasa disminuye 70%.

Otros estudios hechos demuestran que efectivamente el metanol, etanol, acetonitrilo y dimetilsulfóxido inhiben a la enzima lacasa, aunque no la desnaturalizan. También la hidrofobicidad del sustrato afecta la actividad de la enzima. Aunque ya se han reportado varias estrategias para evaluar el comportamiento de las enzimas en solventes orgánicos. Esas estrategias incluyen la modificación química y la inmovilización de las enzimas (Torres y col., 2003).

## **La Importancia del Polietilen glicol (PEG) y la Modificación Enzimática**

Las enzimas son por naturaleza hidrofílicas y un proceso químico de modificación puede incrementar su hidrofobicidad y rigidez, con ello se puede incrementar su termoestabilidad, actividad enzimática, afinidad por sustratos hidrofóbicos y tolerancia a los solventes orgánicos. Investigaciones efectuadas por Dai y Klibanov (1999), indicaron que la liofilización le confiere a las enzimas una rigidez conformacional y que utilizando este proceso la enzima presentaba una muy baja actividad cuando fue resuspendida en solventes orgánicos, comparado con lo que se obtuvo si primero es redisuelta en agua y luego en los solventes orgánicos. Además se puede minimizar dramáticamente la inactivación inducida por liofilización, cuando se involucran ciertos tipos de excipientes a la solución enzimática acuosa antes de la liofilización. Estos excipientes pueden ser compuestos fenólicos y



---

anilina, así como otros que se unen a la envoltura hidrofóbica del sitio activo de la enzima y con ello previenen el colapso durante la deshidratación. Otros agentes protectores son los lioprotectores, como polioles y polietilén glicol que aparente protegen a la enzima (Dai y Klibanov, 1999).

También se han empleado otros procesos de estabilización enzimática como la inmovilización aplicada al diseño de biorreactores apropiados, aplicados a los diversos procesos biotecnológicos. Mediante este tipo de estrategias, se ha intentado contrarrestar la desnaturalización y aumentar la actividad con el fin de realizar reacciones enzimáticas que en forma libre sería imposible catalizar.

El único objetivo de ello es obtener una mayor estabilidad enzimática o catalizar reacciones, donde la difusión de un sustrato hidrofóbico no sea la limitante del proceso. Se han intentado diversas formas de estabilización de la enzima lacasa, con resultados bastante promisorios. Ruiz y col. (2000), inmovilizaron a la enzima lacasa obtenida del hongo *Trametes versicolor*, en vidrio, sílica gel y una membrana de nylon 66 y probaron su estabilidad en solventes como dietil éter, etil acetato y cloruro de metileno. La velocidad inicial de oxidación usando siringaldazina como sustrato aumentó 245 veces inmovilizando en vidrio y gel de sílice en los tres solventes, aunque los mejores resultados fueron obtenidos con la membrana de nylon, sin que se presentara inactivación durante 72 h en éter dietílico y acetato de etilo, obteniendo una disminución de la actividad significativamente en cloruro de metileno, debido a la degradación por la disolución del material de soporte.

Existen diferentes formas de estabilización en sistemas no acuosos. Majcherczyk y Johannes (2000), han oxidado indirectamente hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH), que fueron acoplados a una barrera de polietilén glicol (PEG), con la ayuda de mediadores oxidados con la enzima lacasa, ejemplo de ello es el ácido 2,2'-azino-bis-(3-etil benzotiazolína-6-sulfónico) (ABTS) y el 1-hidroxibenzotriazol (HBT), donde se obtuvo hasta un 94% de efectividad en la reacción. Por lo cual fue necesario plantear otra forma distinta de estabilización enzimática, como lo es la conjugación mediante un sistema acoplado a las proteínas, por ejemplo el PEG, con la finalidad de formar moléculas resistentes a efectos de temperatura, a los agentes caotrópicos o a los solventes orgánicos. Otras formas incluyen conjugados proteicos con plásticos, entrecruzamiento con cristales, acoplamiento a polisacáridos y la modificación con polímeros como el PEG.

---

Conviene mencionarse que la modificación, conjugación o derivatización con PEG o polisacáridos, le confiere a las proteínas cierta termoestabilidad (desde 50 a 70 °C) y se ha demostrado que este acoplamiento proteico con PEG, incrementa significativamente la acción biológica de péptidos y fármacos. También se sabe que mejora la difusión del sustrato al sitio activo, ya que el conjugado enzimático en solución se encuentra en forma libre y el sustrato puede tener una interacción mayor sin necesidad de una agitación vigorosa requerida en la inmovilización enzimática. De esa forma, el acoplamiento covalente de polímero anfifílico PEG a los grupos  $\epsilon$ - amino de las enzimas, puede conferirle ciertas propiedades a las proteínas como es el incremento de la solubilidad y su actividad en solventes orgánicos.

La conjugación con PEG se estableció como una metodología para péptidos y proteínas, a través de los estudios de Abuchowski (1977), donde la finalidad era obtener una mayor estabilidad de proteínas en solventes orgánicos y su resistencia a la temperatura por el efecto protector del PEG, gracias a interacciones tipo amida que forma con los grupos  $\epsilon$ -amino de la lisina y con otros aminoácidos y a su carácter anfifílico que posee la cadena hidrocarbonada de la molécula de PEG (Wieder y col., 1979)

La estabilización de proteínas puede explicarse a través de la solvatación de las moléculas limítrofes del PEG en la enzima, ello permite la disminución del desplegamiento de las proteínas, gracias al cambio en el microambiente, vía el incremento del número de las interacciones del tipo “puente de hidrógeno” alrededor de la proteína. Esta técnica fue aplicada por Chung-Ja y col. (1987), con el fin de verificar las propiedades de conjugados de ovoalbúmina, y de probar su antigenicidad; estimando la capacidad de suprimir la respuesta inmunológica de los conjugados sintetizados. Los resultados obtenidos en esta investigación, reflejan que la eficiencia y reproducibilidad de la reacción de conjugación, depende en gran medida del tipo de agente acoplante y por otro lado, la tolerancia del conjugado inyectado en mamíferos, se encuentra en función del tamaño de cadena hidrocarbonada del PEG. Es decir entre mayor sea el tamaño del PEG se pueden tener mayores puntos de interacción con los linfocitos en la sangre, lo que permite un intercalamiento mayor de las cadenas de PEG en la membrana celular, y con ello un bloqueo o inactivación mayor de las células B o  $T_H$  y activación de las células  $T_S$ .

---

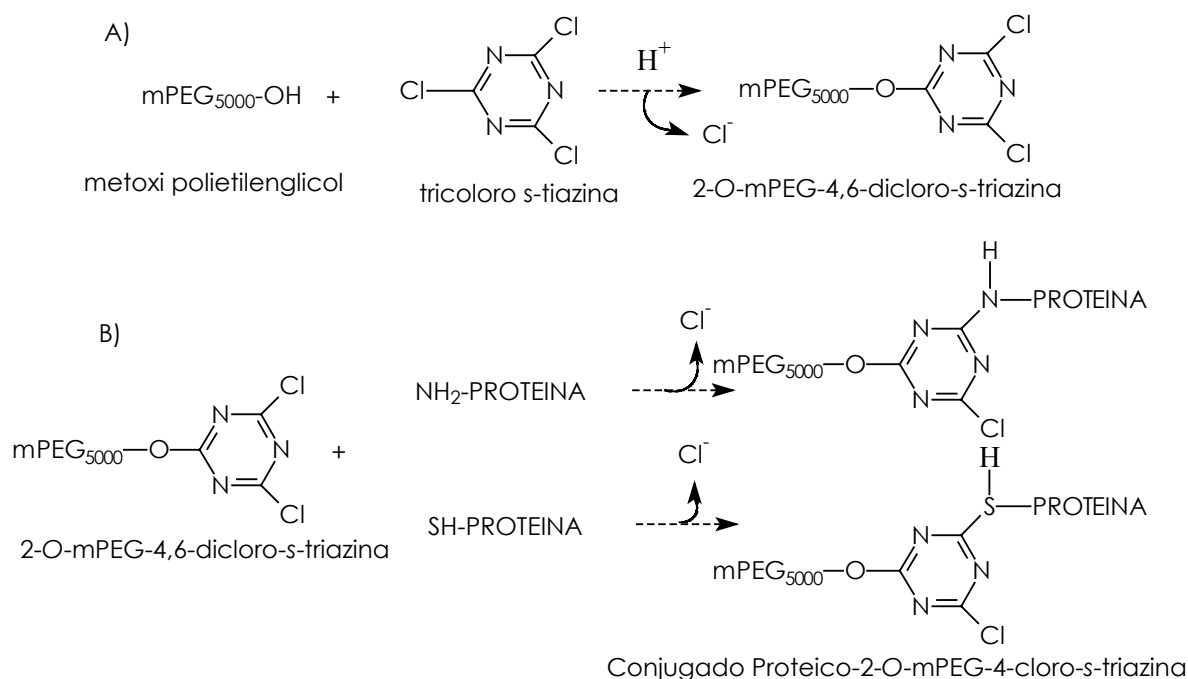
El proceso de derivatización de proteínas, también ha sido aplicado en el campo farmacéutico a través del grupo de investigación de Veronese (2003), quienes investigaron la unión covalente del PEG con el factor liberador de la hormona de crecimiento humano (hGRF), con el fin de aumentar la disolución de este conjugado, porque la hGRF tiene muy baja solubilidad en una solución neutra y alcali, condición necesaria para la producción de fármacos aplicados al tratamiento, prevención y diagnóstico de desórdenes relacionados con la hormona de crecimiento. Los medicamentos son presentados preferentemente en forma de un compuesto, mediante una forma farmacéutica inyectable en solución salina o solución de dextrosa. Los resultados fueron satisfactorios, ya que se encontró que el hGRF-PEG, reprime la respuesta inmune y el conjugado es liberado en sangre, lo que permite una efectiva concentración y una mayor eficiencia del fármaco. Como ya se resaltó, la efectividad y rendimiento de la reacción de conjugación se debe en gran medida a las propiedades reactivas del “agente acoplante” o de activación del PEG, y también por el tamaño de la cadena hidrocarbonada de PEG. A pH alcalino la reacción de modificación se realiza más rápidamente pero es menos efectiva, porque el ión hidróxido de la molécula de PEG se convierte en un nucleófilo competitivo y el PEG activado se hidroliza antes de que ocurra la aminólisis, con lo cual se compromete la producción del conjugado proteico.

Los subsecuentes estudios que a continuación se indican se enfocaron a la reacción, a la aplicación y uso de los “agentes acoplantes”. Para ello Greenwald y col. (1996), introdujeron diversos agentes acoplantes, como la tiazolidina-2-tiona para activar el PEG y el conjugado fue comparado con derivados carbonatados, los cuales forman uniones carbamato que poseen una vida media ( $t_{1/2}$ ) menor en condiciones fisiológicas. Ejemplos de estos acoplantes son el succinimidil carbonato y el *N*-hidroxisuccinimidil ester (Zalipsky, 1995). Se confirmó que la tiazolidina forma derivados  $\alpha$ -PEG, que pueden ser usados en condiciones fisiológicas, pues este “agente acoplante” forma uniones amida con la hemoglobina bovina, que conjugada adquiere un tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) del doble para su hidrólisis en sangre, respecto a los derivados carbamatados. Aunque la desventaja con estos “agentes acoplantes” es la conjugación no específica del PEG para un residuo aminoacídico en especial.

Tal es el caso del 2-*o*-metoxipolietilen glicol (mPEG) con tricloro-*s*-triazina y con cloruro cianúrico, agentes acoplantes, que fueron usados por el grupo de Abuchowski (1977), como método para el acoplamiento al PEG. Estos agentes pueden reaccionar con grupos funcionales nucleofílicos, por

---

ejemplo los residuos aminoacídicos de las proteínas, usualmente con los grupos amino, aunque también con hidroxilos y sulfidrilos. Esta reacción acoplante, fue ampliamente utilizada para derivatizar varias proteínas (Jackson y col., 1987; Koide y Kobayashi, 1983; King y col., 1977; Gaertner y Puigserver, 1988; Yoshinaga y col., 1987; Eieder y col., 1979). El uso de metoxi polietilén glicol, provocó una baja selectividad y produce una marcada pérdida de la actividad biológica en algunas proteínas. Por ejemplo; se ha descubierto que en el proceso de derivatización de la ligasa de fenilalanina-amonio, no solo reaccionan los grupos amino, sino también los grupos sulfidrilo, lo que conduce a una sustancial pérdida de la actividad enzimática, aunque en otras proteínas como la asparaginasa de *E. coli*. Esta modificación en la proteína, provoca que se retenga un 7% de su actividad nativa (Ashihara Y. y Col, 1978). La desventaja de este producto acoplado, es que el “agente acoplante” es obtenido por reemplazo de 2 de los 3 cloros reactivos del tricloro-*s*-triazina con moléculas de mPEG (ver **Figura 6**), pues al reemplazarse el tercer cloro disponible para la modificación de fármacos o proteínas, se produce un reactivo derivatizado, capaz de introducir dos moléculas de polímero por grupo amino proteico modificado. Este aspecto es importante, porque la alteración de las propiedades de las biomoléculas es benéfica, ya que dependerán directamente del contenido de las moléculas de PEG que se ligen, pero la actividad residual del conjugado puede algunas veces depender inversamente del número de grupos amino modificados (Morfandini y Veronese, 1998).



**Figura 6.** Conjugación proteica. (A) Síntesis del agente “acoplante” 2-O-mPEG<sub>5000</sub>-4,6-dicloro-s-triazina. B) Unión del agente “acoplante” a la enzima, a través de los grupos ε-amino o tiol de los residuos de aminoácido.

Otros efectos de esta reacción de conjugación con mPEG, fueron analizados por el grupo de Varalakshmi (1995), quienes enlazaron covalentemente el 2-O-metoxi polietilenglicol 4,6-dicloro-s-triazina de peso molecular 1900 y 5000, a la enzima oxalato oxidasa. El resultado fue un aumento de la termoestabilidad de los conjugados a 60°C, con una pérdida de 45% y 30% de su actividad relativa, respecto al incremento del peso molecular, contra un descenso del 70% en la enzima nativa a las mismas condiciones. A 37 °C, los conjugados enzimáticos de oxalato solo perdieron el 2% de su actividad en un periodo de 120 min, cuando la enzima nativa disminuyó en 80%. De aquí que se comprobaba, que el PEG le confiere al conjugado enzimático, una protección ante la digestión proteolítica, ya que solo disminuye aproximadamente el 65% de la actividad, contra el 90% para la enzima oxalato oxidasa sin modificar, atribuyendo esta propiedad a la barrera estérica formada por el PEG sobre la enzima.

---

Por otro lado, Varalakshmi observó que el cambio en la afinidad por el sustrato, relacionado con los cambios estructurales en la enzima, causan una baja en la interacción del sustrato y el sitio activo de la enzima modificada. Concomitantemente presentan una disminución de la movilidad electroforética en función del peso molecular mayor. Otros efectos estudiados por este investigador fueron, la resistencia del conjugado a la desactivación por azida de sodio, nitrato de sodio, glicolato, glioxilato de sodio y metales pesados como mercurio y cobre.

El efecto protector de los conjugados de PEG, varía respecto al peso molecular de su cadena hidrofóbica (PM: 350, 550, 750, 2000, 5000, 8000 y 10000). Este efecto también fue estudiado por Gaertner y Puigserver (1992), sobre la actividad de la enzima tripsina modificada, utilizando como sustrato la *N*-benzoil-L-argina-*p*-nitroanilida. La afinidad por el sustrato disminuyó conforme aumentaba la cadena hidrofóbica y también se incrementó la eficiencia catalítica, además de que la actividad fue de 2 a 4 veces más que en la enzima nativa con las moléculas de PEG ensayadas. Se examinó la homogeneidad del conjugado de tripsina por medio de la cromatografía de exclusión molecular y se encontró que la velocidad de elusión aumentaba respecto al incremento en el tamaño del los conjugados PEG<sub>5000</sub>-PEG<sub>8000</sub>, de la superficie de la proteína. Se obtuvo un decremento en termoestabilidad de la enzima conjugada, cuando disminuía el tamaño de la cadena de PEG. Ésta enzima modificada se incubó durante en un periodo de 100 min a temperatura ambiente en 0.15% de SDS. La actividad relativa fue mayor en el conjugado de tripsina-PEG<sub>5000</sub> incubando desde 20°C hasta 100 °C durante 30 min, comparado con la enzima original. La utilización del detergente SDS a concentración del 0.15 %, inactivó completamente a la enzima nativa cuando en el conjugado de tripsina solo se perdió el 55% de la actividad relativa. Estos resultados son similares a los encontrados por el grupo de García-Arellano y col.(2002), con la unión covalente de la enzima de citocromo *c* de corazón de caballo al PEG<sub>5000</sub>, conjugación que tenía la finalidad de oxidar los compuestos llamados hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH). El espectro de absorción presentó alteraciones como resultado de la modificación proteica, ya que la banda Soret se desplazó hacia longitudes de onda cercanos al espectro UV, también se acentuó la solubilidad en acetonitrilo al 15%, al igual que se duplicó la actividad sobre pireno, antraceno, benzo[a] pireno, tiantreno, dibenzotiofeno y disulfuro de fenilo. La disminución de la actividad fue de un 55% durante 7h a 80°C, aunado a la ausencia de alteraciones de la conformación terciaria en la enzima modificada.

Recientemente se ha hecho la conjugación de la enzima lacasa con PEG. Vandertol y col. (2002), quienes se han interesado por investigar los efectos de la conjugación de la enzima lacasa producida por el hongo *Corioloopsis gallica* con polietilen glicol de PM 5000, sobre la estabilidad enzimática, además de poder incrementar la oxidación de 15 PAH, por el uso de mediadores ABTS y HBT. La enzima lacasa conjugada fue estable por 24h a 60°C y 144h a 40°C en solución amortiguadora de pH 9.0, pero el preparado enzimático fue inhibido totalmente por azida de sodio 0.1mM y 1M de ditiotreitól, ácido tioglicólico y cisteína. Además la oxidación de los sustratos por la enzima conjugada aumentó hasta de 3820 veces la eficiencia catalítica y hasta 1600 veces más para el compuesto 9-metil antraceno, en presencia de 1mM de HBT en la enzima lacasa conjugada.

**Tabla 5. Otras proteínas que han sido modificadas con PEG.**

Enzimas Modificadas	Usos	Referencias
Catalasa	Farmacéutico e Inmunogenicidad	Abuchowski, 1976
Superóxido dismutasa Lactoferrina $\alpha$ -macroglobulina	Estudios de $t_{1/2}$ en el plasma y obtener una forma menos susceptible a las proteasas.	Beauchamp., 1983
Hormona Luteinizante	Reducir la respuesta histaminica en el organismo.	Hocart, 1987
$\alpha$ -quimiotripsina	Aumentar la solubilidad en solventes orgánicos.	Kurganov y col., 1997)
Peroxidasa (rabano picante)	Estabilidad térmica y en solventes orgánicos.	García y col., 1998
Lipasa	Aumentar la selectividad sobre sustratos racémicos comerciales.	Hernández y col., 1999)
Adenosino fosforilasa	Generación de una forma farmacéutica	Brewerton y col., 2003
$\alpha$ -ciclodextrina	Conjugada con una molécula de PEG $\alpha,\omega$ -dicarboxilado.	Kitano y col., 2004
Lacasa	con un copolímero poli aquilenoxido-co-maleico que incremento la estabilidad de 20-40 veces a 25 y 40°C, respectivamente.	Shin-ya y col., 2005
Lisozima	Aumentar la solubilidad en solventes y en aplicaciones farmacéuticas	Lee y Park, 2003

Las aplicaciones de los conjugados proteicos revisados en la literatura han sido abundantes, pero existen otros efectos de la conjugación sobre las proteínas que necesitan analizarse (**Tabla 5**).

---

## **El Análisis por Dicroísmo Circular (DC) y por Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB) en Proteínas.**

Cabe comentarse que la conjugación de la enzima lacasa de *Myceliophthora thermophila* con PEG, resulta interesante porque a pesar de que ya ha sido indicada como posible, poco se sabe de las modificaciones físico-químicas de esta proteína expuesta a distintos solventes orgánicos miscibles con agua.

Además esta modificación permitirá analizar la catálisis de oxidación del ABTS en solventes orgánicos y podemos adicionar que es atractivo hacerlo con la lacasa del hongo *Myceliophthora thermophila*, ya que se encuentra clasificada como termofílica y ha sido expresada en el hongo *Aspergillus oryzae*, y ha sido comercializada por la empresa Novo Nordisk en forma de un polvo (Deni Lite II), con aplicaciones en el tratamiento del desteñido enzimático de la mezclilla. De forma que la adquisición de diferentes propiedades de solubilidad de esta enzima conjugada, serían atractivas con miras a su aplicación en procesos biotecnológicos con solventes orgánicos.

Aunque la literatura se ha encaminado a analizar las propiedades oxidativas adquiridas por la conjugación con PEG en medio orgánico, muy pocas de las investigaciones, se han preocupado por analizar los efectos y fenómenos de la modificación en estas condiciones enzimáticas, referente a la conformación secundaria y terciaria de las proteínas, por lo que el aporte de esta investigación sería punto de referencia para comprender aún con mayor claridad este procedimiento.

Estos estudios están directamente relacionados con un intento para aportar datos, que faciliten más adelante el desarrollo de modelos sobre el plegamiento y desplegamiento de las proteínas. Por ejemplo los análisis espectropolarimétricos obtenidos del método de dicroísmo circular (DC), nos proporcionarán información importante sobre los cambios en la estructura secundaria y terciaria de las proteínas, porque las hélices alfa y estructuras beta, tiene propiedades distintas de orientar o polarizar la luz en ciertos intervalos de longitudes de onda.

La teoría de dicroísmo circular (DC), fue desarrollada por Biot y Fresnel (Neumann y Snatzke, 1990). Un rayo de luz polarizado en un plano puede considerarse formado por dos componentes polarizados circularmente, uno a la derecha y el otro a la izquierda. Estos componentes están en fase y son de la misma amplitud. Al pasar por un medio ópticamente activo, cada componente interactúa



---

de manera diferente con los centros quirales de las moléculas presentes. La interacción de la radiación con la muestra induce un desfase y un cambio de magnitud diferenciales en ambos componentes circularmente polarizados de la luz, y estos fenómenos provocan una rotación del plano de polarización, con lo que se provoca una distorsión de este plano, generando una elipse.

La rotación del plano y la diferente absorción de los componentes circularmente polarizados (dicroísmo circular), varían de acuerdo con la longitud de onda, pudiéndose obtener espectros de estos fenómenos, esto es, gráficas de la rotación o elipticidad contra la longitud de onda. Los espectros de dicroísmo circular se obtienen generalmente en las regiones del ultravioleta cercano (250 a 350 nm) y lejano (180 a 250 nm) de la radiación electromagnética. En la región del ultravioleta cercano, los cromóforos más importantes son los grupos aromáticos de las cadenas laterales de triptófano, tirosina, y fenilalanina, ya que la asimetría en estos grupos químicos, se debe exclusivamente a su entorno y como los residuos aromáticos se encuentran distribuidos en toda la macromolécula, los espectros en esta región son un reflejo de la conformación global de la proteína. Además las señales en esta región son extremadamente sensibles a los cambios en la conformación.

