



ABRIR CAPÍTULO III

IV.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

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

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

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

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

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

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

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

^b mmol COOH g⁻¹ copolímero.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

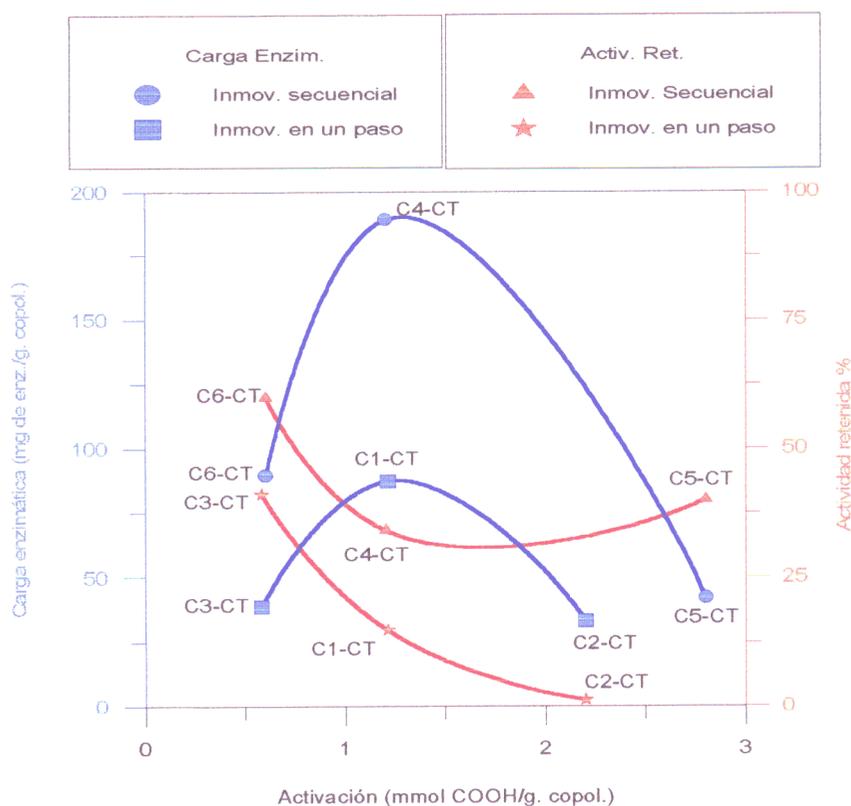


Figura 21.- Influencia de la activación de los soportes y de la actividad retenida sobre la carga enzimática para ambas metodologías de inmovilización (en un solo paso y secuencial).