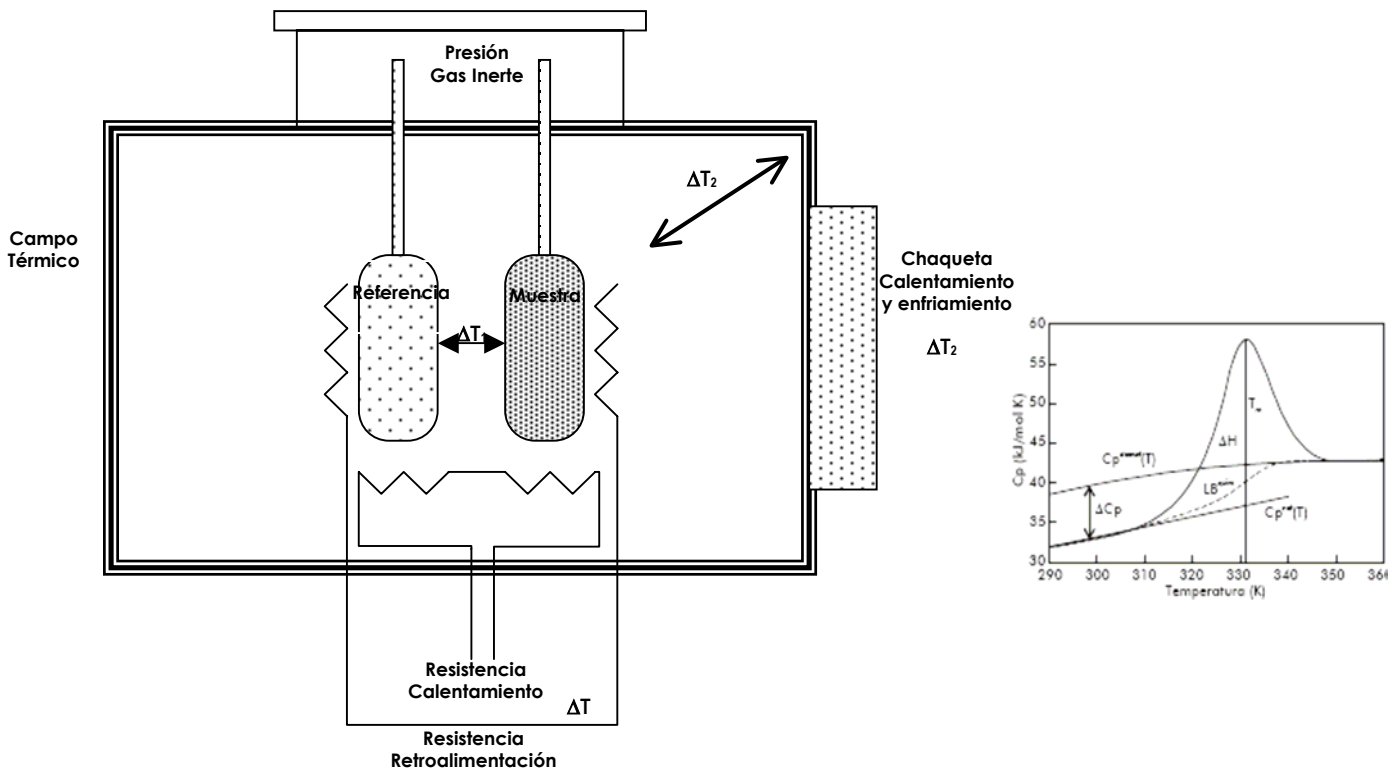
Los espectros de dicroísmo en la región del ultravioleta lejano, se deben principalmente a los enlaces amida que unen los residuos de los aminoácidos entre sí. La asimetría de estos cromóforos se debe al arreglo espacial de la cadena principal de la proteína, por lo cual, las señales de dicroísmo circular se pueden interpretar en términos del contenido de estructura secundaria presentes, es decir, del porcentaje de residuos que se encuentran en alguna conformación estructural (hélices  $\alpha$ , hojas  $\beta$  giros y otros tipos estructurales) (Neumann y Snatzke, 1990).

Por otro lado, la desnaturalización de las proteínas puede asociarse también con los cambios espectropolarimétricos registrados, lo que permite cálculo de los parámetros cinéticos de desplegamiento, cuando existe un cambio en temperatura, en presencia de diversos solventes solventes (Tian-Zhi y col., 2000). Además, los cambios de conformación de las proteínas se asocian con cambios termodinámicos que pueden estudiados por de la técnica de calorimetría diferencial de barrido (CDB) (Tian-Zhi y col., 2000; Fraga y Loppnow, 1998). Esta técnica es relativamente sencilla. Mediante la CDB se mide la capacidad calorífica relativa de un sistema determinado cuando sufre una transición inducida por un cambio térmico. En el experimento las celdas con la muestra y la referencia se calientan simultáneamente a una misma velocidad predeterminada. La muestra es una

---

solución o una suspensión del material que se desea estudiar y el testigo contiene solamente el disolvente utilizado. Cuando se calientan ambas celdas y se produce una transición inducida por la temperatura (por ejemplo la desnaturalización de una proteína o una transición), la muestra absorbe parte del calor que se está suministrando a la celda. Como resultado, la celda de la muestra tendría una temperatura algo inferior a la celda de referencia, pero el sistema de control del equipo suministra una potencia calorífica adicional para que ambas celdas mantengan la misma temperatura (ver **Figura 7**). Esta potencia en exceso es proporcional a la diferencia de capacidades caloríficas entre las dos celdas y sus contenidos. De esta forma tan simple se obtiene la capacidad calorífica del soluto en función de la temperatura (Beldarraín, 2001).

La información que se puede obtener del experimento de CDB es diferente cuando el proceso de desplegamiento de una proteína está en equilibrio durante el barrido de temperatura (transición reversible), en comparación con un proceso controlado cinéticamente (transición irreversible). En los casos de reversibilidad en las desnaturalizaciones efectuadas por la CDB, se acepta, por lo general la aplicación de la termodinámica de equilibrio para el análisis de datos. En lo que respecta a los procesos de no equilibrio, también se cumplen para muchas de las proteínas. Por lo tanto los parámetros termodinámicos que se obtienen mediante esta aplicación pueden ser dudosos, excepto el área bajo la curva que se genera al registrarse el desplegamiento de la proteína. Esta área bajo la curva es la entalpía de desnaturalización del proceso. Esto, ha servido para determinar con exactitud los factores que influyen en la estabilidad de las biomoléculas, midiendo la capacidad calorífica relativa de un sistema determinado cuando sufre una transición inducida por un cambio térmico (por ejemplo la desnaturalización y renaturalización de una proteína (Beldarraín, 2001).



**Figura 7.** Aparato de Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB). A la izquierda: Se observan las celdas interiores que contienen la solución de referencia y la solución muestra, calentadas por las resistencias y manteniéndose el calor por una chaqueta adiabática. A la derecha: Un registro obtenido de la transición térmica en proteínas (Harding y Chowdhry, 2001)

La técnica CDB ha sido aplicada por Tian-Zhi y colaboradores en la Universidad de Wuhan en China (2000), sobre la enzima lacasa proveniente del árbol de la laca *Rhus vernicifera* y del hongo *Polyporus versicolor*. La finalidad era probar diferentes sustratos, como el 3,4-dihidroxibenzaldehído, guayacol, pirogalol y el ácido gálico, para calcular el  $K_M$  y relacionarlo con diversos parámetros fisicoquímicos. Esta investigación relacionó la microcalorimetría con la cinética enzimática, proponiendo un modelo matemático alternativo que puede ser aplicado en la enzima lacasa y que interrelaciona los parámetros termodinámicos con los cinéticos. En este contexto, conviene señalarse que la técnica de calorimetría de barrido es la más eficiente, porque proporciona información muy precisa sobre los parámetros termodinámicos ligados a la estabilización de la estructura macromolecular.

---

## **CAPITULO III:**

# **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

---

## Hipótesis

La modificación con PEG<sub>5000</sub>, perturbará el efecto hidrofóbico de la enzima lacasa del hongo *M. thermophyla* (MtL), permitiendo que las cadenas hidrofóbicas del PEG, interaccionen directamente con un medio orgánico. Esto formará una capa que protegerá a la enzima e impedirá la desnaturalización de la enzima en diferentes porcentajes de cosolventes (alcoholes y acetonitrilo). Similarmente aumentará la termo tolerancia, por la estabilización de la configuración terciaria, lo cual provocara que el sitio activo conserve su configuración original.

---

## Objetivo General

- ⊗ Estudiar el efecto de la temperatura y la presencia de diferentes disolventes orgánicos sobre la actividad y estabilidad de la lacasa de *M. thermophyla*, conjugada con polietilen glicol (PEG).

## Objetivos particulares

- ⊗ Aislar, caracterizar y además determinar la estabilidad enzimática, a través del efecto del incremento gradual de los disolventes (metanol, etanol, propanol y acetonitrilo) sobre la actividad de la lacasa libre y conjugada con PEG<sub>5000</sub>.
- ⊗ Analizar el comportamiento de las curvas de transición térmica espectropolarimétrica (dicroísmo circular) de la enzima lacasa nativa y conjugada, en presencia y ausencia de cosolventes y aplicar la técnica de la calorimetría diferencial de barrido, para estudiar el efecto de la conjugación con PEG<sub>5000</sub>, sobre el proceso de desplegamiento de la proteínas utilizadas.

---

# **CAPITULO IV:** **MATERIALES Y MÉTODOS**

---

## La Enzima Lacasa y Los Productos Químicos

La enzima lacasa (EC 1.10.3.2) usada en esta investigación, fue extraída y purificada a partir del polvo Deni Lite IIs, comercializado por la empresa Novo Nordisk, producida originalmente a partir de un gen del hongo termofílico *Myceliophthora thermophyla* (MtL), expresado genéticamente en el hongo micromiceto *Aspergillus oryzae*. Proceso desarrollado por el grupo de Berka en 1997. La proteína seroalbúmina bovina (SAB), el monometoxi polietilen glicol activado con cloruro cianúrico (PEG<sub>5000</sub>), el ácido 2',2'-azino-bis-(3-etil benzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS), 2,6-dimetoxifenol (DMP) y el ácido picril sulfónico (TNBS) fueron obtenidos de Sigma.

### Extracción y Purificación de la Enzima Lacasa

Una muestra sólida de 50.0 g de polvo DeniLite IIs, fue suspendida en 200 mL de solución amortiguadora de fosfatos 50.0 mM, a pH 6.0. La suspensión fue agitada por 24 h, a 4.0 °C. Posteriormente el sólido, se separó por centrifugación en tubos de 50.0 mL usando una centrífuga (Millipore) a 10000 rpm, durante 30 min y en frío. Se colectó el sobrenadante de dos lavados hasta alcanzar un volumen de 250 mL. El sobrenadante fue concentrado por medio de un sistema de ultrafiltración con agitación, usando una membrana (Millipore) con selectividad nominal de 10 kDa y sujeta a una presión de N<sub>2</sub> de 5.95 bar, hasta un volumen aproximado de 5.0 mL. El concentrado enzimático fue dializado 4 ó 5 veces con amortiguador Tris-HCl, 50.0 mM a pH 7.3 y centrifugado nuevamente bajo las mismas condiciones.

El concentrado final fue filtrado al vacío a través de una membrana Millipore de 25.0 µm y después fue eluido en una columna de intercambio iónico de Q-Sepharosa (Hi-Prep 16/10 QFF, Bio-Rad, capacidad máxima de 120 mg HSA/mL de gel), acoplada a un cromatógrafo FPLC (Bio-Rad). La columna que se preequilibrio con dos volúmenes de amortiguador de Tris-HCl, 50.0 mM, a pH 7.3 y la muestra fue eluida con un gradiente lineal NaCl 0.5 M.

Las fracciones que presentaban actividad oxidativa de la lacasa fueron seleccionadas y nuevamente concentradas por ultrafiltración en las condiciones anteriormente descritas. Las fracciones con actividad fueron acumuladas y fueron dializados dos veces con amortiguador de fosfatos 5.0 mM a pH 6.0 en frío. La pureza fue analizada por electroforesis. Cabe aclarar que en cada etapa del proceso



---

de purificación, se midieron tanto la cantidad de proteína por el método de Bradford y la actividad enzimática con ABTS 0.50 mM como sustrato.

### **Determinación de la Proteína Total (Proteína Unida al Colorante) Bradford**

Las determinaciones de proteína se cuantificaron por el método de Bradford: tomando 800  $\mu$ L de solución de lacasa disuelta en amortiguador de fosfatos 50.0 mM a pH 6.0 y añadiendo 200  $\mu$ L de reactivo de Bradford (Sigma). La reacción fue llevada a cabo en reposo por 5 minutos. Posteriormente se determinó la absorbancia espectrofotométrica a 595 nm en celdas de cuarzo. Se calculó la cantidad de proteína, tomando como base una curva patrón de seroalbúmina bovina (SAB) en solución de amortiguador de fosfatos 50 mM, a pH 6. Las concentraciones de proteína fueron de 1.25, 2.5, 5.0, 8.3, 12.5 y 25.0  $\mu$ g/mL. Para cada una de las muestras colectadas en el proceso de purificación, la cantidad proteica fue estimada por interpolación matemática a la curva patrón (Bradford, 1976).

### **Modificación Química de la Enzima Lacasa con PEG<sub>5000</sub>**

La modificación química de los grupos  $\epsilon$ -amino de los residuos aminoacídicos en la proteína MtL purificada, se realizó con un exceso molar, 50 veces mayor del reactivo sobre el sustrato. Se uso como reactivo al monometoxi polietilen glicol activado con cloruro cianúrico (PEG<sub>5000</sub>) y el sustrato fue la proteína lacasa purificada. El reactivo se adicionó a 10.0 mL de una solución amortiguadora de boratos 40.0 mM a pH 10.0. Se uso una agitación suave, a temperatura ambiente durante 2.5 horas. Posteriormente la solución de proteína modificada fue concentrada, en frío, por medio de un sistema agitado de ultra filtración, acoplado con una membrana Millipore con selectividad nominal de 40 kDa, utilizando una presión de N<sub>2</sub> de 3.95 bar, hasta alcanzar un volumen aproximado de 2.0 mL. Entonces, la solución fue dializada tres veces con amortiguador de fosfatos 5.0 mM a pH 6.0 (García-Arellano y col., 2002).

---

## Titulación de los Grupos Amino Modificados con PEG<sub>5000</sub>

El grado de modificación de MtL-PEG, fue estimado por titulación de los grupos amino residuales con el reactivo ácido picrilsulfónico llamado también trinitrobenzen sulfónico (TNBS), a través de la determinación espectrofotométrica y por la formación de grupos trinitrofenil derivados, usando el método descrito por Habeeb (1966). Se tomaron 250  $\mu\text{L}$  de una solución de SAB a concentraciones entre 0.4 a 2.3 mg/mL. Se adicionaron a las enzimas nativa (MtL) y derivatizada (MtL-PEG), 250  $\mu\text{L}$  de una solución al 4.0 % de  $\text{NaHCO}_3$  y 250  $\mu\text{L}$  de una solución al 0.1 % de TNBS en agua. La solución fue incubada en tubos de ensaye a 40 °C por 2 h, con agitación frecuente. Posteriormente se agregaron 250  $\mu\text{L}$  de una solución al 10.0 % de dodecil sulfato de sodio (SDS) y 125  $\mu\text{L}$  de HCl 1.0 M, con agitación constante. Las muestras fueron analizadas a una longitud de onda de 335 nm, contra un blanco que fue tratado de la misma forma y que contenía 250 $\mu\text{L}$  de agua, en vez de solución proteica. Se efectuaron los cálculos tomando en consideración el coeficiente de extinción molar de  $1.09 \pm 0.01 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  del complejo formado (Ashihara y col., 1978).

## Ensayo para Estimar las Constantes Cinéticas $K_M$ y $V_{\text{Max}}$ de la Enzima Lacasa MtL y MtL-PEG<sub>5000</sub> con ABTS y DMP

Por separado se prepararon dos soluciones estándar de sustrato. La primera solución con ABTS a concentración de 2.5 mM en amortiguador de fosfatos 50.0 mM y la segunda solución con DMP a 1.5 mM en propanol al 10.0% en el mismo amortiguador. Posteriormente se etiquetaron tubos de ensaye limpios y secos en una gradilla y se efectuaron diluciones sucesivas que contenían la mitad de la concentración respecto al tubo anterior (**Tabla 6**). El volumen final de todos los tubos fue de 900 $\mu\text{L}$ . Se adiciono uno a la vez, 100 $\mu\text{L}$  de la enzima y el tubo fue agitado. De inmediato fue determinando el incremento de absorbancia, respecto a un testigo correspondiente en concentración de sustrato, pero que no contenía enzima. Para cuantificar la actividad de la lacasa MtL y MtL-PEG<sub>5000</sub>, las condiciones de medición fueron las siguientes:  $\lambda_{\text{ABTS}}=420$ ,  $\epsilon_{\text{ABTS}}= 36000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,  $\lambda_{\text{DMP}}=469$ ,  $\epsilon_{\text{DMP}}= 49600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Berka y col., 1997). Se efectuó la lectura de la absorbancia a una longitud de onda de 420 nm para el ensayo con ABTS y a 469 nm con DMP (Berka y col., 1997), determinando la absorbancia cada 25 segundos durante 5 minutos, en espectrofotómetro modelo Biomate 3 (Termospectronic). Una unidad de actividad enzimática (UE), se definió como la cantidad

de enzima que transforma un micromol de sustrato por minuto ( $\mu\text{mol mL}^{-1} \text{min}^{-1}$ ). La actividad específica se definió como unidades de enzima por mg de proteína (UE/mg P).

**Tabla 6. Ensayo para la determinación de  $K_M$  y  $V_{MAX}$  de enzima lacasa nativa y modificada**

Tubo No.	Sustrato ( $\mu\text{L}$ )	Enzima <sup>(B)</sup> ( $\mu\text{L}$ )	ABTS [mM]	DMP [mM]
1	900	0	2.25	1.306
2	900	100	1.125	0.653
3	900	100	0.563	0.327
4	900	100	0.281	0.163
5	900	100	0.141	0.082
6	900	100	0.070	0.041
7	900	100	0.035	0.020
8	900	100	0.018	0.010
9	900	100	0.009	0.005
10	900	100		0.003

**(B)** Para elaborar testigo espectrofotométrico se adicionó amortiguador en vez de enzima

Nota: las diluciones fueron la mitad del tubo anterior por consiguiente en el último tubo se descartaron 900 $\mu\text{L}$

### **Determinación del Efecto del pH sobre la Actividad y Estabilidad de la Enzima Lacasa**

Se distribuyeron en tubos de ensaye diferentes cantidades la enzima nativa purificada, con el fin de determinar el pH óptimo para actividad de la lacasa con ABTS (**Tabla 7**). Los amortiguadores correspondientes al pH de 3.0, 4.0 y 5.0 son de acetatos, los amortiguadores a pH 6.0, 7.0 y 8.0 son de fosfatos y los amortiguadores a pH de 9 y 10 son de Tris-HCl-NaOH. Todos los amortiguadores tuvieron una concentración 50.0 mM. Para determinar el efecto del pH sobre la estabilidad, la enzima lacasa nativa fue incubada durante 22 h a temperatura ambiente, en cada uno de los amortiguadores ensayados, evaluando la actividad en diferentes tiempos durante la incubación. La actividad se determinó espectrofotométricamente a 420 nm con ABTS a 0.50 mM, por lapsos de 25 segundos durante 5 minutos en un espectrofotómetro modelo Biomate 3 (Termoespectronic).

**Tabla 7 . Ensayo del efecto del pH sobre la actividad de la lacasas de Novo Nordisk**

<b>pH</b>	<b>Amortiguador 50 mM (μL)</b>	<b>H<sub>2</sub>O (μL)</b>	<b>Muestra (μL)</b>	<b>Siringaldazina 0.5 mM ó ABTS 5.0 mM</b>
pH3 B	100	800	0	100
pH3	100	700	100	100
pH4 B	100	800	0	100
pH4	100	700	100	100
pH5 B	100	800	0	100
pH5	100	700	100	100
pH6 B	100	800	0	100
pH6	100	700	100	100
pH7 B	100	800	0	100
pH7	100	700	100	100
pH8 B	100	800	0	100
pH8	100	700	100	100
pH9 B	100	800	0	100
pH9	100	700	100	100
pH10 B	100	800	0	100
pH10	100	700	100	100

**(B)** Corresponde al blanco espectrofotométrico

### **Determinación del Punto Isoeléctrico (pI)**

La proteína purificada MtL fue disuelta en una disolución de 2.0 mL de anfolitos de amplio intervalo (pH 3.0-10.0) (Biorad) y fue complementada hasta 60.0 mL con agua desionizada. La disolución fue inyectada en un aparato de isoelectroenfoque Rotoford (Biorad), efectuando el corrimiento por un periodo de 4 h a 15.0 W y hasta alcanzar un voltaje estable, a una temperatura de 4.0 °C, utilizando como soluciones de intercambio NaOH 1.0 M y H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1.0 M (Dhugga y Ray, 1991). Las fracciones generadas durante este proceso, fueron extraídas y colectadas al vacío y depositadas en tubos de ensaye, determinando el pH en cada fracción y cuantificando la actividad con ABTS 0.50 mM en cada tubo, por periodos de 25 segundos durante 5 minutos. Concomitantemente se cuantificó la concentración de proteína por el método de Bradford. El ensayo para la determinación del pI de la enzima lacasa, se efectuó por triplicado.

## Elaboración de un gel en Condiciones Nativas y de un gel SDS-PAGE para la Enzima Lacasa

Se preparó la solución de polímero de acrilamida por combinación de todos los reactivos elaborados para la electroforesis, que son mencionados en la **Tabla 10**. Se necesita preparar el gel de separación y el gel de compactación. Para elaborar el gel de separación se añadieron las soluciones en las cantidades descritas por la **Tabla 8**, excepto el persulfato de amonio (PSA) (Bio-Rad) y *N, N, N', N'*-tetrametil etilen diamina (TEMED) (Bio-Rad), catalizadores que inician la polimerización de la acrilamida y que se adicionaron al final de la mezcla, de acuerdo a las siguientes cantidades para un gel al 10% (**Tabla 8**).

**Tabla 8 . Preparación del gel de separación**

Reactivo	12%	7.5%	10%
Agua Destilada	3.35 mL	4.85 mL	3.95 mL
1.5 M Tris-HCl<8.8	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL
SDS al 10% (w/v)	100µL	100µL	100µL
Acrilamida/bis (30%)	4.0 mL	2.5 mL	3.33 mL
PSA 10% (Fresco)	50µL	50µL	75µL
TEMED	5µL	5µL	7.5µL
Monómero Total	10 mL	10 mL	10mL

Para hacer el PSA al 10% (disuelva 100 mg de PSA en 1 mL de agua desionizada)

Para elaborar el gel en condiciones nativas se excluyó la solución de dodecil sulfato de sodio (SDS) en la mezcla y en las soluciones, adicionando el equivalente en agua desionizada. Para un gel SDS-PAGE si se utilizó SDS y mercaptoetanol. Se agregaron al aparato de electroforesis, 4.0 mL de esta mezcla para formar el gel de separación, polimerizando en aproximadamente 45 minutos. Se debe evitar que exista escape esta mezcla en el sistema hasta que la solución se polimerice. Posteriormente se preparó el gel de compactado combinado las soluciones mencionadas en la **Tabla 9**, se colocó el peine y se añadió esta solución en el aparato, para que se polimerizara. Una vez polimerizado el cuerpo del gel, se colocó en la cámara de electroforesis y adicionaron 500 mL de amortiguador 1X de corrimiento (ver solución F en **Tabla 10**, se efectuó una dilución de 60.0 mL de la solución F, que contenía una concentración 5 X, a pH 8.3 con 240 mL de agua desionizada), en almacén intermedio de la cámara, hasta un nivel mayor al de los pocillos formados y se retiró el peine.

**Tabla 9. Preparación del gel de compactado al 4%**

Reactivo	4%
Agua Destilada	6 mL
1.5 M Tris-HCl<6.8	2.5 mL
SDS al 10% (w/v)	100 $\mu$ L
Acrilamida/bis (30%)	1.33 mL
PSA 10% (Fresco)	50 $\mu$ L
TEMED	10 $\mu$ L
Monómero Total	10 mL

Se prepararon las muestras de proteína con una concentración similar en una dilución 1:4 con el amortiguador de muestra en tubos de Eppendorf de 500  $\mu$ L (solución E en **Tabla 10**, para el gel en condiciones nativas se omitió la adición de SDS y mercaptoetanol), y se añadieron 7.0  $\mu$ L de esta mezcla en cada pocillo.

Para elaborar los geles para la determinación proteica (SDS-PAGE), se efectuaron réplicas en presencia de los agentes desnaturizantes: mercaptoetanol y SDS, que fueron adicionados tanto en el amortiguador de muestra (E), como el SDS en el amortiguador de corrida (F). Las enzimas nativa y modificada se incubaron en un baño María a 95 °C durante 4 minutos, para que se efectuara el desplegamiento proteico y se añadieron con precaución 3.0  $\mu$ L de estas muestras en cada pocillo del gel, incluyéndose la muestra de un patrón estándar de proteínas de bajo peso molecular (Biorad). Tanto para el gel en condiciones nativas como para el gel SDS-PAGE, las condiciones de la electroforesis fueron las siguientes: la fuente eléctrica se programó a 180 V durante 55 minutos y a 400 mA. Una vez que las muestras migraron, se desmontó el aparato y con precaución se retiraron las placas de vidrio, para separar el gel. Se procedió a lavarlo con agua desionizada y a revelar el gel mediante la tinción con del azul de Coomassie o con la tinción con plata. (Laemmli, 1970).

**Tabla 10. Procedimiento y reactivos para la preparación de geles de poliacrilamida (PAGE)**

Solución	Reactivo	Cantidad/ 50mL	Cantidad/ 100mL
A	Acrilamida/bis (30% T, 2.67% C)	14.6 g	29.5g
	N, N-bis-metilenacrilamida	0.4 g	0.8
Almacenar a 4°C en oscuridad 30 días máximo			
B	<b>1.5M Tris-HCl pH 8.8</b>		
	Tris-Base	18.15 g	18.15
	Agua desionizada	≈80 mL	
Ajustar el pH 8.8 con HCl 6N, hacer hasta 100 mL almacenar a 4°C			
C	<b>0.5M Tris-HCl, pH 6.8</b>		
	Tris Base	6 g	
	H <sub>2</sub> Od	60 mL	
Ajustar el pH 6.8 con HCl y aforar a 100 mL			
D	<b>10% de Dodecil Sulfato de Sodio</b>		
	SDS	10 g	
	H <sub>2</sub> Od	90 mL	
Agitar levemente y aforar a 100 mL			
E	<b>Buffer de Muestra</b>	<b>40 mL Total</b>	<b>8 mL Total</b>
	0.5 M Tris-HCl pH 6.8	5 mL	1 mL
	H <sub>2</sub> O desionizada	19 mL	3.8 mL
	Glicerol	4 mL	0.8 mL
	*10% w/v SDS	8 mL	1.6 mL
	*2 Mercaptoetanol	2 mL	0.4 mL
	1% Azul de Bromofenol (0.1g/10mL)	2mL	0.4 mL
Diluir la muestra 1:4 y calentar a 95°C 4 minutos, sin desnaturalizar no se aplican (*)			
F	<b>Buffer de Corrida 5X pH 8.3</b>	<b>500 mL Total</b>	
	Tris -Base	7.5 g	15 g/L
	Glicina	36 g	72 g/L
	SDS	2.5 g	5 g/L
≈ 450 mL agregar todos los reactivos y agitar levemente, Almacenar a 4°C. Si ocurre precipitación incubar a temperatura ambiente			
G	<b>Solución de Revelado de Gel</b>		
	Azul de Coomassie 0.1%	0.5 g/500 mL	0.1 g/100 mL
	Metanol 40%	200 mL/500 mL	40 mL/ 100 mL
	Ácido Acético Glacial	50 mL/ 500 mL	10 mL/ 100 mL
H	<b>Solución de Desteñido de Gel</b>		
	Metanol 40%	200 mL/500 mL	40 mL/ 100 mL
	Ácido Acético Glacial	50 mL/ 500 mL	10 mL/ 100 mL

(Laemmli, 1970)

---

## Actividad Zimográfica de la Enzima Lacasa

Se utilizó el gel en condiciones nativas, el cual fue destinado a la determinación zimográfica de las muestras de enzima lacasa original y modificada. Se evitó la presencia de agentes desnaturalizantes en todas las soluciones como son: el mercaptoetanol y SDS, así como el calentamiento previo a la colocación de las muestras en los pocillos del gel. Una vez que se realizó la migración de las muestras enzimáticas en las condiciones descritas en la sección anterior, el gel fue sumergido en una solución de actividad zimográfica por 5 a 10 minutos (**Tabla 11**). La solución contenía el sustrato enzimático con el fin de situar las bandas con actividad lacasa.

**Tabla 11. Solución de actividad zimográfica para gel nativo**

Reactivo	Cantidad
Amortiguador de fosfatos 50mM pH 6	1.5 mL
Agua Desionizada	12 mL
ABTS 0.5mM	1.5 mL

Una vez que se generaron las bandas debido a la actividad enzimática, el gel fue fijado en papel celofán, primeramente suspendiéndolos en una solución de glicerol al 10.0 % e isopropanol al 20.0%. Posteriormente el gel fue retirado cuidadosamente de la solución y junto con el papel celofán, se colocaron en un cuadro extensor de acrílico, de manera que el gel quedará en medio de dos celofanes. Posteriormente se procedió a secarlo por medio de un ventilador de aire caliente, durante un tiempo de 20 minutos y una vez que se enfrió el gel se recortaron las orillas del papel celofan, para delimitar el gel

## Estimación de la Temperatura Óptima de la Enzima Lacasa

La enzima purificada se incubó a las temperaturas de 10, 20, 30, 40, 45 50, 55 y 60 °C, en un amortiguador de fosfatos 50.0 mM a pH 6.0 durante 2 minutos, para su inmediata determinación espectrofotométrica de la actividad, a una longitud de onda de 420 nm con ABTS 0.50 mM. La medición fue hecha en un espectrofotómetro UV-160A SHIMADZU, donde se registro la absorbancia cada 25 segundos hasta un periodo de 5 minutos.



La velocidad de reacción fue calculada a las temperaturas indicadas y se determinó la constante de activación y desactivación por medio de la ecuación de Arrhenius, así como la temperatura óptima de actividad de la enzima lacasa. La ecuación de Arrhenius es en teoría, el modelo más frecuentemente empleado, para relacionar la dependencia de la temperatura sobre la velocidad de reacción en el campo de las enzimas (Gutfreund, 1995).

A medida que aumenta la temperatura ocurren dos reacciones simultáneas:

1. La velocidad de reacción aumenta como sucede en la mayoría de las reacciones químicas.
2. La estabilidad de la enzima disminuye por inactivación térmica.

Las constantes de reacción aumentan con la temperatura, de acuerdo con la ecuación de Arrhenius. Esta relación se expresa matemáticamente como sigue:

$$k = A \exp^{-E_a/RT}$$

o en su forma lineal:

$$\log k = \frac{E_a}{2.3 R} \frac{1}{T} + \log A$$

La forma integrada de la ecuación de Arrhenius es:

$$\log \frac{k_2}{k_1} = \frac{E_a^i}{2.3 R} \times \frac{(T_2 - T_1)}{T_2 T_1}$$

Donde,

$k_1$  y  $k_2$  = son las constantes específicas de reacción (activación o desactivación ( $\text{min}^{-1}$ ) a las temperaturas  $T_1$  y  $T_2$

$A$  = factor de frecuencia o factor preexponencial ( $\text{min}^{-1}$ )

$E_a^i$  = energía de activación o desactivación (Kcal/mol)

$R$  = constante universal de los gases (8.135 J/mol °K)

$T$  = temperatura de incubación (°K)

---

## Determinación de la Termoestabilidad de la Enzima Lacasa en Solventes

Tanto la enzima nativa como la enzima derivatizada, se incubaron en ausencia y presencia de los cosolutos a concentraciones de 10.0 % y 30.0 % (metanol, etanol, propanol y acetonitrilo) en un amortiguador de fosfatos 50.0 mM a pH 6.0, determinándose la actividad de la enzima lacasa cada 30 minutos, desde 40.0 °C hasta 80.0 °C en intervalos de 10.0 °C, hasta obtenerse actividad nula e indetectable.

La determinación espectrofotométrica de la actividad para cada temperatura, fue obtenida en lapsos de 25 segundos por un tiempo total de 5 minutos, a una longitud de onda de 420 nm, con ABTS 0.50 mM como sustrato enzimático. Se estimó la constante de desactivación  $k_i$ , por intrapolación a la ecuación de primer orden  $A=A_0 \exp^{-k_i t}$  a los datos experimentales.

## Dicroísmo Circular (CD) de la Enzima Lacasa

Las determinaciones espectropolarimétricas de la enzima lacasa se midieron en un espectropolarímetro marca Jasco modelo J-715 (Jasco Inc., Easton, MD), equipado con una celda con agitación, calentada por un controlador de temperatura, tipo Peltier (PTC-348WI) y el registro de temperatura se efectuó a través de un termopar. Las muestras de la enzima lacasa nativa y modificada a una concentración de 0.2 mg/mL, fueron disueltas en 50 mM de un amortiguador de fosfatos a pH 6.0, al igual que con etanol 10.0 % y también en una mezcla de propanol al 30.0%. Las mezclas que fueron colocadas por separado en una celda de cuarzo de 0.10 cm de recorrido óptico. Se registraron las elipticidades, como una medida de la elipticidad residual  $[\theta]$  (\*) en los espectros de las muestras, usando un amortiguador de fosfatos como testigo, desde un intervalo de longitud de onda de 190 nm a 250 nm, con las siguientes condiciones: velocidad de registro 0.50 nm/min, resolución 0.20 nm y 25.0 °C. Por otro lado se investigó el efecto de la temperatura sobre las estructura secundaria de las muestras de proteína.

*(\*)La luz polarizada en el sentido lineal puede ser desviada hacia la derecha o izquierda, cuando pasa por un compuesto quiral. La luz que se desvía en sus componentes por la acción del compuesto, traza una elipse, siendo elípticamente polarizada. Esta puede expresar de dos maneras, una es medir la diferencia de absorbancia de los dos componentes. La otra es medir el vector tangente a los componentes vectoriales, para obtener la elipticidad (Fasman, 1996).*

---

Las transiciones térmicas de desnaturalización espectropolarimétrica fueron realizadas desde una temperatura de 25.0 hasta 88.0 °C, con una resolución de 0.20 °C, una velocidad de 1.0 °C/min, a una longitud de onda fija de 202 nm. Se evaluaron los cambios de elipticidad en espectros antes y después de las transiciones para investigar el efecto de la temperatura sobre la estructura secundaria de las muestras de proteína.

### **Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)**

Se trazaron endotermas calorimétricas del amortiguador de la enzima lacasa nativa y la enzima modificada, obtenidas con un calorímetro diferencial de barrido MicroCal Inc. (Northampton, MA). Las mediciones se realizaron contra el testigo, que consistía en un amortiguador de citratos 5.0 mM, a pH 5.0 y una muestra de enzima lacasa nativa y derivatizada con concentraciones similares de 2.0 mg/mL disueltas en el mismo amortiguador.

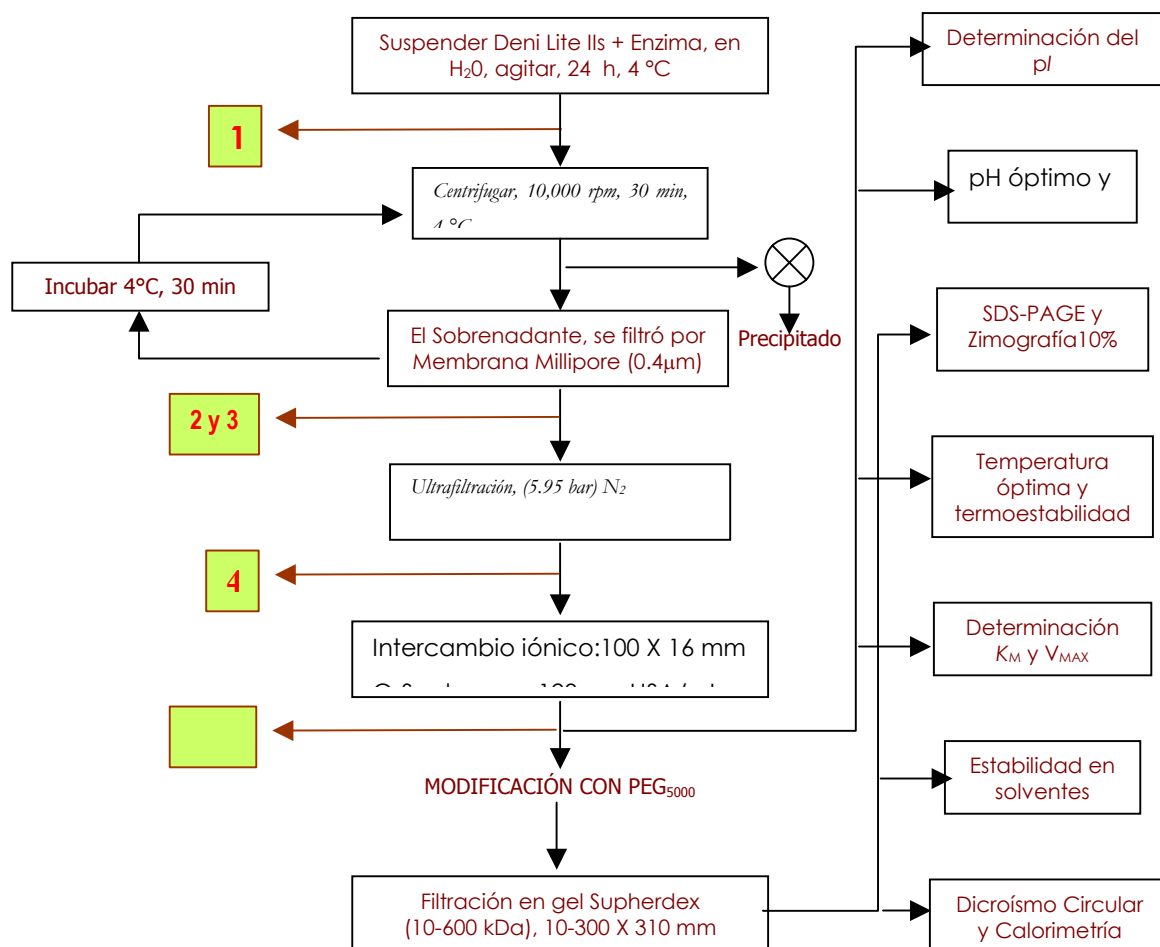
Las muestras de proteína y amortiguador fueron desgasificados al vacío, con agitación vigorosa. Posteriormente, las proteínas fueron sometidas al desplegamiento desde una temperatura de 25.0°C hasta 100.0 °C, donde la velocidad de calentamiento fue de 1 °C/min. Ambas celdas se encontraban presurizadas con N<sub>2</sub> gaseoso y con presión de vacío en la chaqueta adiabática de 0.0106 atm. Se empleó el programa Origin (MicroCal), para el análisis de datos con el fin de restar la línea base de los termogramas de un testigo y de las muestras, para el cálculo de la entalpía específica de desnaturalización ( $\Delta h_{cal}$ ).

---

# **CAPITULO V:** **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## Purificación de la Enzima Lacasa

La enzima lacasa de *M. thermophila* (MtL), fue extraída del polvo Deni Lite IIs, muestra comercial que fue adquirida a través de la empresa Novo Nordisk. El polvo fue tratado y analizado de acuerdo con la metodología descrita en la **Figura 8**.



**Figura 8.** Proceso de extracción a partir del polvo, purificación y análisis efectuados a la enzima lacasa nativa, y modificación de la enzima lacasa.

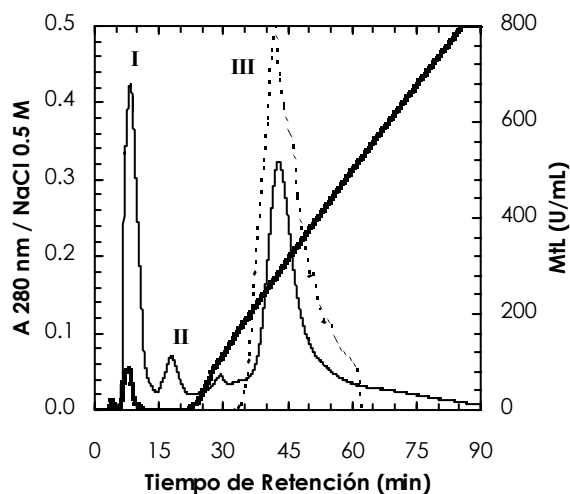
El proceso de extracción fue ejecutado en frío para evitar la desnaturalización de la enzima. Al disolver el polvo comercial por un tiempo prolongado, cierta cantidad de polisacáridos se redissuelve en el amortiguador a temperatura ambiente. Estos polisacáridos se precipitan a temperaturas bajas, y se realizó este proceso en frío para facilitar su separación por la centrifugación. El sobrenadante fue concentrado por ultrafiltración y por diálisis, debido a que en el extracto se encuentra el mediador ácido fenotiazin-10-propionico (AFP), originalmente presente en el Deni Lite IIs (Soares y col., 2001); este mediador puede aumentar la velocidad de oxidación del ABTS durante la determinación

de la actividad. Por ello, se tuvieron discrepancias en la determinación de la actividad en las primeras etapas de la purificación (**Tabla 12**). El mediador AFP oxidado también es capaz de oxidar a su vez otros colorantes (Villaseñor y col., 2004), por lo que en las primeras etapas del proceso de extracción también fue difícil cuantificar la cantidad de proteína por el método de Bradford, ya que este reactivo contiene azul brillante de coomassie. El AFP adquiere un color rojizo en su estado oxidado en solución, y es difícil de eliminar por diálisis a través del proceso de ultrafiltración, quedando cierta cantidad remanente en la solución concentrada; solo mediante la cromatografía de intercambio iónico fue posible separarlo (**Figura 9: ver pico de adsorción I**), pues ese mediador fue colectado en las primeras fracciones en la elución del extracto. Durante el proceso de purificación también se tomaron muestras de 100  $\mu$ L del extracto enzimático (**Figura 8**), para estimar el factor de purificación. Es por ello que el cálculo de este factor, se hizo a partir de la actividad observada después del proceso de centrifugación, según está señalado en la **Tabla 12**.

**Tabla 12. Proceso de extracción y purificación de la lacasa**

	Actividad Total (U) x 10 <sup>3</sup>	Rendimiento (%)	Proteína (mg)	Actividad Específica (U/mg)	Factor de Purificación
Deni Lite IIs	2.42	100	88.2	27.5	
Centrifugación	2.18	89.9	134	16.3	1.0
Ultrafiltración	2.17	89.7	83.1	26.2	1.6
concentración	1.75	72.1	74.6	23.4	1.4
Q-Sepharosa	1.60	65.7	59.9	26.6	1.6
Diálisis	1.51	62.5	50.9	29.7	1.8

La pérdida de enzima total al final del proceso de purificación fue de aproximadamente 42.3%, sin que se presentase disminución en la actividad enzimática específica. Otro proceso alternativo de extracción de la enzima lacasa, se llevó a cabo por la precipitación con acetona al 85.0 % (v/v) y fue realizado en investigaciones efectuadas por Villaseñor y col (2004). Ellos comprobaron que la acetona afecta considerablemente la actividad de la enzima lacasa. Obtuvieron una actividad relativa máxima del 63.0 %, recuperando el 95% de la enzima, pero con trazas de solvente.

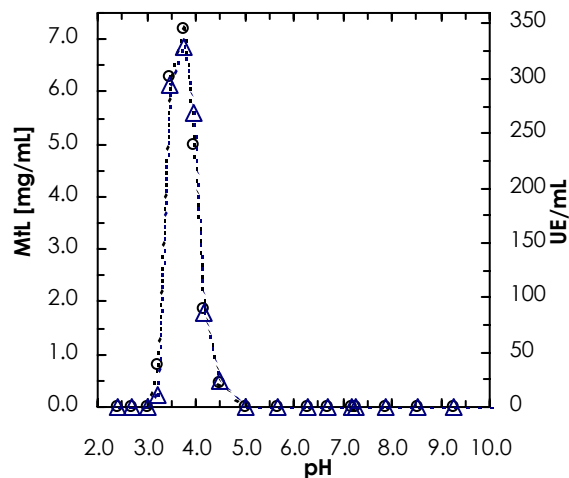


**Figura 9.** Purificación de la enzima Mtl. La elución de la proteína Mtl en una columna de intercambio iónico de Q-Sepharosa, fue hecha usando 50.0 mM de Tris-HCL, a pH 7.3 con un gradiente de 0.50 M de NaCl (—). Se determinó la actividad (-o-) y la absorbancia a 280 nm (- -).

La fracción que mostró actividad oxidativa con ABTS 5.0 mM como sustrato, fue purificada en la columna de intercambio iónico (**Figura 9: pico de adsorción III**), y concentrada por ultrafiltración, obteniéndose al término de este proceso un color azul intenso en la solución, por la presencia del cobre característico del sitio activo de la enzima. Esta preparación fue estable a temperatura de 4.0 °C por tiempo prolongado, estando la enzima suspendida en amortiguador de fosfatos 50.0 mM, a pH 6.0. El factor de purificación de la enzima fue aproximadamente 2 veces (**Tabla 12**). La pureza de la enzima fue verificada por electroforesis SDS-PAGE con un gel al 10.0% (**Figura 19**).

### Características de la Enzima Purificada

Las características principales que presentó la enzima Mtl purificada se describen a continuación. Su  $pI$  fue 3.77 (**Figura 10**) determinado por isoelectroenfoque, el cual discrepa ligeramente con lo reportado en literatura (Berka y col., 1997) para la enzima lacasa recombinante rMtl obtenida de esta misma especie el cual fue de 4.2.