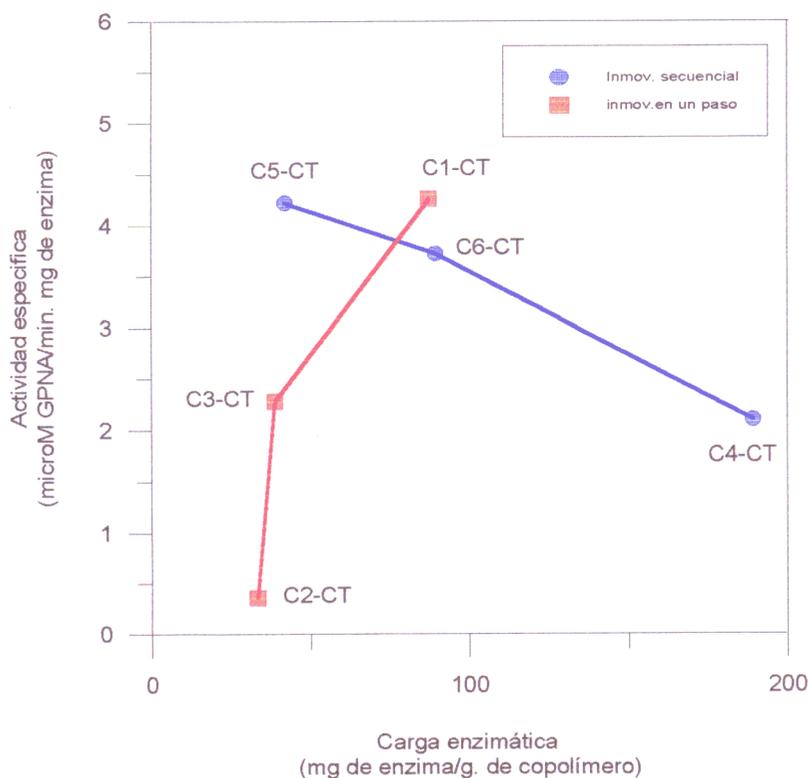


Figura 22.- Influencia de la carga enzimática sobre la actividad específica para ambas metodologías de inmovilización (en un solo paso y secuencial).

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

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

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

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

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

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

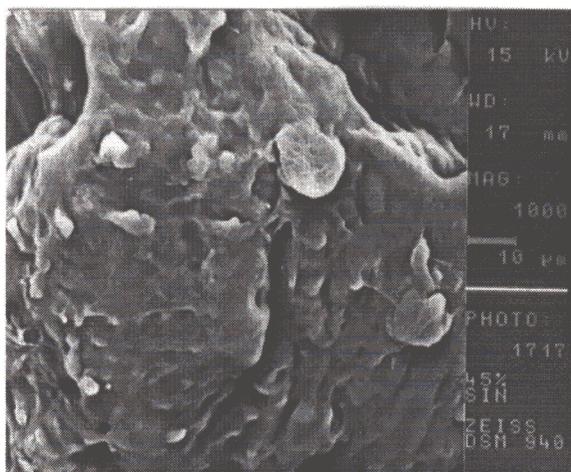
Para conocer el aspecto micromorfológico de estos derivados se realizaron fotografías de microscopía electrónica, las cuales aparecen ordenadas según el porcentaje de injerto del soporte en las **Figuras 23, 24 y 25**.

En ellas podemos apreciar como:

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

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

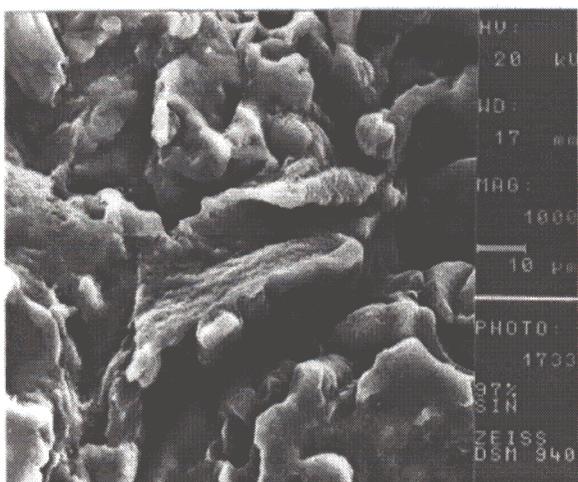
c) En la **Figura 25** se observan claramente los agregados de moléculas de enzima que aparecen señaladas con una flecha, presentando esta una estructura esférica. Estos agregados en multicapa presentan mayor tamaño, lógicamente, en aquellos derivados con mayor carga enzimática



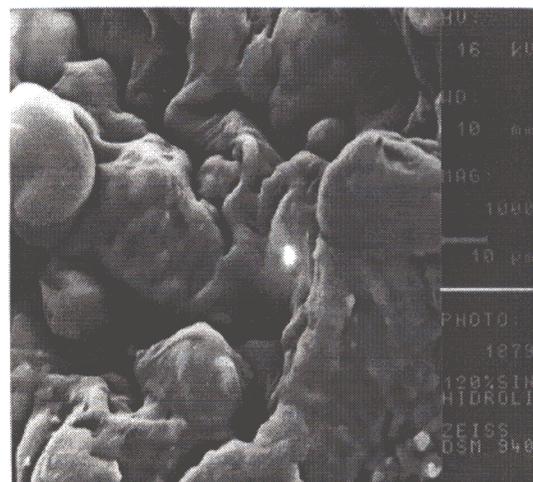
a)



b)