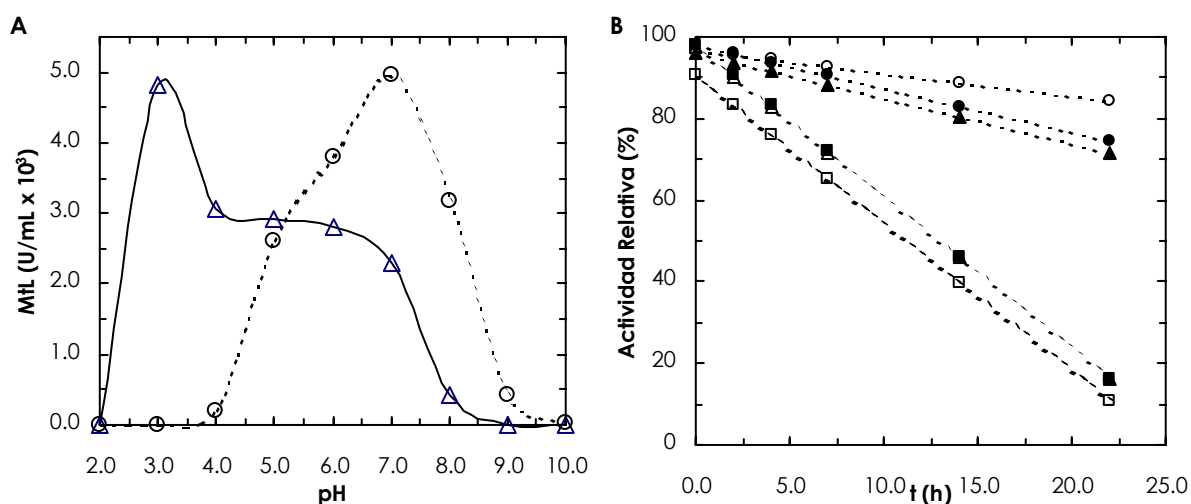
**Figura 10.** Electroenfoque de la enzima Mtl. La determinación del *pI* se efectuó con anfólitos en un gradiente de pH 3.0 a 10.0 y en las fracciones colectadas se estimó la actividad (-Δ-) y la cantidad de proteína (-O-).

**Tabla 13. Características fisicoquímicas de algunas enzimas lacasa de hongos**

Fuente Fúngica	<i>pI</i>	pH ópt.	PM (kDa)	Referencia
<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	3.4	5.0	71	Fukushima y Kirk., 1995
<i>Trametes villosa</i>	5.0	5.5	63	Yaver y col., 1996
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	3.7	5.0	81	Eggert y col., 1996
<i>Pleurotus eryngii</i> , lacasa I y II	4.1 y 4.2	4.0	65 y 61	Muñoz y col., 1997
<i>Trametes sp</i> PM1 (CECT 2971)	3.0	5.0	53.5	Mansur y col., 1997
<i>Pleurotus ostreatus</i> POXA1 y POXA2	6.7 y 4.0	7.0	54 y 59	Palmieri y col., 1997
<b>Recobinante <i>M. thermophila</i></b>	<b>4.2</b>	<b>6.5</b>	<b>75-95</b>	<b>Berka y col., 1997</b>
<i>Coriolus hirsutus</i>	4.0	6.0	55	Koroljova y col., 1998
<i>Chaetomium thermophilum</i>	3.9	nd	77	Chefetz y col., 1998
<i>Coprinus cinereus</i>	4.0	6.5	58	Schneider y col., 1999
<i>Ganoderma lucidum</i>	4.2-5.1	7.0	40-66	D'Souza y col., 1999
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	3.95	5.5	70.5	Varela E. y col., 2000
<i>Pleurotus ostreatus</i> , var. Florida	2.9	6.5	59	Hublik y Schinner, 2000
<i>Coriolus hirsutus</i>	4.0	6.0	87.6	Koroleva y col., 2001
<i>Coriolus zonatus</i>	4.4	5.0	85	Koroleva y col., 2001
<i>Corioloopsis gallica</i>	3.4	4.0	66	Vandertol y col., 2002
<i>Rigidoporus lignosus</i>	3.2	nd	53.4	Garavaglia y col., 2004



La mayoría de las enzimas lacasas presentan en general un  $pI$  similar (**Tabla 13**), indicando que la similitud existente en la estructura primaria. Los aminoácidos con carga pueden estar expuestos al solvente en forma similar, estando muchos de ellos conservados entre esta clase de cuproproteínas pertenecientes a las diferentes fuentes fúngicas. Tal comparación entre las enzimas lacasas de diferentes hongos, se presenta en la **Tabla 20** a través de alineamientos de su secuencia de aminoácidos.



**Figura 11.** Determinación de la actividad de la enzima MTL respecto al pH. (A) Determinado con ABTS 5mM (-Δ-) y siringaldazina 0.5mM (-○-), como sustrato. (B) Estabilidad de la enzima MTL incubada a pH 3.0 (■), 4.0 (□), 5.0 (Δ), 6.0 (●), 7.0 (○) y 8.0 (▲).

En lo que respecta a las características catalíticas de la enzima MTL relacionadas con el cambio de pH, esta enzima oxidó una solución 5.0 mM de ABTS con un pH óptimo de 3.0, mientras que la oxidación de la siringaldazina 0.5 mM se realizó de forma óptima a pH de 7.0 (**Figura 11 A**). La diferencia en el pH óptimo para la oxidación de los dos sustratos es consistente con la hipótesis propuesta por Berka y col. (1997), quienes estipularon que en la oxidación de un sustrato la cinética de transferencia de electrones en el sitio catalítico a un pH determinado, es más importante al oxidar los sustratos, que la afinidad por los mismos. Aunque los resultados obtenidos para esta tesis demuestran que la oxidación posiblemente difiere por baja estabilidad de la enzima respecto al pH.

Esta enzima fue más estable a pH de 7.0 a temperatura ambiente, con un 20% de pérdida de la actividad relativa durante 25 h, pero a pH menor, se perdió la actividad relativa hasta en un 80% de actividad inicial durante el mismo tiempo de incubación (**Figura 11 B**). Los resultados fueron drásticos utilizando amortiguadores a pH 9.0 y a pH 10.0, donde la actividad fue muy baja, por lo cual no se graficaron. Con ello se confirma que generalmente las enzimas lacasa son del tipo ligeramente acidófilo (**Tabla 13**).

Otras características obtenidas en este trabajo para la enzima MtL, se resumen en la **Tabla 14**.

**Tabla 14. Características fisicoquímicas experimentales de la lacasa MtL**

pl: 3.77
Peso Molecular por Filtración en Gel (Superdex)= 78.58 kDa
$^{\circ} \epsilon$ MtL = 124160 L mol <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>
Índice de pureza (A <sub>280</sub> :A <sub>606</sub> )=4.5
K <sub>M</sub> = 49.5 μM (ABTS)
k <sub>cat</sub> = 6.01x 10 <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> (ABTS)

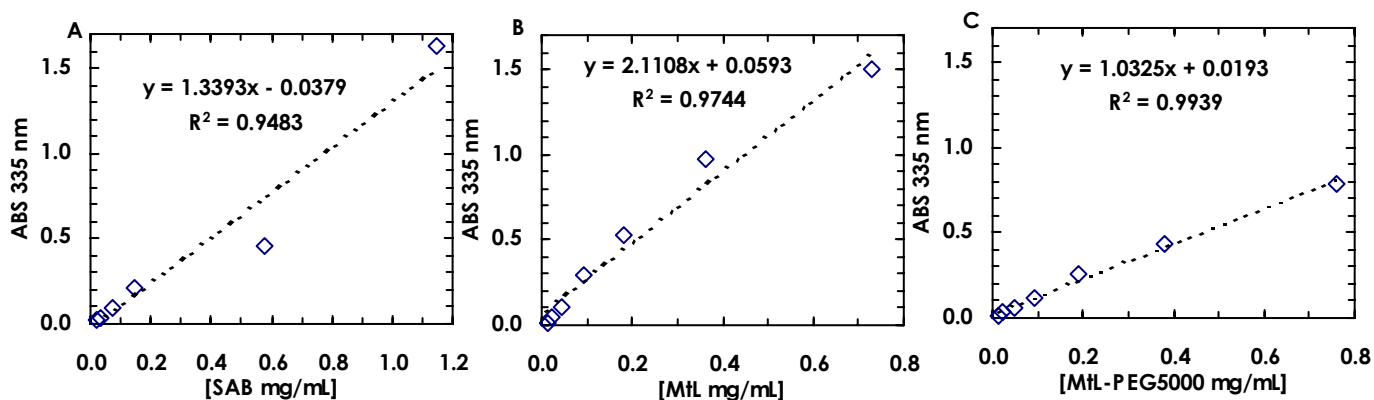
<sup>a</sup> calculado a través de la formula  $\epsilon = 5540n_{Trp} + 1480n_{Tyr} + 134n_{Cys}$  (Shirley, 1995)

### Conjugación con PEG<sub>5000</sub> de la Enzima Lacasa MtL

La enzima MtL fue modificada con 50 excesos de PEG<sub>5000</sub> (activado con cloruro cianúrico) por mol de proteína (MtL-PEG<sub>5000</sub>). El acoplamiento covalente de los grupos PEG<sub>5000</sub> activados a los grupos ε-amino de los residuos aminoacídicos de la lisina y grupos sulfhidrilos se efectuó a pH 10.0 (**ver Figura 6**). Las modificaciones que se efectuaron en la proteína lacasa se cuantificaron químicamente a través del método de los grupos amino libres con el ácido trinitrobenzen sulfónico (TNBS), método aplicado por Habeeb en 1966 y descrito en los “Materiales y Métodos”.

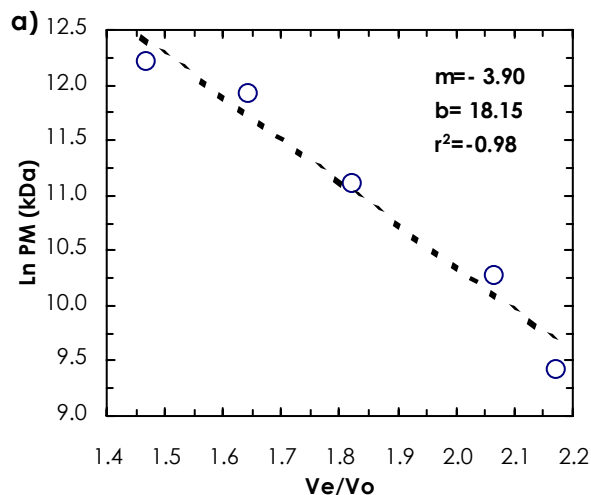
Los resultados se exhiben en la **Figura 12** e indican que se modificó el 54% de los grupos amino de los residuos de lisina en la proteína MtL-PEG<sub>5000</sub>. Los cálculos demuestran que sólo reaccionaron 15 residuos de lisina de las 16 que estarían expuestos al medio en la enzima nativa y al mismo tiempo reaccionaron 8 lisinas con PEG<sub>5000</sub>, en la enzima MtL-PEG<sub>5000</sub>. Estos cálculos se obtuvieron al comparar las pendientes obtenidas en los gráficos de la **Figura 12**.

Se ha reportado que esta reacción de modificación tiene un grado de selectividad bajo, puesto que también existe reacción con grupos sulfhidrilo y que en algunas proteínas esta reacción con m-PEG<sub>5000</sub>, en particular (Wieder y col., 1979; Ashihara y col., 1978), conduce a una pérdida sustancial de la actividad enzimática. Este último aspecto no se presentó en esta tesis.



**Figura 12.** Curva estandar de la formación de trinitro fenil derivados de A) SAB control interno del experimento, B) enzima nativa (MtL) y C) enzima derivatizada (MtL-PEG<sub>5000</sub>). Se presenta la pendiente de la curva y el parámetro R<sup>2</sup>.

Otra característica determinada experimentalmente fue el peso molecular (PM) de la enzima MtL y de MtL-PEG<sub>5000</sub>. Esto se hizo por medio de la cromatografía de filtración en gel, utilizando una columna Superdex con límites de 10-600 kDa, equilibrada con amortiguador de acetatos 50.0 mM a pH 5.0. Las muestras se eluyeron con el amortiguador conteniendo 0.15 M de NaCl. Los resultados para el cálculo del peso molecular para las dos enzimas se muestran en la **Figura 13**.



Citocromo c	12.4	9.42	0.613
Anh. Carbónica	29	10.27	0.556
SAB	66	11.09	0.429
Alc. Deshidrogenasa	150	11.92	0.337
Amilasa	200	12.20	0.245
<b>MtL</b>	<b>78.6</b>	<b>11.27</b>	0.207
<b>MtL-PEG</b>	<b>325.9</b>	<b>12.70</b>	0.398

**Figura 13.** Determinación del PM de la enzima MtL respecto a los estándares de diferente PM. (a) Curva estándar de las proteínas (o) y ajuste lineal (- - -). (b) Tabla del coeficiente de elución de las proteínas estándares y las enzimas lacasa nativa y modificada.

Por separado se eluyeron las muestras de enzima MtL y MtL-PEG<sub>5000</sub>, y de proteínas estándar de peso molecular conocido: citocromo *c* (12.4 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), seroalbúmina (66 kDa), alcohol deshidrogenasa (150 kDa) y amilasa (200 kDa), correlacionando el PM y el volumen de elución  $K_{av}$ .

La enzima lacasa MtL fue colectada entre los 12 a 17 mL, fracciones con actividad enzimática elevada que fueron corroboradas con ABTS 5.0 mM como sustrato y que se correlacionan con un peso molecular aproximado de 78.5 kDa, calculado por interpolación de la curva estándar. Sin embargo, por SDS-PAGE (**Figura 19**) el PM determinado fue de 113 kDa Berka y col. (1997), argumentaron que esta enzima se encuentra altamente glucosilada (entre 40-60%) y que las diferencias se deben a la presencia de carbohidratos covalentemente acoplados a la enzima, lo que resulta en valores diferentes del PM, comparando las técnicas de filtración en gel y PAGE-SDS (García-Arellano y col., 2002).

Es de resaltar que la mayoría de las lacasas presentan un PM promedio (**Tabla 13**) con un intervalo de glucosilación entre 30-50%, demostrando que existe una topología similar, característica entre

---

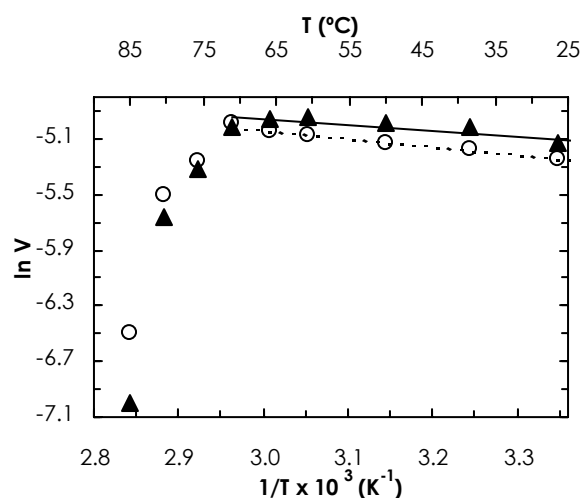
estas proteínas, conjuntamente con la propiedad de que sean excretadas por el micelio de los hongos. La enzima lacasa MtL-PEG<sub>5000</sub>, fue colectada entre los 10 a 12 mL a las mismas condiciones en la cromatografía de filtración en gel, que interpolado a la curva estándar (**Figura 13**), corresponde a un peso molecular de 325 kDa, lo que discrepa con el PM obtenido por el método de electroforesis SDS-PAGE al 10%, en donde la migración de la enzima modificada fue similar a la enzima nativa (**ver figura 19**), lo que confirman que la interacción covalente del PEG<sub>5000</sub>, tiene un efecto sobre la enzima lacasa. Es por ello que se calculó indirectamente el aumento del PM de este conjugado, a través del método de grupos amino libres (**Figura 12**), obteniendo un PM de 116 kDa, lo que corresponde a un incremento de 37.5 kDa atribuido al PEG<sub>5000</sub>.

En el análisis de los resultados para los ensayos subsecuentes, se presentan las comparaciones entre la enzima MtL y MtL-PEG<sub>5000</sub>.

### **Temperatura Óptima y los Parámetros Cinéticos de MtL y MtL-PEG<sub>5000</sub>**

Por lo que respecta a la temperatura, las enzimas muestran un óptimo de actividad a la temperatura ( $T_{OPT}$ ) de 70 °C, empleando ABTS como sustrato, lo que corrobora que la enzima MtL es termofílica (**Figura 14**), resultado que es diferente al obtenido en literatura para la lacasa recombinante (rMtL) y que fue de 60.0 °C (Berka y col., 1997).

La energía activación para la enzima nativa fue de 18 KJ/mol y para la enzima derivatizada de aproximadamente 25 KJ/mol, lo que indica que la enzima MtL-PEG<sub>5000</sub> tuvo un 38 % mas de activación. La energía de desactivación para la enzima nativa fue de -225 KJ/mol y para la enzima modificada se obtuvo un valor de -139 KJ/mol, lo que indica que la enzima modificada de desactivo un 62% menos respecto de la nativa, indicio sugerente de que el cambio en las propiedades catalíticas son debidas la conjugación.



**Figura 14.** Determinación de la temperatura óptima de la enzima MtL ( $\Delta$ ) y MtL-PEG<sub>5000</sub> (o). Se muestra el ajuste de la activación y desactivación de las enzimas, a través del modelo tipo Arrhenius (-----).

Para el análisis matemático de Arrhenius, las reacciones que están controladas por la velocidad de difusión tienen muy baja barrera de energía de activación (20 a 40 KJ/mol), como caso de la enzima MtL y MtL-PEG<sub>5000</sub> (Gutfreund, 1995). Los parámetros de activación y desactivación comparativos se presentan en la **Tabla 15**. La energía de activación fue similar en estas enzimas respecto con las lacasas de diferentes especies fúngicas, ello confirma que esta enzima es termofílica y que la estructura primaria está conservada en gran medida.

Para determinar los parámetros cinéticos de la enzima lacasa MtL y MtL-PEG<sub>5000</sub>, se utilizaron ABTS y DMP como sustratos. Estas determinaciones fueron efectuadas a temperatura ambiente en mezclas constituidas por diferentes concentraciones de ABTS (0 –2.5 mM) de amortiguador de acetatos 50 mM a pH 6.0, y DMP (0-1.5 mM) en propanol al 10.0%, resultados que se presentan en la **Tabla 16**. Se cuantificó el incremento de absorbancia ( $\lambda_{\text{ABTS}}=420$ ,  $\epsilon_{\text{ABTS}}= 36000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,  $\lambda_{\text{DMP}}=469$ ,  $\epsilon_{\text{DMP}}= 49600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , Berka y col., 1997). Los datos se ajustaron a través del modelo cinético tipo Michaelis-Menten, como se muestra en la **Figura 15**.

Tabla 15. Parámetros de activación y desactivación de la enzima lacasa nativa y MTL-PEG<sub>5000</sub>

Fuente Fúngica	E <sub>a</sub> (KJ/mol)	A <sub>a</sub>	E <sub>d</sub> (KJ/mol)	A <sub>d</sub>	Referencia
MtL <sup>a</sup>	18	0.12	-224.3	9.6x10 <sup>-37</sup>	
MtL-PEG <sub>5000</sub> <sup>a</sup>	25	0.20	-138.5	7.8x10 <sup>-24</sup>	
<i>RmtL</i>	19				Berka y col., 1997
<i>Coprinus cinereus</i>	14				Schneider y col., 1999
<i>Fomes fomentarius</i>	17				Di Nardo y col., 2004
<i>Curvularia sp</i>	25				Banerjee y col., 1991
<i>Botrytis cinerea</i>	22				Slomczynski y col., 1995
<i>Lentinula edodes</i>	55				D' Annibale y col., 2000
<i>Trametes hirsutus</i> <i>Poliporus versicolor</i> <i>Trametes versicolor</i> <i>Pleurotus ostreatus</i> <i>Rhus vernicifera</i>	25-37				Fessenfeld, 1960

<sup>a</sup>Los parámetros fueron ajustados por la rutina solver de Excel a través del modelo matemático de Arrhenius.

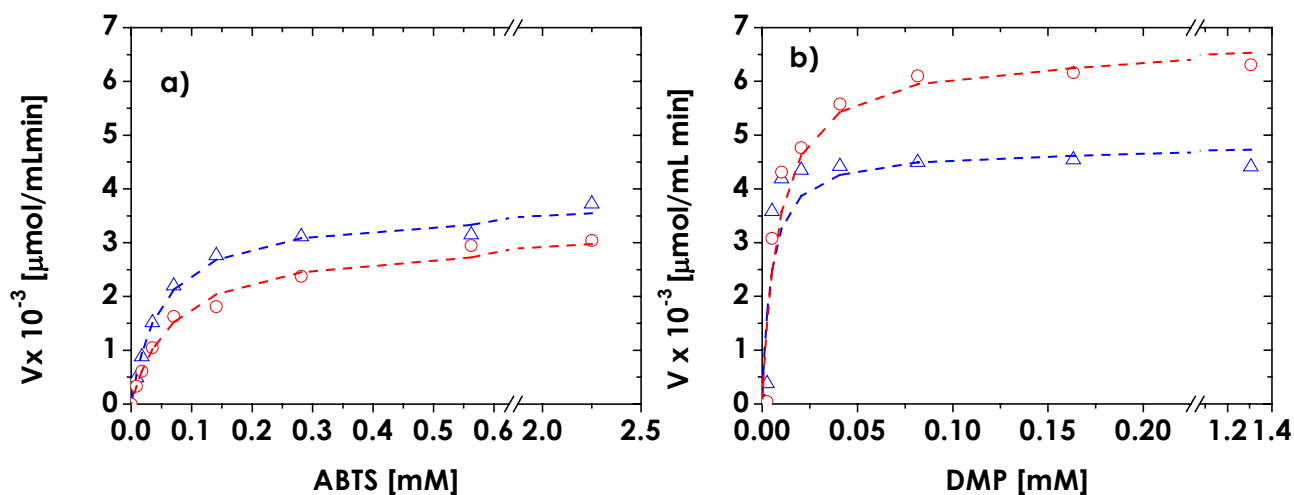


Figura 15. Cinética tipo Michaelis-Menten a temperatura ambiente de la enzima MTL ( $\Delta$ ) y MTL-PEG<sub>5000</sub> ( $\bullet$ ), utilizando como sustratos (a) ABTS y (b) 2,6-Dimetoxifenol (DMP) este último disuelto en propanol al 10.0% con amortiguador de fosfatos. También se presenta el ajuste de los datos por a través de la rutina de Newton-Raphson, usando el programa "Solver" de Excel (----)

Los parámetros catalíticos de las enzimas nativa y modificada son diferentes a los de diversas enzimas fúngicas; estos efectos se han presentado en enzimas que se ha tratado con mutaciones dirigidas (Xu y col., 1998) y modificadas con PEG como en la enzima lacasa del hongo *Coriolopsis gallica* (Vandertol-Varnier y col., 2002). Posiblemente se presente un cierto impedimento estérico en la interacción del sustrato con la enzima modificada, porque las cadenas de PEG tienen un tamaño de 5000, lo cual se refleja en una aparente disminución de la afinidad por el sustrato si comparamos el  $K_M$  de ambas enzimas. Estos cambios pudieran deberse a una aparente modificación del sitio activo, por el impedimento estérico que provocan las moléculas de PEG y un cierto grado de rigidez sobre la enzima. También debido al tamaño de la molécula de ABTS en comparación con el DMP (ver **Figura 5**).

**Tabla 16. Constantes cinéticas de sustratos oxidados por las enzimas Mtl y Mtl-PEG<sub>5000</sub>**

Sustrato	Mtl			Mtl-PEG <sub>5000</sub>			Eficiencia Catalítica Relativa
	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_M$ (μM)	$k_{cat}/K_M$ (s <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> )	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_M$ (μM)	$k_{cat}/K_M$ (s <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> )	
ABTS <sup>a</sup>	6.01 x 10 <sup>2</sup>	49.5	1.21 x 10 <sup>7</sup>	3.76 x 10 <sup>2</sup>	71.2	5.29 x 10 <sup>6</sup>	1
DMP <sup>a</sup>	3.48 x 10 <sup>2</sup>	5.02	6.93 x 10 <sup>7</sup>	8.73 x 10 <sup>2</sup>	9.06	9.63 x 10 <sup>7</sup>	1.5
ABTS <sup>b</sup>	3.7 x 10 <sup>6</sup>	0.43	8.6 x 10 <sup>12</sup>	8.3 x 10 <sup>6</sup>	0.25	3.3 x 10 <sup>13</sup>	4
DMP <sup>b</sup>	6.0 x 10 <sup>7</sup>	3.50	1.7 x 10 <sup>13</sup>	1.0 x 10 <sup>8</sup>	1.60	6.2 x 10 <sup>13</sup>	4
Siringaldehido <sup>b</sup>	2.7 x 10 <sup>4</sup>	0.40	6.8 x 10 <sup>10</sup>	3.7 x 10 <sup>6</sup>	0.14	2.6 x 10 <sup>14</sup>	3820
<b>Por Especie fúngica</b>							
<i>T. villosa</i> <sup>c</sup>	45.0 ± 1.60	58 ± 8	7.7 x 10 <sup>5</sup>				
<i>P. cinnabarinus</i> <sup>c</sup>	15.3 ± 0.83	18 ± 5	8.33 x 10 <sup>5</sup>				
<i>M. thermophila</i> <sup>c</sup>	7.33 ± 5.0	96 ± 5	4.05 x 10 <sup>5</sup>				
<i>B. cinerea</i> <sup>c</sup>	0.38 ± 0.03	28 ± 8	1.36 x 10 <sup>4</sup>				

<sup>a</sup> Los parámetros cinéticos experimentales fueron ajustados por la rutina "solver" de Excel. <sup>b</sup> (Vandertol-Varnier y col., 2002). <sup>c</sup> Determinado a 20 °C con ABTS (Li y col., 1999)

También es de resaltar el incremento de 1.5 veces, en la eficiencia catalítica de la enzima modificada usando DMP como sustrato disuelto en propanol al 10.0% en amortiguador de fosfatos. Este sustrato, clásico en la detección enzimática de las lacasas, tiene propiedades aromáticas y no polares considerables (**Figura 5**), y es una prueba fehaciente de que las propiedades de hidrofobicidad en la enzima cambiaron con la conjugación.



---

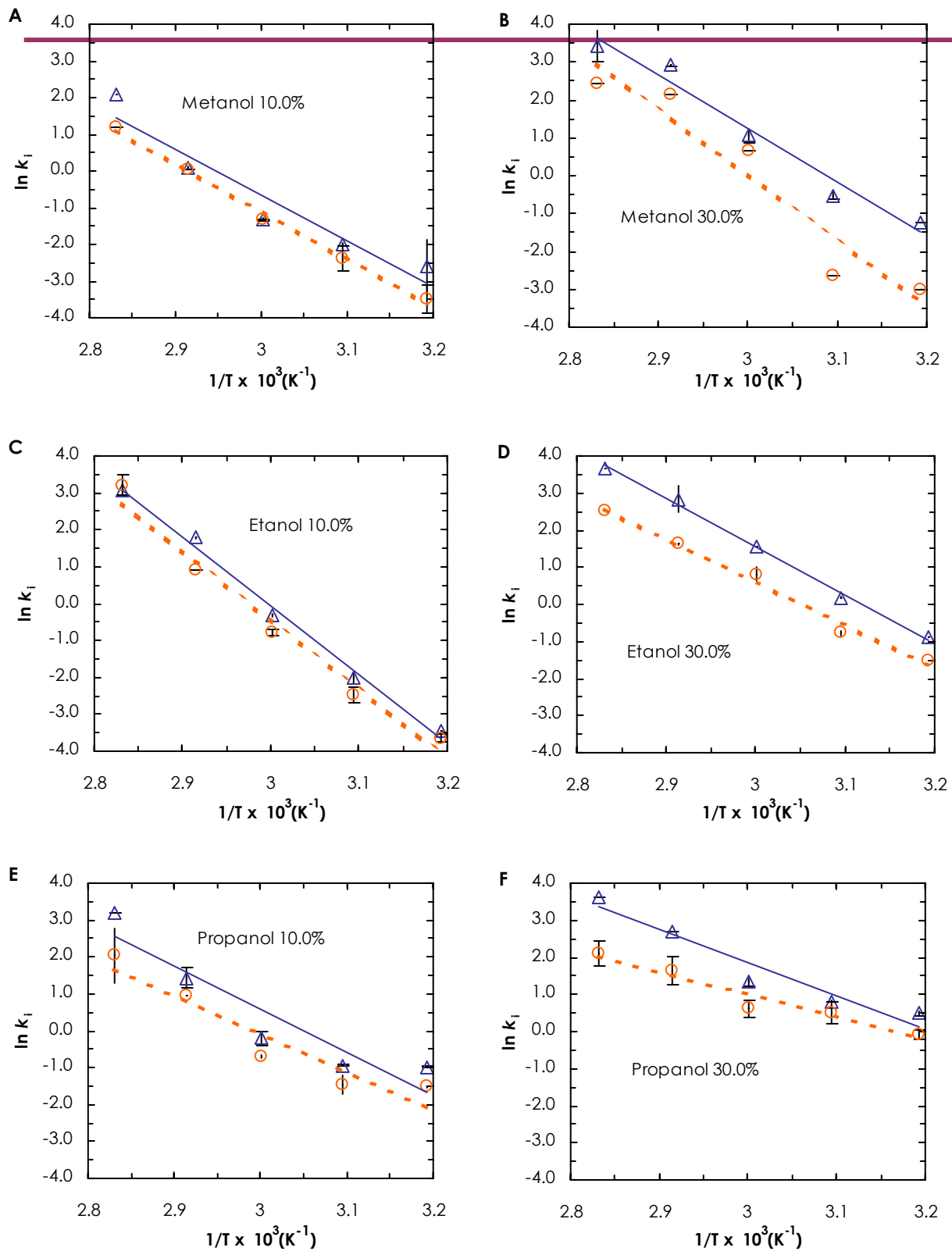
La estimación del número de colisiones producidos entre el sustrato y la enzima muestra que, para reacciones controladas por difusión, la constante de velocidad es de  $2 \times 10^8 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$  (Gutfreund, 1995), por lo cual, se puede asumir que las reacciones catalizadas por la enzima lacasa nativa y modificada, para oxidar el compuesto ABTS y el DMP, están controladas por la difusión.

### **Estabilidad Térmica de las enzimas Mtl y Mtl-PEG<sub>5000</sub>**

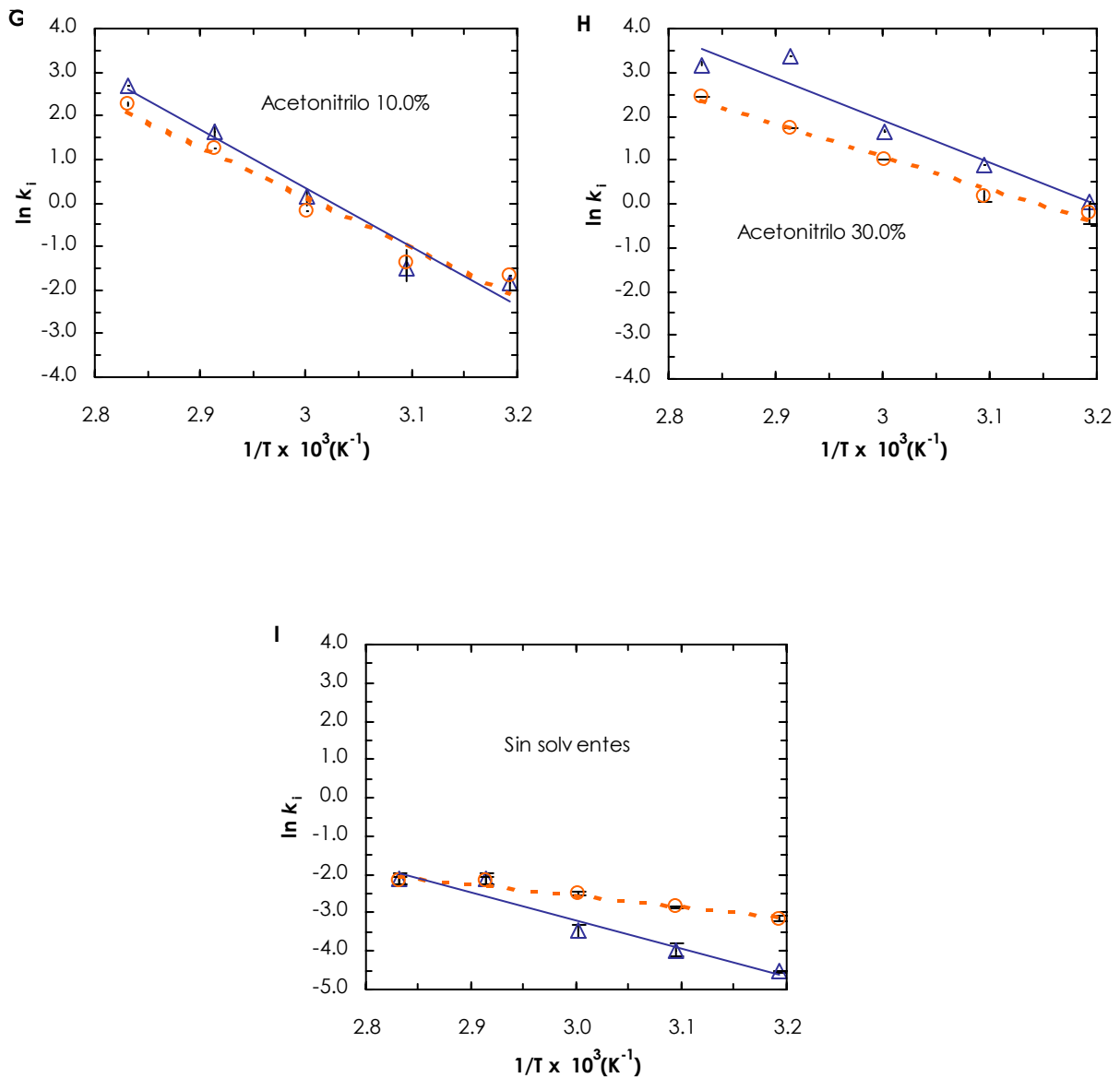
Se llevó a cabo el análisis de la estabilidad térmica entre un intervalo de 40-80°C, incubando la enzima con metanol, etanol, propanol y acetonitrilo, al 10 y 30 %; los resultados se muestran en la **Figura 16**. Puede observarse que sólo existe un pequeño efecto de los cosolventes al 10 % sobre termoestabilidad relativa de las dos enzimas, porque el cambio es mínimo en las constantes de estabilidad de las enzimas (**Tabla 17**), aunque globalmente la estabilidad es ligeramente mejor en Mtl-PEG<sub>5000</sub>, que en la enzima nativa (**Tabla 18**)

Este efecto protector similar a una “coraza”, ya ha sido reportado por el grupo de investigación de Vandertol-Varnier y García-Arellano (2002), los cuales indican que las cadenas hidrocarbonadas del PEG<sub>5000</sub> en el conjugado proteico, interactúan con el solvente, lo que rigidiza la estructura proteica, por el efecto de la interacción del PEG con los solventes.

Relacionado con la estabilidad de las enzimas nativa y conjugada, se obtuvo que no existen diferencias marcadas en la estabilidad. Aunque al efectuar la catálisis en solución de propanol al 30%, la estabilidad de Mtl-PEG<sub>5000</sub> es ligeramente más notoria a una temperatura de 80 °C (ver **Figura 16**).



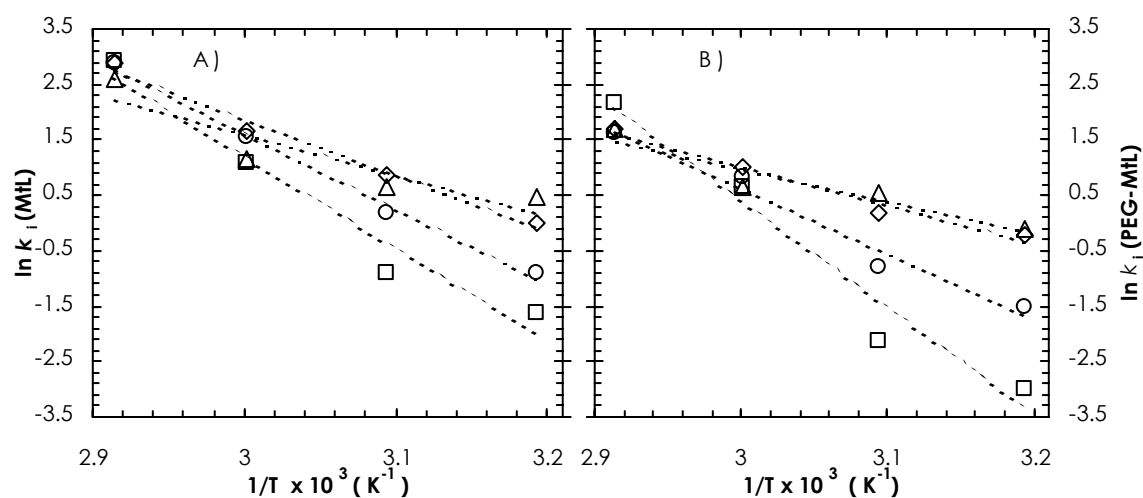
**Figura 16.** Estabilidad térmica en un intervalo de temperaturas de 40 a 80 °C de las enzimas lacasa **MTL** ( $\Delta$ ) ajustada ( $\text{—}$ ) y **MTL-PEG<sub>5000</sub>** ( $\circ$ ) ( $\text{---}$ ) en diferentes solventes. La estabilidad fue estudiada a 10.0% y 30.0%



**Figura 16 (continuación)** . Estabilidad térmica en un intervalo de temperaturas de 40 a 80 °C de las enzimas lacasa **Mtl** ( $\Delta$ ) ajustada (—) y **Mtl-PEG<sub>5000</sub>** ( $\circ$ ) (---) en diferentes solventes. La estabilidad fue estudiada a 10.0% y 30.0%

**Tabla 17. Constantes de estabilidad en solventes al 10 y 30 %**

Actividad específica (h <sup>-1</sup> )								
T (°C)	Nativa	MtL-PEG <sub>5000</sub>	Nativa	MtL-PEG <sub>5000</sub>	Nativa	MtL-PEG <sub>5000</sub>	Nativa	MtL-PEG <sub>5000</sub>
	Metanol 10 %		Etanol 10 %		Propanol 10 %		Acetonitrilo 10 %	
40	0.090 (±0.060)	0.03 (± 0.01)	0.032 (± 5.4 × 10 <sup>-10</sup> )	0.026 (± 0.01)	0.21 (± 0.19)	0.11 (±0.12)	0.16 (±2.9 × 10 <sup>-2</sup> )	0.18 (± 0.01)
50	0.11 (± 0.030)	0.10 (± 0.04)	0.14 (± 0.020)	0.086 (± 0.02)	0.39 (± 0.01)	0.24 (± 0.06)	0.23 (± 0.07)	0.26 (± 0.08)
60	0.27 (± 0.004)	0.27 (± 0.01)	0.72 (± 0.035)	0.46 (± 0.04)	0.83 (± 0.16)	0.50 (± 0.02)	1.16 (± .02)	0.82 (± 0.01)
70	1.08 (± 0.05)	1.05 (± 0.01)	5.93 (± 0.037)	2.44 (± 0.010)	4.33 (± 1.13)	2.62 (± 0.01)	5.25 (± 0.09)	3.5 (± 0.01)
80	7.90 (± 0.02)	3.32 (± 0.01)	21.81 (± 0.040)	25.63 (± 0.70)	24.51 (± 1 × 10 <sup>-3</sup> )	9.34 (± 1.00)	14.68 (±2.0 × 10 <sup>-5</sup> )	9.7 (± 0.35)
	Metanol 30 %		Etanol 30 %		Propanol 30 %		Acetonitrilo 30 %	
40	0.3 (±1.4 × 10 <sup>-5</sup> )	0.05 (± 0.01)	0.4 (± 9.1 × 10 <sup>-6</sup> )	0.22 (± 0.01)	1.6 (± 0.05)	0.9 (±0.10)	1.0 (1.7 × 10 <sup>-5</sup> )	0.8 (± 0.20)
50	0.6 (± 0.054)	0.06 (± 0.01)	1.2 (± 0.01)	0.46 (± 0.02)	1.9 (± 0.43)	1.7 (± 0.50)	2.4 (± 0.01)	1.2 (± 0.14)
60	2.9 (± 0.56)	1.91 (± 0.01)	4.7 (± 0.01)	2.30 (± 0.40)	3.2 (± 1.34)	1.9 (± 0.45)	5.3 (± .08)	2.7 (± 0.03)
70	18.3 (± 0.10)	8.60 (± 0.01)	17.8 (± 0.67)	5.11 (± 0.11)	13.5 (± 1.69)	5.4 (± 0.90)	28.8 (± 0.09)	5.5 (± 0.03)
80	33.2 (± 1.30)	11.54 (± 0.05)	39.2 (± 1.8 × 10 <sup>-5</sup> )	12.55 (± 0.01)	38.1 (± 7.8 × 10 <sup>-7</sup> )	8.6 (± 1.00)	23.7 (± 1.70)	11.6 (± 0.08)



**Figura 17.** Gráficas de Arrhenius para la desnaturalización en mezclas de solvente orgánico-agua al 30%: con metanol (□), etanol (O), propanol (Δ), acetonitrilo (◇). A) Enzima MtL y B) MtL-PEG<sub>5000</sub>.  $k_i$  esta en min<sup>-1</sup>.

**Tabla 18. Energías de Activación ( $E_a^i$ ) y Factores Preexponenciales (A) para la inactivación de MfL y MfL-PEG<sub>5000</sub> en mezclas de solventes <sup>a</sup>**

Solvente	MfL		PEG-MfL	
	$E_a^i$ (kJ/mol)	ln A	$E_a^i$ (kJ/mol)	ln A
Amortiguador	59.9±1.8	18.9	24.03±1.0	6.3
Metanol	33.0±4.9	51.0	38.8±5.6	59.0
Etanol	27.2±1.4	42.7	23.6±2.6	36.2
Propanol	14.6±4.6	23.6	11.7±2.7	18.6
Acetonitrilo	20.2±1.8	32.4	14.0±1.5	22.2

<sup>a</sup> Los valores fueron determinados a través de una ecuación de primer orden mostrada en la **Figura 17**. Solventes al 30% en amortiguador de fosfatos 50 mM pH6.0.

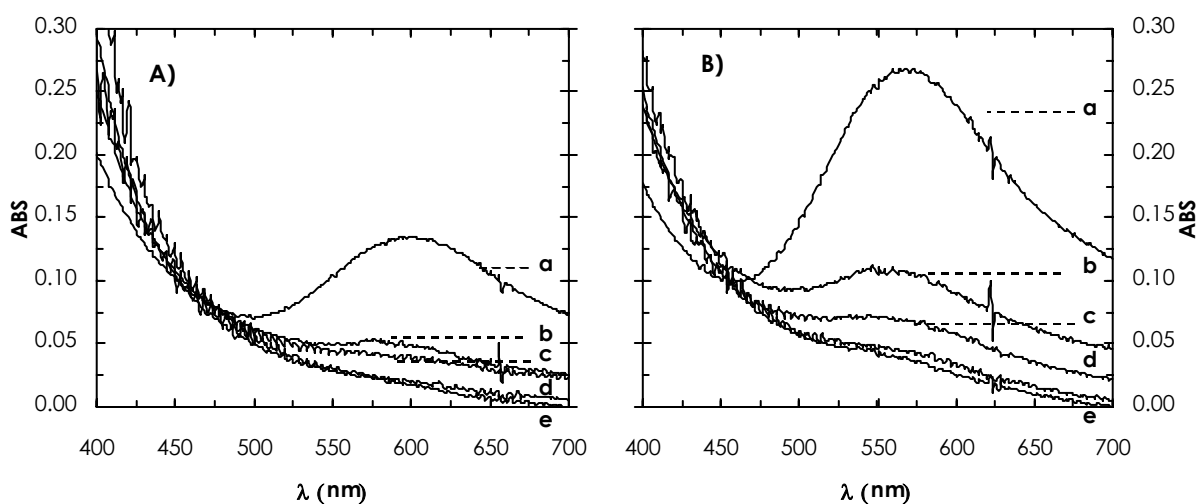
$E_a^i$  y A representan los factores calculados con la ecuación de Arrhenius.

En soluciones conteniendo el 30.0% de componente orgánico en solución, el efecto de la temperatura sobre  $k_d$ , que es la constante de desactivación, muestra claramente una tendencia dependiente de la naturaleza del cosolvente en solución. Los resultados mostrados en la **Figura 17** fueron obtenidos a través de la ecuación de Arrhenius ( $\ln k_d = \ln A - (E_a^i/R) (1/T)$ ). Los parámetros se presentan en la **Tabla 18**. Se aprecia que a temperaturas por debajo de los 70.0 °C, la eficiencia de la desnaturalización de los alcoholes lineales se incrementa conforme el incremento en la longitud de la cadena. El efecto de la desnaturalización proteica ya ha sido mostrado por el grupo de investigación de Mozhaev (1989), donde se atribuye este decremento a la disminución de la fuerza de las “interacciones hidrofóbicas” en soluciones agua-alcohol y este efecto es aún más intenso en propanol. Cuando se empleó acetonitrilo, la dependencia de la temperatura sobre  $k_d$  fue similar a la observada en presencia de propanol. En este caso en particular, es difícil relacionar el efecto del solvente con las interacciones hidrofóbicas, posiblemente entre en juego también la influencia del acetonitrilo sobre los puentes de hidrógeno e interacciones electrostáticas importantes, alterando la estabilidad de las enzimas. Con solventes de menor polaridad disminuye el factor de frecuencia (A), por lo cual se hace más lenta la inactivación. También se puede observar, que con solventes de menor polaridad disminuye la energía de inactivación, por lo cual el proceso se hace menos sensible al aumento de temperatura.

## Cambios Espectrofotométricos del Sitio Activo.

El  $\text{CuT}_1$  es llamado el cobre azul, y es característico de las cuproproteínas como la plastocianina y la lacasa. Este Cu absorbe a una longitud de 600 nm y es un sitio con conformación geométrica trigonal plana (Solomon, 1996). Se investigó el efecto de la conjugación sobre este sitio catalítico de las enzimas nativa y modificada. El acoplamiento covalente del  $\text{PEG}_{5000}$  en la enzima MtL motivó el desplazamiento de la señal de absorción máxima de 600 nm a 550 nm (**Figura 18**), reflejándose también en el cambio de color de la enzima en solución, de un intenso color azul a rojo.

Los cambios en la coloración de las proteínas en solución se han reportado en la enzima lacasa de *M. thermophila*, cuando en investigaciones efectuadas por Palmer y col. (2003), fue mutado uno de los residuos de aminoácido que están involucrado con la estabilidad del sitio  $\text{CuT}_1$ . Estos investigadores reemplazaron el residuo de leucina<sub>513</sub> por histidina, provocando un cambio en la estructura electrónica de este sitio importante e induciendo una distorsión de la conformación trigonal a tetragonal de los orbitales del Cu. La consecuencia de la mutación en el sitio catalítico fue un cambio de la coloración del azul al violeta, debida al incremento en la fuerza del ligando que unen a este sitio  $\text{CuT}_1$  con el residuo de aminoácido.



**Figura 18.** Espectro visible de las preparaciones enzimáticas de (A) MtL y (B) MtL- $\text{PEG}_{5000}$ . Los registros fueron obtenidos durante la incubación a 70 °C durante: a) 0 h, b) 1.5 h, c) 2.5 h, d) 3.5 h y e) 4.5 h.

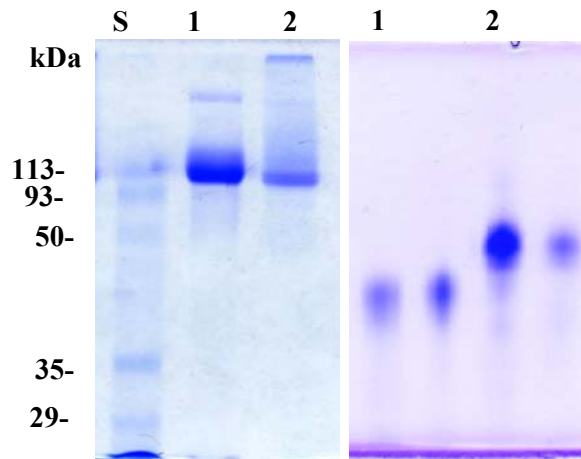
---

Esto hace suponer que el acoplamiento covalente de moléculas de PEG<sub>5000</sub> a los residuos aminoacídicos modificados tiene un efecto sobre la totalidad de la proteína, lo que probablemente incremente la rigidez y disminuya la movilidad estructural. Esto puede provocar un cambio en el microambiente del Cu lo que ocasiona que la polaridad sea diferente.

Este desplazamiento espectral se observa en la **Figura 18 (A y B: a)**, donde también se demostró el efecto de la modificación sobre la termoestabilidad de sitio catalítico. En particular se percibe una mayor pérdida de la señal espectral máxima del sitio CuT<sub>1</sub> para la enzima original incubada a 70°C, durante 4.5 h, respecto a MtL-PEG<sub>5000</sub>.

### **Efecto de la Conjugación con PEG<sub>5000</sub> sobre la Movilidad Electroforética y sobre la Estimación del Peso Molecular (PM).**

Se estudio el efecto de la movilidad de las enzimas en dos tipos geles con una concentración de poliacrilamida al 10.0%. Un gel en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y otro en condiciones nativas. No hubo efecto de la modificación con PEG<sub>5000</sub> sobre la migración de la enzima en un gel SDS-PAGE, pero sí en el gel de electroforesis en condiciones nativas, donde la enzima MtL-PEG<sub>5000</sub> tuvo una menor migración. Posiblemente el acoplamiento del PEG<sub>5000</sub> tuvo un efecto de cambio carga de la molécula que se reflejo en la movilidad de la proteína total. (**Figura 19: Carril 1 y 2**). Tocante al efecto del PEG<sub>5000</sub>, sobre el peso molecular aparente de la enzima, no se presentan cambios apreciables en la migración en el gel SDS-PAGE, ya que la migración está relacionada con el peso molecular. Por otro lado, la determinación del peso molecular de las dos preparaciones se efectuó a través de la cromatografía de filtración en gel, aunque también se obtuvo una estimación poco confiable en la preparación enzimática modificada. Garcia-Arellano y col. (2002), atribuyen estas discrepancias en la estimación del peso molecular por SDS-PAGE y cromatografía de filtración en gel, al cambio en el volumen hidrodinámico de la proteína conjugada respecto a la proteína original, lo que conduce a una gran reducción de su elución en la columna de filtración en gel. El peso molecular de MtL-PEG<sub>5000</sub> obtenido por electroforesis es de aproximadamente 113 kDa y por cromatografía de 300 kDa.



**Figura 19.** Perfiles de electroforesis SDS-PAGE (**izquierda**) y PAGE-nativo (**derecha**). Carril S: marcadores de peso molecular, carril 1: enzima **MTL** y carril 2: enzima **MTL-PEG<sub>5000</sub>** (por duplicado)

### **Efectos de la Conjugación con PEG Analizados por Dicroísmo Circular (DC)**

Los efectos de la modificación proteica sobre la estructura secundaria y global se pueden estudiar por el método de dicroísmo circular (DC). A través de la desviación de la luz polarizada, debida a las moléculas quirales como son los residuos de aminoácidos en las proteínas, se pueden medir estos cambios en la estructura secundaria y global, como una medida del parámetro de elipticidad ( $\theta$ ) respecto a la longitud de onda. Estos experimentos se realizaron en el intervalo de longitud de onda entre 180 nm a 250 nm, para efectuar una comparación en la estructura secundaria de la enzima original y la enzima modificada. El estilo de las curvas obtenidas para la proteína original y la pegylada en amortiguador de fosfatos, se presenta en la **Figura 20 D y G** respectivamente, declarándose similares a la señal de elipticidad en dicroísmo circular para una proteína que posee un plegamiento rico en conformación hoja  $\beta$  (Fasman D. G., 1996). Esto indican que la modificación no provoco cambios significativos en la estructura secundaria de las preparaciones estudiadas.

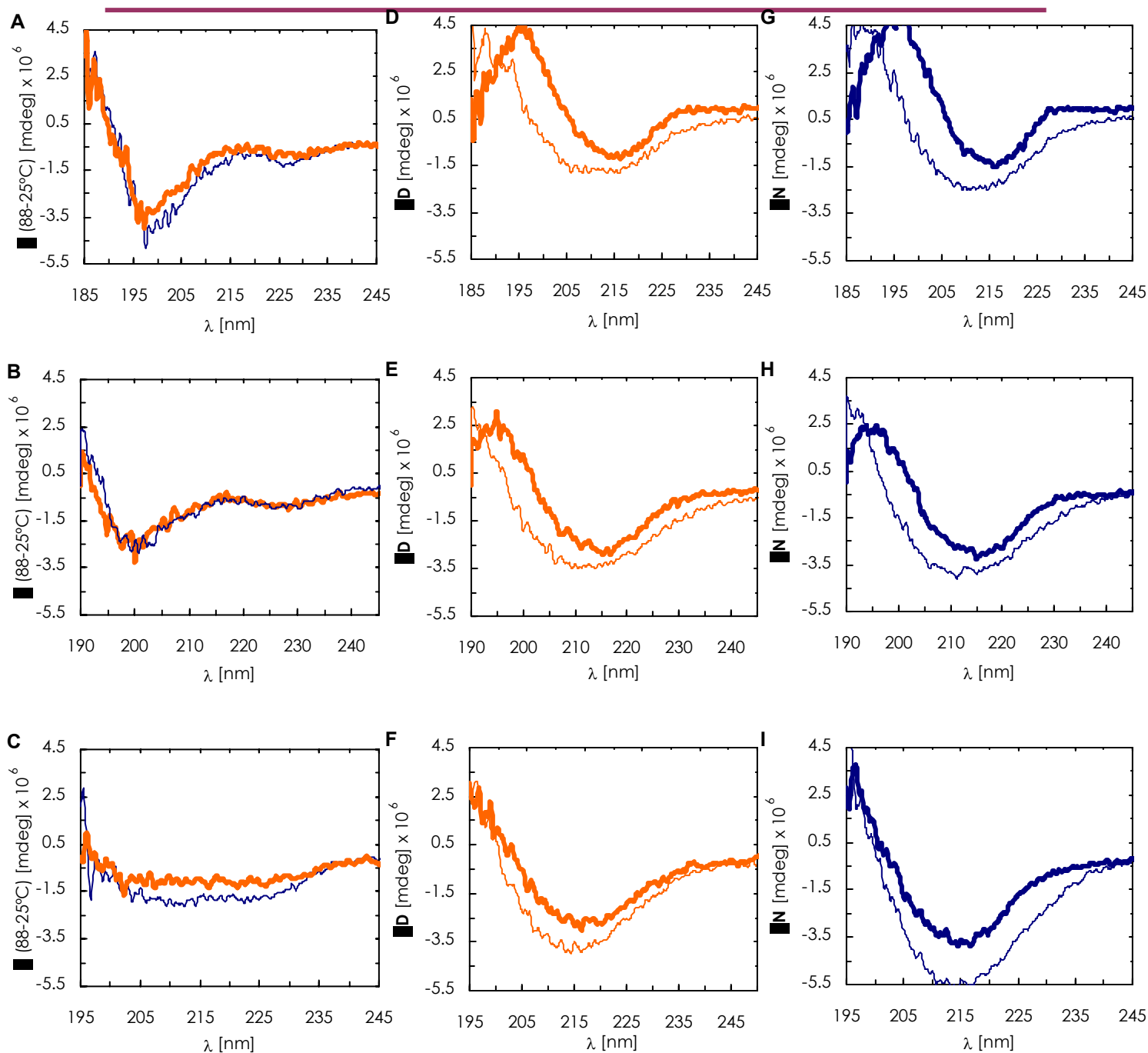
Se realizaron otros análisis por DC, en el intervalo de longitud de onda de 195-250 nm, en ausencia y presencia de 10% de etanol y 30% de propanol (**Figura 20: A-I**). Los ensayos se efectuaron registrando la elipticidad a temperatura ambiente y la elipticidad después de una transición térmica a 88°C. Los resultados obtenidos en los solventes estudiados mostraron que en forma general, existen pocas diferencias en la estabilidad en las dos preparaciones. Con amortiguador se presenta un mayor



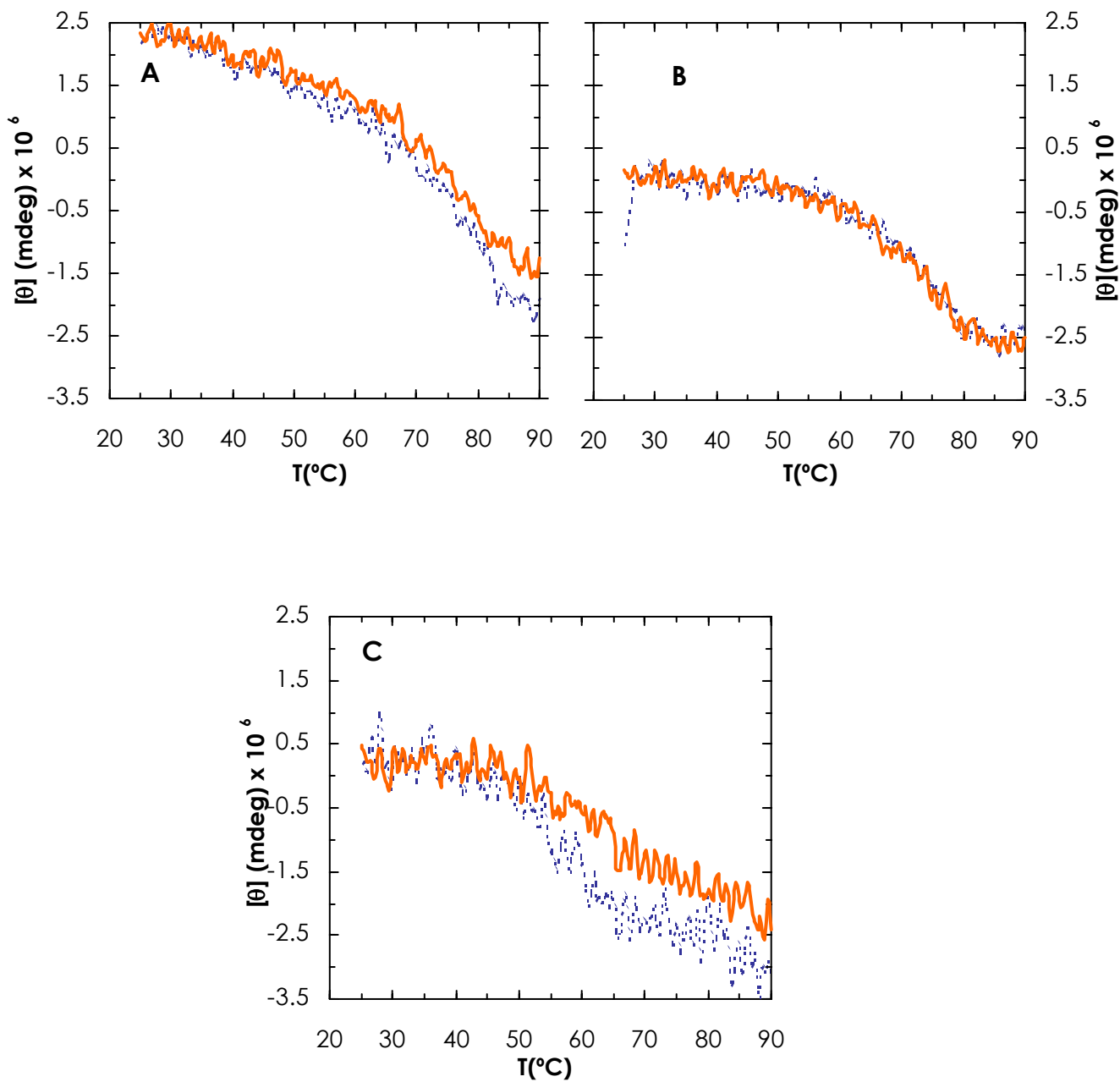
---

desplegamiento, porque las diferencias de espectros muestran una señal mas intensa; inducidas por el cambio térmico aplicado a las dos enzimas (**Figura 20: A**). Cuando se utilizó etanol y propanol para estimar las diferencias espectrales (**Figura 20 B y C**), se observa que no existe un efecto significativo sobre la estructura secundaria. En propanol al 30 % como cosoluto, la enzima modificada (**Figura 20 F**) y la enzima original (**Figura 20: I**), muestran poca pérdida de la estructura secundaria, pero en la enzima MtL-PEG<sub>5000</sub> es menos marcada porque se obtuvo una señal menos intensa a una  $\lambda \sim 215$  nm. Mientras que en amortiguador (**D y G**) y en etanol al 10% (**E y H**) la pérdida de estructura secundaria es mayor.

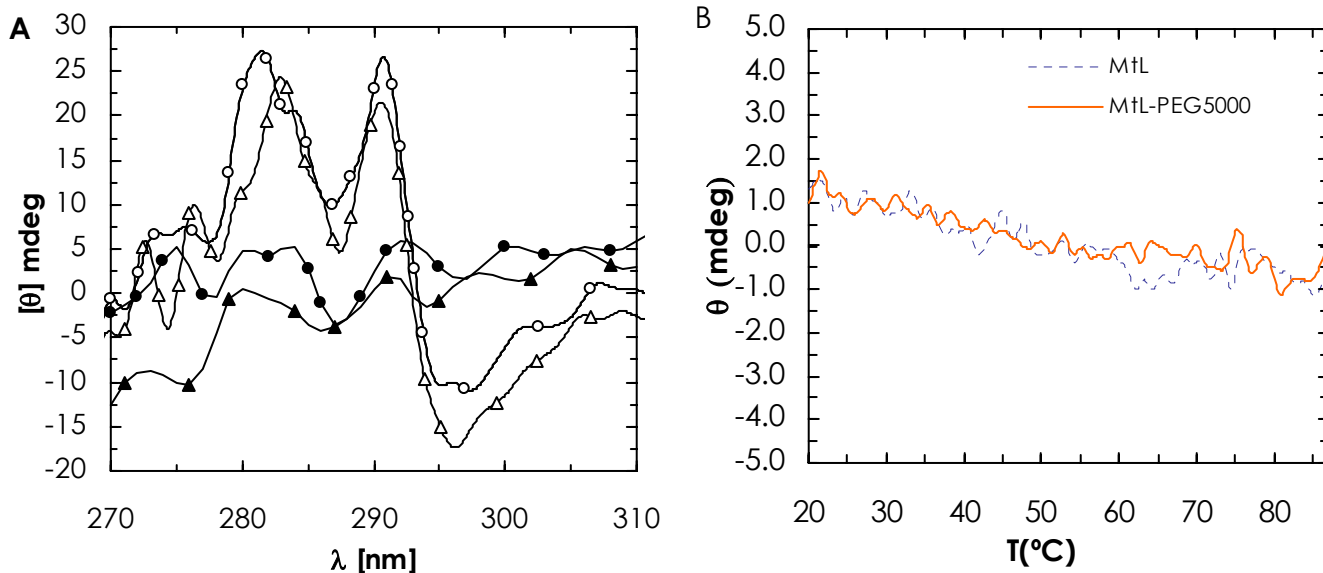
Por otro lado, los cambios en la estructura secundaria son notorios a una longitud de 202 nm, por ello se efectuaron los análisis de las transiciones térmicas a través del DC a esta longitud de onda. Las transiciones térmicas que se efectuaron en las dos proteínas se practicaron desde un intervalo de temperatura de 20 a 90 °C (**Figura 21: A, B y C**). Los comportamientos registrados muestran que el desplegamiento en las dos proteínas son similares en presencia de amortiguador y etanol al 10.0% (**Figura 21 A y B**), pero se observó un mayor efecto de la temperatura sobre el desplegamiento para la enzima nativa en propanol al 30.0% (**Figura 21: C**). Este resultado es aliciente, para comprobar que si existe un pequeño cambio en las características hidrofóbicas y de termomotolerancia en la enzima modificada. Otros análisis fueron efectuados a una longitud de onda de 250 a 300 nm, que permite analizar el desplegamiento térmico por el registro de la elipticidad predominante de los residuos de los aminoácidos aromáticos, residuos que contienen cadenas laterales que influyen considerablemente la señal de elipticidad y que permiten inferir los efectos sobre la estructura terciaria en las proteínas. En la **Figura 22: A** se presentan los registros DC de las dos preparaciones. Se destaca un ligero corrimiento de la banda de aproximadamente 283 nm, hacia el UV lejano en la proteína derivatizada a temperatura ambiente. Los espectros desaparecen en los registros de DC a temperatura de 80 °C (**Figura 22: A**). Los resultados indican que la modificación no induce cambios significativos en la estructura terciaria de la proteína. También se efectuaron transiciones térmicas a una longitud de 290 nm en las dos preparaciones; el registro del DC cambió gradualmente desde una temperatura de 20 °C hasta 90°C (**Figura 22: B**).



**Figura 20.** Diferencia de espectros de DC inducida por un cambio térmico en la enzima **nativa** (—) y **modificada** (—) (88°C-20°C) en **A**) fosfatos, **B**) etanol 10% y **C**) Propanol 30%. Espectros de la enzima **Mtl-PEG<sub>5000</sub>** (**D**, **E**, **F**) y **Mtl** (**G**, **H**, **I**) en amortiguador, etanol 10 % y propanol 30 % (respectivamente), a 20 °C (—) y 88 °C (—); determinaciones efectuadas desde un intervalo de longitud de onda de 185-250 nm.



**Figura 21.** Transiciones térmicas en A) Fosfatos a pH 6.0, 50.0 mM, B) etanol 10.0 % y C) propanol 30.0 %, para la enzima nativa (----) y Mtl-PEG<sub>5000</sub> (—) a  $\lambda = 202$  nm.



**Figura 22.** A) Espectros DC de la enzima nativa (triángulos) y Mtl-PEG<sub>5000</sub> (círculos) en amortiguador a 20 °C (marcas en blanco) y 88 °C (marcas rellenas) en un intervalo de 245-310 nm. B) Transiciones de DC de la enzima nativa (---) y Mtl-PEG<sub>5000</sub> (—) a  $\lambda = 290$  nm.

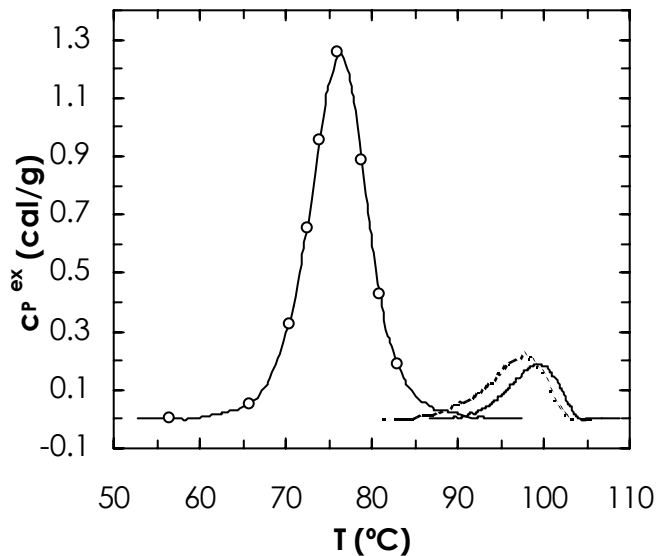
### Cambios de Entalpía entre Mtl y Mtl-PEG<sub>5000</sub> por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).

Los análisis comparativos de los gráficos generados por calorimetría diferencial de barrido, de la enzima nativa y Mtl-PEG<sub>5000</sub>, nos proporcionan mayor información respecto a la adquisición de nuevas propiedades como son la estabilidad térmica. El método DSC nos permitió investigar si la entalpía calorimétrica, representado por el área bajo la curva (Sturtevant, 1987), fue diferente con la unión PEG<sub>5000</sub>. El desplegamiento en los termogramas obtenidos por DSC (**Figura 23**), demostró que  $\Delta h_{CAL}$  (por gramo de proteína) es 6 veces más pequeño en las enzimas nativa y modificada, respecto a la lisozima; esta última como proteína de comparación. El parámetro del proceso endotérmico de desplegamiento ( $\Delta h_{CAL}$ ) para todas las preparaciones ensayadas fue calculado por medio del programa computacional Origin. Los resultados comparativos de las proteínas estudiadas se presentan en la **Tabla 19**.

**Tabla 19. Parámetros de desplegamiento termodinámico**

Proteína	$T_m$ (°C)	$\Delta H_{cal}$ (cal/g)
Lisozima	76.15	10.8
MtL	97.6	1.8
MtL-PEG <sub>5000</sub>	99.3	1.3

Comparativamente, el  $\Delta h_{CAL}$  en las dos enzimas es semejante, aunque la temperatura de desplegamiento endotérmico máxima ( $T_m$ ) para la enzima MtL-PEG<sub>5000</sub>, se encuentra 3 °C por encima de la proteína nativa (**Figura 23**). Es de resaltar que el proceso de desplegamiento por temperatura fue irreversible, con pérdida de la actividad total en la enzima nativa, aunque la modificada solo mantuvo un 5% de su actividad original.



**Figura 23.** Termogramas de DSC de las proteínas lisozima [3 mg/mL] en un amortiguador de glicina-HCl 0.1M, a pH 3.0 (O); enzima nativa (- - -) y MtL-PEG<sub>5000</sub> (----) [3.5 mg/mL] en un amortiguador de citratos 5 mM, a pH 5.0. El  $C_{p^{exp}}$  fue obtenido por referencia con el amortiguador.

## Análisis de Homología de las Estructuras de las Enzimas Lacasa

La homología entre proteínas es importante si se requiere comparar ciertos residuos de aminoácidos. Estas comparaciones se muestran en la **Tabla 13** y en las **Tablas 20 y 21**.

La enzima lacasa de *M. thermophila* es una proteína globular de 620 aminoácidos (Berka y Col., 1997), que estructuralmente tiene 2 dominios con características intrínsecas de termoestabilidad; sus homólogos fúngicos tienen capacidades considerables de oxidación catalíticas para compuestos fenólicos.

**Tabla 20. Secuencias de fragmentos N-terminal comparativas en las enzimas lacasas de diferentes hongos**

Hongo	Secuencia
<i>P. cinnabarinus</i>	A I G P V A D L T L T N A A V S P D G F S
<i>T. versicolor</i> (I)	A I G P V A S L V V A N A P V S P D G F L
(II)	G I G P V A D L T I T D A A V S P D G F S
(III)	G I G P V A D L T I T D A E V S P D G L S
Basidiomicete PM1	S I G P V A D L T I S N G A V S P
<i>C. hirsutus</i>	A I G P T A D L T I S N A E V S P D G F A
<i>C. suvermispora</i>	A I G P V T D L E I T D A F V S P D G P
<i>P. radiata</i>	S I G P V T D F H I V N A A V S P
<i>A. bisporus</i>	D T - K T F N F D V N T R L A -
<i>N. crassa</i>	G G G G G C N S P T N R Q C W S P
<i>C. neoformans</i>	X K T D E S P E A V S D N Y M P K
<i>Pleurotus eryngii</i> (I)	A X K K L - D F H I I N N
(II)	A T K K L - D F H I I N N
<i>Pleurotus ostreatus</i> (I)	A I G P T G D M Y I V N E
(II)	A I G P T G N M Y I V N E

(Eggert y col., 1996; Giardina y col., 1999)

**Tabla 21. Secuencias amino en el sitio catalítico de la enzima lacasa en diferentes hongos**

Hongos	Alineamiento de Secuencias					E° (V)	
	CuT3	CuT1	CuT3	CuT1	CuT1		
<i>Scytalidium thermophilum</i>	506H	C	H	I A W	H V S G G	L <sup>517</sup>	0.51
<i>Myceliophthora thermophila</i>	502H	C	H	I A W	H V S G G	L <sup>513</sup>	0.47
<i>Rhizoctonia solani</i>	459H	C	H	I D W	H L E A G	L <sup>470</sup>	0.71
<i>Trametes villosa</i>	452H	C	H	I D F	H L E A G	F <sup>463</sup>	0.78
<i>Polyporus versicolor</i>	452H	C	H	I D F	H L E A G	F <sup>462</sup>	0.79
<i>Ascorbato oxidasa (Zucchini)</i>	506H	C	H	I E P	H L H M G	M <sup>517</sup>	0.34

(Xu y col., 1998)

Bertrand y col. (2002), investigaron el grado de similitud en las enzimas lacasas de los hongos *Coprinus cinereus*, *Rigidoporus lignosus* y *Trametes versicolor* (Figura 2) y encontraron, por superposición espacial de las estructuras enzimáticas, una gran similitud en la estructura terciaria.

Por otro lado, las secuencias de fragmentos N-terminal se encuentran bastante conservados. Esto se pueden observar en la Tabla 20, lo que indica la semejanza y cierto grado de identidad entre las lacasa de diferentes especies de hongos.

Es necesario precisar también la similitud de los aminoácidos que interaccionan con dos de los tres cobres que conforman al sitio activo de las lacasas (Tabla 21). Los aminoácidos alifáticos e hidrofóbicos dominan la estructura en la cavidad del sitio activo y se puede inferir que de sus interacciones con los CuT<sub>1</sub> y CuT<sub>3</sub> depende en gran medida el potencial redox de las enzimas provenientes de diferentes fuentes fúngicas. Una metaloproteína similar a las lacasas, que también posee los Cu en el sitio activo, perteneciente a la familia de las oxidoreductasas, es la ascorbato oxidasa. Es de notarse el residuo de metionina 517 en el CuT<sub>1</sub> (Tabla 21), perteneciente a esta enzima, ya que posiblemente la interacción de este residuo con el cobre, disminuye el potencial redox.

#### Modelamiento de la Estructura de la Enzima Lacasa de *M. thermophila* por Homología

Se investigó, a través de las herramientas que nos proporciona la bioinformática, la homología de la enzima MtL con otras lacasas. La Tabla 22 muestra una comparación del porcentaje de alineamientos idénticos de residuos de aminoácidos de la enzima lacasa MtL con otras proteínas.

La homología más fuerte con la lacasa MtL, la presentó la enzima lacasa del hongo *Melanocarpus albomices*, cristalizada por el grupo de investigación de Hakulinen (2002). Esta enzima es 85% idéntica

con la enzima trabajada en esta investigación, lo cual es de ayuda para el modelamiento tridimensional por homología. Aunado a esto, recientemente se han determinado las estructuras cristalinas de otras lacasas fúngicas como *Coprinus cinereus* en su forma suprimida del CuT<sub>2</sub> (CCL) (Ducros y col., 1998), *Trametes versicolor* (TvL) (Piontek y col., 2002), *Picnoporus cinnabarinus* (PcL) (Antorini y col., 2002) y recientemente la enzima lacasa codificada como 1V10 que pertenece al hongo *Rigidoporus lignosus* (Garavaglia y col., 2004), proteínas reportadas con una topología de tipo hoja β, que está enteramente relacionada con otras cuproproteínas como la azurina o plastocianina.

**Tabla 22. Alineamientos\* de proteínas homologas con la enzima lacasa Mtl**

Proteína /origen	Alineamientos			
	Positivos	%	Idénticos	%
<b>Lacasa de <i>Melanocarpus albomyces</i></b>	<b>475/559</b>	<b>85</b>	<b>419/559</b>	<b>75</b>
Lacasa de <i>Coprinus cinereus</i> (CuT <sub>2</sub> -depleted)	237/512	46	169/512	33
Lacasa de <i>Trametes versicolor</i> (complejo xilidina)	242/514	47	176/514	34
Lacasa de <i>Trametes versicolor</i> (Oxidada)	228/501	45	154/501	30
Ascorbato oxidasa (Forma azida)	120/262	45	72/262	27
Mutante M44L oxidasa CueO	188/493	38	112/493	22
Oxidasa de <i>E. coli</i>	187/493	37	112/493	22
Cota de <i>Bacillus subtilis</i>	157/427	36	108/427	25
Nitrito reductasa D92n de <i>Alcaligenes xylooxidans</i>	41/85	48	27/85	31
Ceruloplasmina Humana	31/87	35	24/87	27
Hemaglutinina neuraminidasa virus <i>influenza</i>	43/94	45	21/94	22
C terminal Nitrito reductasa de <i>Achromobacter</i>	18/29	62	11/29	37
Cadena A Nitrito reductasa de <i>Alcaligenes faecalis</i>	18/30	60	11/30	36
Ferredoxina	24/52	46	16/52	30

\*Los alineamientos son resultados de la búsqueda por base de datos Blast-FAQs 2.2.9 (Altschul y col., 1997)

Se encontraron un total de 6 residuos de histidina coordinados con los dos CuT<sub>3</sub> en forma simétrica que fueron visualizados en la estructura de Mtl por computadora. Ello concuerda con otras estructuras secundarias del sitio catalítico de los homólogos fúngicos, muy posiblemente el mecanismo de oxidación y reoxidación de sustratos esté relacionado con el propuesto en las investigaciones por Solomon en 1996.

Debido a que se conocen los aminoácidos que conforman a la enzima lacasa de *M. thermophila* en esta investigación y a que existe alto porcentaje de similitud con la lacasa de *M. albomyces*, se efectuó un

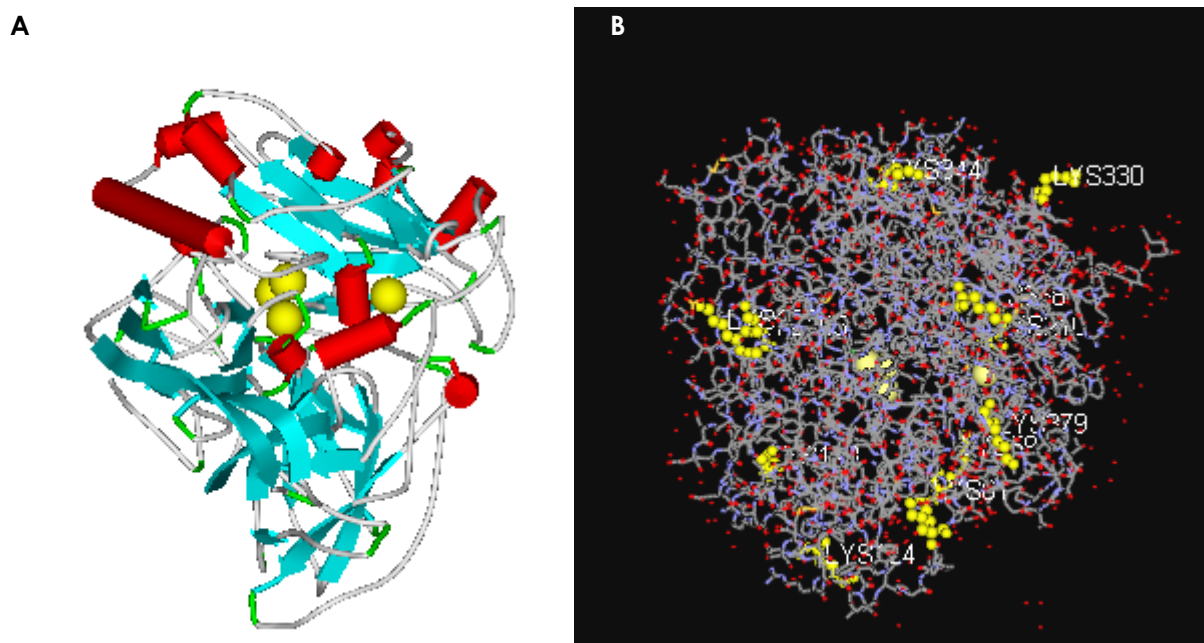


---

modelado tridimensional por homología a través del programa Swiss Model (<http://www.expasy.org/sprot>).

Los resultados del modelado de la estructura tridimensional de la enzima lacasa MtL (**Figura 24**), son similares a la conformación mayormente de hoja  $\beta$  de otras enzimas lacasas, como la enzima que producen los hongos *Rigidoporus lignosus*, *Coprinus cinereus* y *Trametes versicolor* (**Figura 2**), con dos dominios estructurales.

Se analizaron los residuos de aminoácidos, que componen al sitio activo de la estructura obtenida por homología, a través del programa Viewer Lite 5.0, proporcionado por Accelrys (<http://www.accelrys.com>). Los residuos aminoácidos que interaccionan con los sitios Cu T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> y T<sub>3</sub> son similares a los que se presentan en la **Tabla 21**.



**Figura 24.** Representación tridimensional de la enzima lacasa MtL. A) Se representa esquemáticamente las regiones de estructura secundaria: El sitio catalítico de Cu, se representa por esferas color verde, estructuras  $\alpha$ -helice representados por cilindros color rojo y Hojas  $\beta$  de color azul. B) Representación tridimensional de los residuos de lisina en la proteína (amarillo).

---

# **CAPITULO VI**

# **CONCLUSIONES**

---

Los resultados obtenidos y discutidos en esta tesis muestran que las propiedades originales de la enzima lacasa de *Myceliophthora thermophila* son alteradas por el acoplamiento covalente del PEG<sub>5000</sub>, aumentando la hidrofobicidad de la proteína y mejorando su estabilidad frente al calentamiento, debido a que la:

- a) La eficiencia catalítica relativa de oxidación de los sustratos clásicos de esta enzima, se incrementó en razón de 2 veces.
- b) En presencia de alcoholes como el metanol, etanol y propanol, se observa un efecto estabilizante del PEG sobre la enzima. La enzima conjugada fue más estable que la enzima nativa, cuando se ensayó con una solución amortiguadora y también resistió mejor el efecto desnaturizante de los alcoholes de cadena corta (metanol, etanol y propanol). Esta estabilización quizás este relacionada con el carácter anfifílico del PEG<sub>5000</sub> y por el aumento entre las interacciones de su cadena hidrocarbonada, con las pertenecientes al alcohol de cadena más larga: como es el propanol.
- c) Aparentemente la carga total de la enzima se ve afectada, probablemente por el efecto del acoplamiento del PEG<sub>5000</sub>.
- d) El PEG<sub>5000</sub> provoca un desplazamiento de la señal espectral máxima hacia una longitud de onda menor del CuT<sub>1</sub>, posiblemente por un inherente aumento de la rigidez y disminución de la movilidad en la estructura terciaria de la proteína. La derivatización parece que no tiene efectos sobre la estructura secundaria de tipo hoja  $\beta$  de la proteína lacasa.
- e) El desplegamiento térmico de la enzima modificada es menor, lo que manifiesta un aumento considerable de la estabilidad de la enzima lacasa, en propanol al 30%
- f) El éxito de los nucleófilos expuestos (lisina o cistena) aparentemente se debe a la eficiencia de la reacción de modificación, ya que solo se obtuvo aproximadamente el 54 % del acoplamiento covalente de las moléculas de PEG<sub>5000</sub> a los grupos  $\epsilon$ -amino de los residuos de la lisina, que aparentemente porque no todos los residuos se encuentran expuestos al solvente. Los resultados pueden ser explicados a través de la estabilización entrópica, porque el PEG causa una movilidad restringida de las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos, lo que provoca un sitio activo más estable.

---

Quizá la reacción de modificación presentada en esta investigación, conduzca un un modesto incremento en la termoestabilidad y una disminución en la desnaturalización causada por solventes orgánicos, pero este efecto podría ser importante para aplicaciones industriales con la enzima lacasa. Puede ser interesante probar tipos de PEG de peso molecular mayor, e inclusive otros agentes acoplantes para incrementar la eficiencia en la conjugación y obtener con ello una mayor estabilidad en solventes. Esto modificará la constante dieléctrica ( $\epsilon$ ) de la enzima conjugada, por la interacción de las cadenas laterales de PEG con solventes con una hidrofobicidad mayor. Las expectativas podrían extenderse en el intento de exponer un número mayor de lisinas al solvente a través de la mutagenesis dirigida de genes expresados y clonados en esta fuente fúngica importante.

Esta investigación sugiere que se empleen otros PEG de cadena variable, con el fin verificar el efecto sobre el número de lisinas modificadas, así como utilizar otras enzimas lacasas de fuentes fúngicas diversas, para comprobar el efecto termoprotector del PEG. Además la expectativa de proponer un modelo tridimensional del conjugado simulando los efectos de esta molécula sobre la proteína. El proceso de derivatización como tal es un proceso más que probado por diversos grupos de investigación para estabilizar enzimas y los resultados han sido variables. Debido a ello, ha aumentado la búsqueda de enzimas con propiedades atractivas para las aplicaciones de este tipo de proceso. La aportación de resultados de esta investigación acerca de la modificación de una enzima termofílica, permitirá avanzar sobre el empleo de la catálisis de oxidación en ambientes no acuosos y con solventes más apolares como las gasolinas.

---

# BIBLIOGRAFÍA

- 
1. Abuchowski A. (1976) Effect of covalent attachment of polyethylene glycol on immunogenicity and circulating life of bovine liver catalase. *Journal of Biological Chemistry*. **252**: 3582-3586.
  2. Abuchowski A. (1977) Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylene glycol. *Journal of Biological Chemistry*. **252**: 3578-3581.
  3. Agematu H., Kominato K., Shibamoto N., Yoshioka T., Nishida H., Okamoto R., Shin T. y Murao S. (1993) Transformation of 7-(4-hydroxyphenylacetamido) cephalosporanic acid into a new cephalosporin antibiotic, 7-[1-oxaspiro (2.5) octa-6-oxo-4,7- diene-2-carboxamido] cephalosporanic acid by laccase. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. **57**: 1387-1388.
  4. Agostinelli E., Cervoni L., Giartosio A. y Morpurgo L. (1995) Stability of japanese-lacquer-tree (*Rhus vernicifera*) laccase to thermal and chemical denaturation: comparison with ascorbate oxidase. *Journal of Biochemistry*. **306**: 697-702.
  5. Altschul S. F., Madden T. L., Schäffer A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller W. y Lipman D. J. (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402, Blast **2.2.9**, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez>.
  6. Andreasson L. E. y Reinhammar B. (1976) Kinetics studies of *Rhus vernicifera* laccase. Role of the metal centres in electron transfer. *Biochimica et Biophysica Acta*. **445**: 579-297.
  7. Andreasson L. E., Bräden R. y Reinhammar B. (1976) Kinetic studies of *Rhus vernicifera* laccase: Evidence for multi-electron transfer and an oxygen intermediate in the reoxidation reaction. *Biochimica et Biophysica Acta*. **438**: 370-379.
  8. Andreasson L. E. y Reinhammar B. (1979) The mechanism of electron transfer in laccase-catalysed reaction. *Biochimica et Biophysica Acta*. **568**: 145-156.
  9. Antorini M., Herpoel-Gimbert I., Choinowski T., Sigoillot C., Aster M., Winterhalter K. y Piontek K. (2002) Purification, crystallisation and X-ray diffraction study of fully functional laccases from two ligninolytic fungi. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1594**: 109-114.
  10. Apinis A. E. (1963) Occurrence of thermophilous microfungi in certain alluvial soil near Nottingham. *Nova Hedwigia*. **5**: 57-78.
  11. Ashihara Y., Kono T., Yamazaki S. y Inada Y. (1978) Modification of *E. coli* L-asparaginase with poly (ethyleneglycol): Disappearance of binding ability to anti-asparaginase serum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **83**: 385-391.

- 
12. Banerjee U. C. and Vohra R. M. (1991) Production of laccase by *Curvularia sp.* *Folia Microbiol.* **36**: 343-346.
  13. Bauer C. G., Kuehn A., Gajovic N., Skorobogatko O., Holt P. J., Bruce N. C., Makower A., Lowe C. R. y Scheller F. W. (1999) New enzyme sensor form morphine and codeine based on morphine dehydrogenase and laccase. *Journal of Analytical Chemistry.* **364**: 179-183.
  14. Beauchap C. (1983) A new procedure for synthesis of polyethylene glycol-protein: adducts, effects on function, receptor recognition and clearance of super oxide dismutase, lactoferrin y  $\alpha$ -macroglobulin. *Analytical Biochemistry.* **131**: 25-31.
  15. Beldarraín A. (2001) Aplicaciones de la calorimetría diferencial de barrido al estudio de la estabilidad de las proteínas. *Biotecnología Aplicada.* **18**: 10-16.
  16. Bell G., Janssen A. E. M. y Halling P. J. (1997) Water activity fails to predict critical hydration level for enzymes activity in polar organic solvents: Interconversion of water concentrations and activities. *Enzyme and Microbial Technology.* **20**: 471-477.
  17. Berka R. M., Schneider P., Golightly E. J., Brown S. H., Madden M., Brown K. M., Halkier T., Mondorf K. y Xu F. (1997) Characterization of the gene encoding an extracellular laccase of *Myceliophthora thermophila* and analysis of the recombinant enzyme expressed in *Aspergillus oryzae*. *Applied and Environmental Microbiology.* **63** (8): 3151-3157.
  18. Bertrand G. (1985) Sur la laccase et sur le pouvoiroxidat de cette diastase. *CR Acad. Sci. Paris.* **120**: 266-269.
  19. Bertrand T., Jolival C., Briozzo P., Caminade E., Joly N., Madzak C. y Mougín C. (2002) Crystal structure of a four-copper laccase complexed with an arylamine: insights into substrate recognition and correlation with kinetics. *Biochemistry.* **41**: 7325-7333.
  20. Bezabel L., Hadar Y. y Cerniglia E. C. (1996) Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology.* **62** (1): 292-295.
  21. Bourbonnais R. y Paice M. G. (1990) Oxidation of non-phenolic substrates: An explained role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS letters.* **267** (1): 99-102.
  22. Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry.* **72**: 248-254.

- 
23. Brewerton L. J., Fung E. y Snyder F. F. (2003) Polyethylene glycol-conjugated adenosine phosphorylase: Development of alternative enzyme therapy for adenosine deaminase deficiency. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1637** (2): 171-177.
  24. Bull H. B. (1944) Adsorption of water vapor by proteins. *Journal of the American Chemical Society*. **66**: 1499-1507.
  25. Burton S. G. (2003) Oxidizing enzymes as biocatalysts. *Trends in Biotechnology*. **21** (12): 543-548.
  26. Cantarela G., D' Acunzo F. y Galli C. (2002) Determination of laccase activity in mixed solvents: Comparison between two chromogens in a spectrophotometric assay. *Biotechnology and Bioengineering*. **82**: 295-298.
  27. Chefetz B., Chen Y. y Hadar Y. (1998) Purification and characterization of laccase from *Chaetomium thermophilum* and its role in humification. *Applied and Environmental Microbiology*. **64**: 3175-3179.
  28. Chung-Ja C., Charlton L. J., Kuzminski K., Lang G. M. y Schon A. H. (1987) Synthesis, isolation, and characterization of conjugates of ovalbumin with monomethoxypolyethylene glycol using cyanuric chloride as coupling agent. *Analytical Biochemistry*. **165**: 114-127.
  29. Clutterbuck A. J. (1972) Absence of laccase from yellow spored mutants of *Aspergillus nidulans*. *Journal General Microbiology*. **70**: 423-435.
  30. Coll P. M., Perez P., Villar E. y Shnyrov V. L. (1994) Domain structure of laccase I from the lignin-degrading basidiomycete PM1 revealed by differential scanning microcalorimetry. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **34**: 1091-1098.
  31. Dai L. y Klivanov A. M. (1999) Striking activation of oxidative enzymes suspended in non aqueous media. *Proc. Natl. Acad Sci.* **96**: 9475-9478.
  32. Dhugga K. S. y Ray M. P. (1991) Isoelectric focusing of plant plasma membrane proteins. *Plant Physiology*. **95**: 1302-1305.
  33. Di Nardo C., Cinquegrana A., Papa S., Fuggi A. and Fioretto A. (2004) Laccase and peroxidase isoenzymes during leaf litter decomposition of *Quercus' lex* in a Mediterranean. *Enzymes in the Enviroment: Activity, Ecology and Applications*. **36** (10): 1539-1544.
  34. Ducros V., Brzozowski A. M., Wilson K. S., Brown S. H., Østergaard P. y Schneider P. (1998) Crystal structure of the type 2-Cu depleted laccase from *Coprinus cinereus* at 2.2Å resolution. *Nat. Struct. Biol.* **5**: 310-316.



- 
35. Durán N., Rosa M. A., D'Annibale A. y Gianfreda L. (2002) Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different's supports: A review. *Enzyme Microbiology and Technology*. **31**: 907-931.
  36. D' Annibale A., Stazi S. R. Vinciguerra V., Sermanni G. G. (2000) Oxirane-immobilized *Lentinula edodes* laccase: Stability and phenolics removal efficiency in olive mill waste water . *Journal of Biotechnology*. **77**: 265-273.
  37. D'Souza T. M., Merritt C. S. y Reddy A. C. (1999) Lignin-Modifying enzymes of the white rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*. *Applied and Environmental Microbiology*. **65** (12): 5307-5313.
  38. Eggert C., Temp U. y Eriksson K. E. (1996) The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: Purification and characterization of the laccase. *Applied and Environmental Microbiology*. **62** (4): 1151-1158.
  39. Fasman D. G. (1996) Circular dichroism and the conformational analysis of bio molecules. Plenum New York. pp: 125-350.
  40. Fennema O. R. (1996) Food Chemistry, 3ª Edition, Marcel Dekker Inc., NY USA.
  41. Fessenden G. (1960) The determination of cuprous ion in copper proteins. *Arch. Biochem Biophys*. **35**: 7608-7614.
  42. Fraga E. y Loppnow G. R. (1998) Proteins as solvent: blue copper proteins as a molecular ruler for solvent effects on resonance raman intensities. *J. Phys. Chem B*. **102**: 7659-7665.
  43. Fukushima Y. y Kirk T. K. (1995) Laccase component of the *Ceriporiopsis subvermispora* lignin-degrading system. *Applied and Environmental Microbiology*. **61** (3): 872-876.
  44. Gaertner H. F. y Puigserver A. J. (1988) Peptide synthesis catalysed by polyethylene glycol-modified chymotrypsin in organic solvent. *Proteins*. **3**: 130-137.
  45. Gaertner H. F. y Puigserver A. J. (1992) Increased activity and stability of poly (ethylene glycol)- modified trypsin. *Enzyme Microbiology and Technology*. **14**: 150-155.
  46. Garavaglia S., Cambria M. T., Miglio M., Ragusa S., Lacobazzi V., Palmieri F., D' Ambrosio C., Scaloni A. y Rizzi M. (2004) The structure of *Rigidoporus lignosus* laccase containing a full complement of copper ions, reveals an asymmetrical arrangement for the T<sub>3</sub> copper pair. *Journal of Molecular Biology*. **342**: 1519-1531.
  47. García D., Ortega F. y Marty J. L. (1998) Kinetics of thermal inactivation of horseradish peroxidase: Stabilizing effects of methoxy poly (ethylene glycol). *Biotechnol. Appl. Biochem*. **27**: 49-54.

- 
48. García-Arellano H., Valderrama B., Saab-Rincón G., y Vazquez-Duhalt R. (2002) High temperature biocatalysis by chemically modified cytochrome *c*. *Bioconjugate Chemistry*. **13**: 1336-1344.
  49. Gardiol A. E., Hernández R. J. y Harte B. R. (1998) Device detecting oxygen with oxidase. United States Patent 5,804,401.
  50. Giardina P., Palmieri G., Scaloni A., Fontanella B., Faraco V., Cenamo G. y Sannia G. (1999) Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Biochemical Journal*. **34**: 655-663.
  51. Greenwald R. B., Pendri A., Martínez A., Gilbert C. y Bradley P. (1996) PEG Thiazolidine-thione, a novel reagent for facile protein modification: Conjugation of Bovine Haemoglobin. *Bioconjugate Chemistry*. **7**: 638-641.
  52. Gutfreund H. (1998) Kinetics for the life sciences: Receptors, transmitters and catalysts. Ed. Cambridge, Cambridge University Press, New York.
  53. Habeeb A. (1966) Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzenesulfonic acid. *Analytical Biochemistry*. **14**: 328-336.
  54. Hakulinen N., Kiiskinen L. L., Kruus K., Saloheimo M., Paananen A., Koivula A. y Rouvinen J. (2002) Crystal structure of a laccase from *Melanocarpus albomyces* with an intact trinuclear copper site. *Nat. Struct. Biol.* **9**: 601-605.
  55. Halling P. J. (1990) High-affinity binding of water by proteins is similar in air and in organic solvents. *Biochim. Biophys. Acta*. **1040**: 225-228.
  56. Harding S. E. y Chowdhry B. Z. (2001) Protein-Ligand Interactions: hydrodynamics and calorimetry. Cap. XI., Oxford, University Press.
  57. Heinzkill M., Bech L., Halkier T., Schneider P. y Anke T. (1998) Characterization of laccase and peroxidases from wood-rotting fungi (family *Coprinaceae*). *Applied and Environmental Microbiology*. **64** (5): 1601-1606.
  58. Hermann T. E., Kurtz M. B. y Champe S. P. (1983) Laccase localized in hülle cells an cleistothecial primordial of *Aspergillus nidulus*. *Journal of Bacteriology*. **154**: 955-964.
  59. Hernáiz M. J., Sánchez-Montero J. M. y Sinisterra J. V. (1999) Modification of purified lipases from *Candida rugosa* with poly (ethyleneglycol): a systematic study. *Enzyme Microbiology and Technology*. **24**: 181-190.
  60. Hildebrand S. T. (1967) Standard Hildebrand values from Hansen. *Journal of Paint Technology*. **39**: 505.

- 
61. Hinckley G., Mozhaev V. V., Budde C. y Khmelnitsky Y. (2002) Oxidative enzymes possess catalytic activity in systems with ionic liquids. *Biotechnology Letters*. **24**: 2083-2087.
  62. Hocart S. J. (1987) Effect of reductive alkylation of D-lysine in position 6 on the histamine-releasing activity of luteinizing hormone-releasing hormone antagonist. *Journal of Medical Chemistry*. **30** (4): 739-743.
  63. Huang H., Zoppellaro G. y Sakurai T. (1999) Spectroscopic and kinetics studies on the oxygen-centred radical formed during the four-electron reduction process of dioxygen by *Rhus vernicifera* laccase. *The Journal of Biological Chemistry*. 274 (46): 32718-32724.
  64. Hublik G. y Schinner F. (2000) Characterization and immobilization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* and its use for the continuous elimination of phenolic pollutants. *Enzyme and Microbial Technology*. **27**: 330-336.
  65. Iakovlev A. y Stenlid I. (2000) Spatiotemporal patterns of laccase activity in interacting mycelia of wood-decaying basidiomycete fungi. *Microbial Ecology*. **39**: 236-245.
  66. Ichinose H., Wariishi H. y Tanaka H. (1999) Bioconversion of recalcitrant 4-methyldibenzothiophene to water-extractable products using lignin-degrading basidiomycete *Coriolus versicolor*. *Biotechnology Progress*. **15**: 706-714.
  67. Ikeda R., Sugihara J., Uyama H. y Kobayashi S. (1996) Enzymatic oxidative polymerization of 2,6 Dimethylphenol. *Macromolecules*. 29 (27): 8702-8705.
  68. Jackson C. J. C., Charlton J. L., Kuzminski K., Lang G. M. y Schon A. H. (1987) Synthesis, isolation, and characterization of conjugates of ovalbumin with monomethoxypolyethylene glycol using cyanuric chloride as the coupling agent. *Analytical Biochemistry*. **165**: 114-127.
  69. Johannes C. (2000) Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems. *Applied and Environmental Microbiology*. **66** (2): 524-528.
  70. Khmelnitsky Y. L., Mozhaev V. V., Belova A. B., Sergeeva M. V. y Martinek K. (1991) Denaturation capacity: a new quantitative criterion for selection of organic solvents as reaction media in biocatalysis. *European Journal of Biochemistry*. **198**: 31-41.
  71. Koide A. y Kobayashi S. (1983) Modification of amino groups in porcine pancreatic elastase with polyethylene glycol in relation to binding activity towards anti-serum and to enzymatic activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **111**: 659-667.
  72. Kitano H., Miyamoto T. y Kawasaki H. (2004) Fishing of  $\beta$ -amylase with SAM of  $\alpha$ -cyclodextrin-poly (ethylene glycol) conjugate. *Journal of Colloid and Interface Science*. **279**: 425-432.

- 
73. Klibanov, A. M. (1997) Why are enzymes less activity in organic solvent than in the water?. *Trends in Biotechnology*. **15**: 97-101.
74. Klibanov A. M. (2001) Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature* (409): 241-246.
75. Koch K. A., Peña M. y Thiele D. J. (1997) Copper-binding motifs in catalysis, transport, detoxification and signalling. *Chemistry & Biology*. **4**: 549-560.
76. Koroleva O. V., Stepanova E. V., Binukov V. I., Tomofeev V. P. y Pfeil W. (2001) Temperature-induced changes in copper center and protein conformation of two fungal laccases from *Coriolus hirsutus* and *Coriolus zonatus*. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1547**: 397-407.
77. Koroljova-Skorobogat'ko O. V., Stepanova E. V., Gavrilova V. P., Morozova O. V., Lubimova N. V., Dzchafarova A. N., Jaropolov A. I. y Makower A. (1998) Purification and characterization of the constitutive form of laccase from the basidiomycete *Coriolus hirsutus* and effect of inducers on laccase synthesis. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **28**: 47-54.
78. Kurganov B. I., Topchieva I. N. y Efremova N. V. (1997) Protein conjugates with water-soluble poly (alkylene oxides) entrapped in hydrated reversed micelles. *Bioconjugate Chemistry*. **8**: 637-642.
79. Laemmli U, K., (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680.
80. Lante A., Crapisi A., Pasini G., Zamorani A. y Spettoli P. (1992) Immobilized laccase for must and wine processing. p: 558-562. In D. S. Clark and Estell D. A. editor. *Enzyme Engineering XI*, The New York Academy of Sciences.
81. Larraya L., Pérez G., Ritter E., Pisabarro A. y Ramírez L. (2000) Genetic linkage map of the edible basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*. **66** (12): 5290-5300.
82. Larsson S., Cassland P. y Johnson L. J. (2001) Development of a *Saccharomyces cerevisiae* strain with resistance to phenolic fermentation inhibitors in lignocellulose hydrolysates by heterologous expression of laccase. *Applied and Environmental Microbiology*. **67**: 1163-1170.
83. Leatham G. y Stahmann M. (1981) Studies on the laccase of *Lentinula edodes*; specificity, localization and association with the development of fruiting bodies. *J. Gen. Microbiol.* **125**: 147-157.
84. Lee H. y Park T. G. (2003) A novel method for identifying PEGylation sites of protein using biotinylated PEG derivatives. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. **92** (1): 97-103.

- 
85. Li K., Xu F. y Karl-Erick L. E. (1999) Comparison of fungal laccases and redox mediators in oxidation of a nonphenolic lignin model compound. *Applied and Environmental Microbiology*. **65** (6): 2654-2660.
86. Lienqueo M. E., Salgado C. J. y Asenjo J. A. (1999) An expert system for selection of protein purification processes: experimental validation. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **74**: 293-299.
87. Lu J., Bender C. J., Mc Cracken J., Peisach J., Severns J. C. y Mc Millin D. R. (1992) Pulsed EPR studies of the type 2 copper binding site in the mercury derivate of laccase. *Biochemistry*. **31** (27): 6265-6272.
88. Maheshwari R., Bharadwaj G. y Mahalingeshwara K. B. (2000) Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **64** (3): 461-488.
89. Mai C., Schormann W., Milstein O. y Hüttermann A. (2000) Enhanced stability of laccase in the presence of phenolic compounds. *Applied Microbial and Biotechnology*. **54**: 510-514.
90. Majcherczyk A. y Johannes C. (2000) Radical mediated indirect oxidation of a PEG-coupled polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) model compound by fungal laccase. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1474**: 157-162.
91. Malmström B. G. y Leckner J. (1998) The chemical biology of copper. *Current of Biology*. **2**: 286-292.
92. Mansur M., Suárez T., Fernández-Larrea J. B., Brizuela M. A. y González A. E. (1997) Identification of a laccase gene family in the new lignin-degrading basidiomycete CECT 20197. *Applied and Environmental Microbiology*. **63** (7): 2637-2646.
93. Mayer A. M. y Staples R. C. (2002) Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry*. **60**: 551-565.
94. Mc Murry J. (1993) Química Orgánica. Grupo Editorial Iberoamericana, 3ª edición, México D. F. pag: 365.
95. Messerschmidt A., Ladenstein R., Huber R., Avigliano L., Petruzzeli R., Rossi A. y Finazzi-Agro A. (1992) Refined crystal structure of ascorbate oxidase at 1.9 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*. **224**: 179-205.
96. Morfardini C. y Veronese F. M. (1998) Stabilization of substances in circulation. *Bioconjugate Chemistry*. **9**: 418-450.
97. Mozhaev V. V., Khmel'nitsky Y. L., Sergeeva M. V., Belova A. B., Klyachko N., Levashov A. V. y Martinek K. (1989) Catalytic activity and denaturation of enzymes in water/organic

- 
- cosolvent mixtures:  $\alpha$ -Chymotrypsin and laccase in mixed water/alcohol, water/glycol and water/formamide solvents. *European Journal Biochemistry*. **184**: 597-602.
98. Muñoz C., Guillén F., Martínez A. T. y Martínez M. J. (1997) Laccase isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: Characterization catalytic properties and participation in activation of molecular oxygen and  $Mn^{2+}$  oxidation. *Applied and Environmental Microbiology*. **63** (6): 2166-2174.
99. Neumann N. y Snatzke G. (1990) Circular Dichroism of Proteins. In: Proteins: Form and Function. Herausgeber: Ralph A. Bradshaw and Mary Purton. *Elsevier Trends Journals*, Cambridge, 107-123
100. Okazaki S., Goto M., Wariishi H., Tanaka H. y Furusaki S. (2000) Characterization and catalytic property of surfactant-laccase complex in organic media. *Biotechnology Progress*. **16**: 583-588.
101. Okazaki S., Michizoe J., Goto M., Furusaki S., Wariishi H. y Tanaka H. (2001) Oxidation of bisfenol: A catalysed by laccase hosted in reversed micelles in organic media. *Enzyme and Microbial Technology*. **31**: 227-232.
102. Palmer A. E., Szilagyi R. K., Cherry J. R., Jones A., Xu F. y Solomon E. I. (2003) Spectroscopic characterization of the Leu513His variant of fungal laccase: Effect on increased axial ligand interaction on the geometric and electronic structure of the type I Cu site. *Inorganic Chemistry*. **42** (13): 4006-4017.
103. Palmieri G., Giardina P., Bianco C., Scaloni A., Capassol A. y Sannia G. (1997) A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. *The Journal of Biological Chemistry*. **272** (50): 31301-31307.
104. Penner-Hahn J. E., Hedman B., Hodgson K. O., Spira D. J. y Solomon E. I. (1984) On the spectral features associated with peroxide reactivity of the coupled binuclear copper activity site in type 2 depleted and native *Rhus vernicifera* laccase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **119** (2): 567-574.
105. Pezet R., Pont V. y Hoang-Van K (1991) Evidence for oxidative detoxification of pterostilbene and resveratrol by a laccase-like stilbene oxidase produced by *Botrytis cinerea*. *Physiol. Mol. Plant Pathol*. **39**: 441-450.
106. Privalov P. L. (1979) Stability of proteins: Small globular proteins. *Adv. Protein Chem*. **33**:167-241
107. Randall D. W., DeBeer S. G., Holland P. L., Hedman B., Hodgson K. O., Tolman W. B. y Solomon E. I. (2000) Spectroscopic and electronic structural studies of blue copper

- 
- model complex 2. comparison of three and four coordinate Cu(II)-Thiolate complex and fungal laccase. *Journal of American Chemistry Society*. **122**: 11632-11648.
108. Rehman A. U. y Thurston C. F. (1992) Purification of laccase 1 from *Armillaria mellea*. *Journal General Microbiology*. **138**: 1251-1257.
109. Reid I. D. (1991) Biological pulping in paper manufacture. *Trends in Biotechnology*. **9**: 262-262.
110. Reinhammar B. (2002) Laccase. In *Copper Proteins and Copper Enzymes*. Vol III, pp: 1-35, CRC Press, Boca Raton. Fl.
111. Ruggiero P., Sarkar J. M. y Bollag J. M. (1989) Detoxification of 2,4-diclorophenol by a laccase immobilized on soil or clay. *Soil Science*. **147**: 361-370.
112. Ruiz A., Malevé A. J., Felby C. y Griebenow K. (2000) Improved activity and stability of an immobilized recombinant laccase in organic solvent. *Biotechnology Letters*. **22**: 229-233.
113. Sannia G., Giardina P., Luna M., Rossi M. y Buonocore V. (1986) Laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Biotechnology Letters*. **8**: 797-800.
114. Sato Y., Wulli B., Sederoff R., y Wetten R. (2001) Molecular cloning and expression of eight cDNAs in loblolly pine (*Pinus taeda*). *J. Plant Res*. **114**: 147-155.
115. Schneider P., Caspersen M. B. Mondorf K., Halkier T., Skov L. K., Ostergaard P. R., Brown K. M., Brown S. H. y Xu F. (1999) Characterization of a *Coprinus cinereus* laccase. *Enzyme and Microbial Technology*. **25**: 502-508.
116. Shin-Ya Y., Aye H. N., Kyung-Jin H. y Kajiuchi T. (2005) Efficacy of amphiphile-modified laccase in enzymatic oxidation and removal of phenolic in aqueous solution. *Enzyme and Microbial Technology*. **36**: 147-152.
117. Shirley B. A. (1995) Protein stability and folding. Totowa New Jersey, Humana Press.
118. Sidjanski S., Mathews G. V. y Vanderberg J. P. (1997). Electrophoretic separation and identification of phenoloxidases in hemolymph and midgut of adult *Anopheles stephensi* mosquitoes. *Journal of Parasitology*. **83**: 686-691.
119. Slomczynski D., Nakas J.P. and Tanenbaum S. W. (1995) Production and characterization of laccase from *Botrytis cinerea*. *Applied and Environmental Microbiology*. **61**: 907-912.
120. Soares M. B. G., Amorim M. T. P., Hrdina R. y Costa-Ferreira M. (2001) Studies on the bio transformation of novel disazo dyes by laccase. *Process Biochemistry*. **37** (6): 581-587.

- 
121. Solomon E. I., Sundaram U. M. y Machonkin T. E. (1996) Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem. Rev.* **96**: 2563-2605.
  122. Sturtevant J. M. (1987) Biochemical applications of differential scanning calorimetry. *Ann. Rev. Phys. Chem.* **38**: 463-488.
  123. Sundaram U. M., Zhang H. H., Hedman B., Hodgson K. O. y Solomon E. I. (1997) Spectroscopic investigation of peroxide binding to the trinuclear copper cluster site in laccase: Correlation with the peroxy-level intermediate and relevance to catalysis. *Journal of American Chemistry Society.* **119**: 12525-12540.
  124. Thurston C. F. (1994) The structure and function of fungal laccases. *Microbiology.* **140**: 19-26.
  125. Turner N. A. y Vulfson E. N. (2000) At what temperature can enzymes maintain their catalytic activity?. *Enzyme and Microbial Technology.* **27**: 108-113.
  126. Tian-Zhi W., Wei-Ping L., Hong-Wen W., Pei-Jiang Z. y Song-Sheng Q. (2000) Assay for laccase activity by microcalorimetry: Laccase was extracted from China lacquer of *Rhus vernicifera*. *Journal of Biochemistry and Biophysics Methods.* **45**: 57-63.
  127. Tolman W. B. y Spencer D. J. E. (2001) New advances in ligand design for modelling of metalloprotein active sites. *Current Opinion in Chemical Biology.* **5**: 188-195.
  128. Torres E., Bustos-Jaimes I. y Le Borgne S. (2003) Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants. *Applied Catalysis B: Environmental.* **23**: 1-14.
  129. Vandertol-Vanier H. A., Vazquez-Duhalt R., Tinoco R. y Pickard M. A. (2002) Enhanced activity by poly(ethyleneglycol) modification of *Coriopsis gallica* laccase. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology.* (29): 214-220.
  130. Varalakshmi P., Lathika K. M., Raghavan K. G. y Singh B. B. (1995) Altered physicochemical characteristic of polyethylene glycol linked beet stem oxalate oxidase. *Biotechnology and Bioengineering.* **46**: 254-257.
  131. Varela E., Böckle B., Romero A., Martínez A. T. y Martínez M. J. (2000) Biochemical characterization, cDNA cloning and protein crystallization of aryl-alcohol oxidase from *Pleurotus pulmonarius*. *Biochimica et Biophysica Acta.* **1476**: 129-138.
  132. Vazquez-Duhalt R., Fedorak P. M. y Westlake D. W. S. (1992) Role of enzyme hydrophobicity in biocatalysis in organic solvent. *Enzyme Microbial and Technology.* **14**: 23-30.
  133. Veronese F. M., Caliceti P. and Schiavon O. (2003) Site-specific preparation of polyethylene glycol-grf conjugates. *Applied Research Systems* (patente: 6, 528, 485): 1-18.



- 
134. Velicelebi G. y Sturtevant J. M. (1979) Thermodynamics of the denaturation of lysozyme in alcohol-water mixtures. *Biochemistry*. **(18)**: 1180-1186.
135. Villaseñor F. y Viniegra-González G. (2004) Oxidación de dibenzotiofeno mediante los sistemas enzima lacasa-ABTS o ácido fosfotungstico-peroxido de hidrógeno y desulfuración oxidativa del diesel. *Tesis de Doctorado en Biotecnología*.
136. Vinogradov A., Kudryashova A., Grinberg E. V., Grinberg V. Y., Burova N. V. y Levashov T. V. (2001) The chemical modification of  $\alpha$ -quimotripsin with both hydrophobic and hydrophilic compounds stabilizes the enzyme against denaturation in water-organic media. *Protein Engineering*: **14**: 683-689.
137. Wangikar P. P., Rich J. O., Clark D. S. y Dordick J. S. (1995) Probing enzymic transition state hydrophobicities. *Biochemistry*. **34**: 12302-12310.
138. Wieder K. J., Palczuk N. C., Van Es T. y Davis F. F. (1979) Some properties of poly (ethyleneglycol): Phenylalanine ammonia-lyase adducts. *J. Biol. Chem.* **254**: 12579-12587.
139. Wiegant W. M. (1992) Growth characteristics of the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum* en relation to production of mushroom compost. *Applied and Environmental Microbiology*. **58 (4)**: 1301-1307.
140. Williamson P. R. (1994) Biochemical and molecular characterization of the diphenol oxidase of *Cryptococcus neoformans*: identification as a laccase. *Journal of Bacterial*. **176**: 656-664.
141. Xiao Y. Z., Tu X. M., Wang J., Zhang M., Cheng Q., Zeng W. Y. y Shi Y. Y. (2003) Purification, molecular characterization and reactivity with aromatic compounds of laccase. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **60**: 700-707.
142. Xu F. (1996) Oxidation of phenols, anilines y benzethiols by fungal laccases: correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. *Biochemistry*. **35**: 7608-7614.
143. Xu F., Berka R. M., Wahleithner J. A., Nelson B. A., Shuster J. R., Brown S. H., Palmer A. E. y Solomon E. I. (1998) Site-directed mutations in fungal laccase: effect on redox potential, activity and pH profile. *Biochemical Journal*. **334**: 63-70.
144. Yaver D. S., Xu F., Golightly E. J., Brown K. M. Brown S. H., Rey M. W., Schneider P., Halkier T., Mondorf K. y Dalboge H. (1996) Purification, characterization, molecular cloning and expression of two laccase genes from the white rot basidiomycete *Trametes villosa*. *Applied and Environmental Microbiology*. **62 (3)**: 834-841.

- 
145. Yoshida H. (1883) Chemistry of lacquer (urishi). *Journal of American Chemistry Society*. **43**: 472-486.
146. Yoshinaga K., Shafer S. G. y Harris J. M. (1987) Effects of polyethylene glycol substitution on enzyme activity. *J. Bioact Compatible Polym.* **2**: 49-56.
147. Zaks A. y Klibanov A. M. (1988) The effect of water on enzyme action in organic media. *The Journal of Biological Chemistry*. **263** (17): 8017-8021.
148. Zalipsky S. (1995) Functionalised poly (ethylene glycol) for preparation of biologically relevant conjugates. *Bioconjugate Chemistry*. **6**: 150-165.