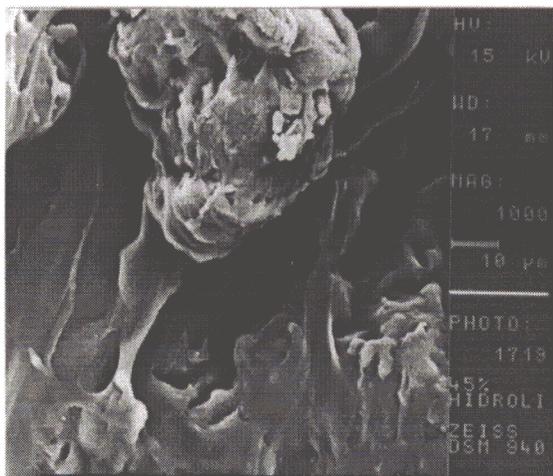


c)

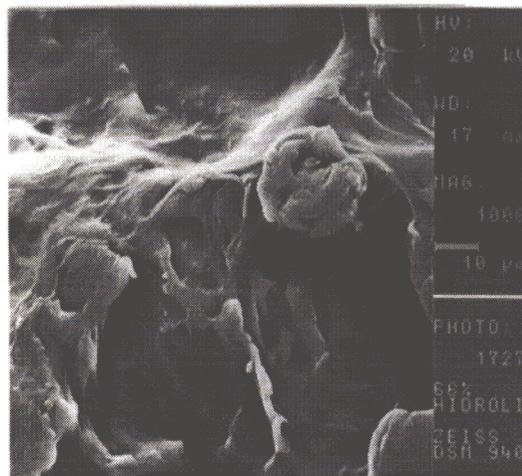


d)

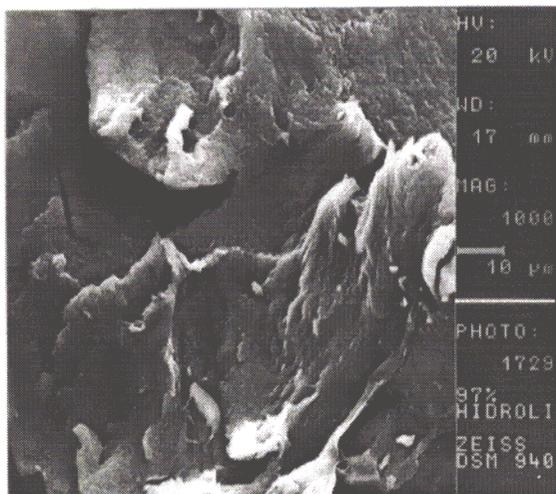
Figura 23.- Fotografías de microscopía electrónica a 1000 aumentos de los soportes sin hidrolizar. a) 32.1% de injerto; b) 38.0% de injerto; c) 49.2% de injerto; d) 54.5% de injerto.



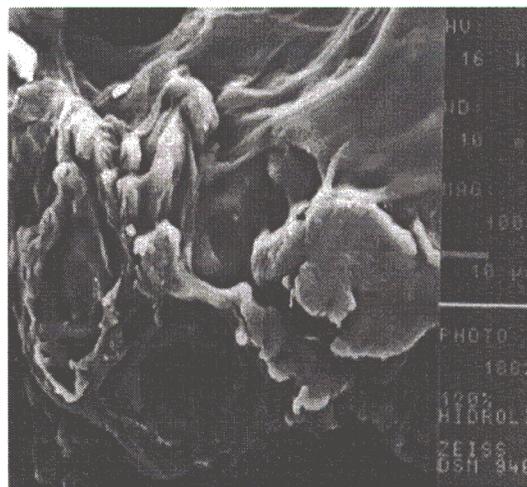
a)



b)



c)



d)

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

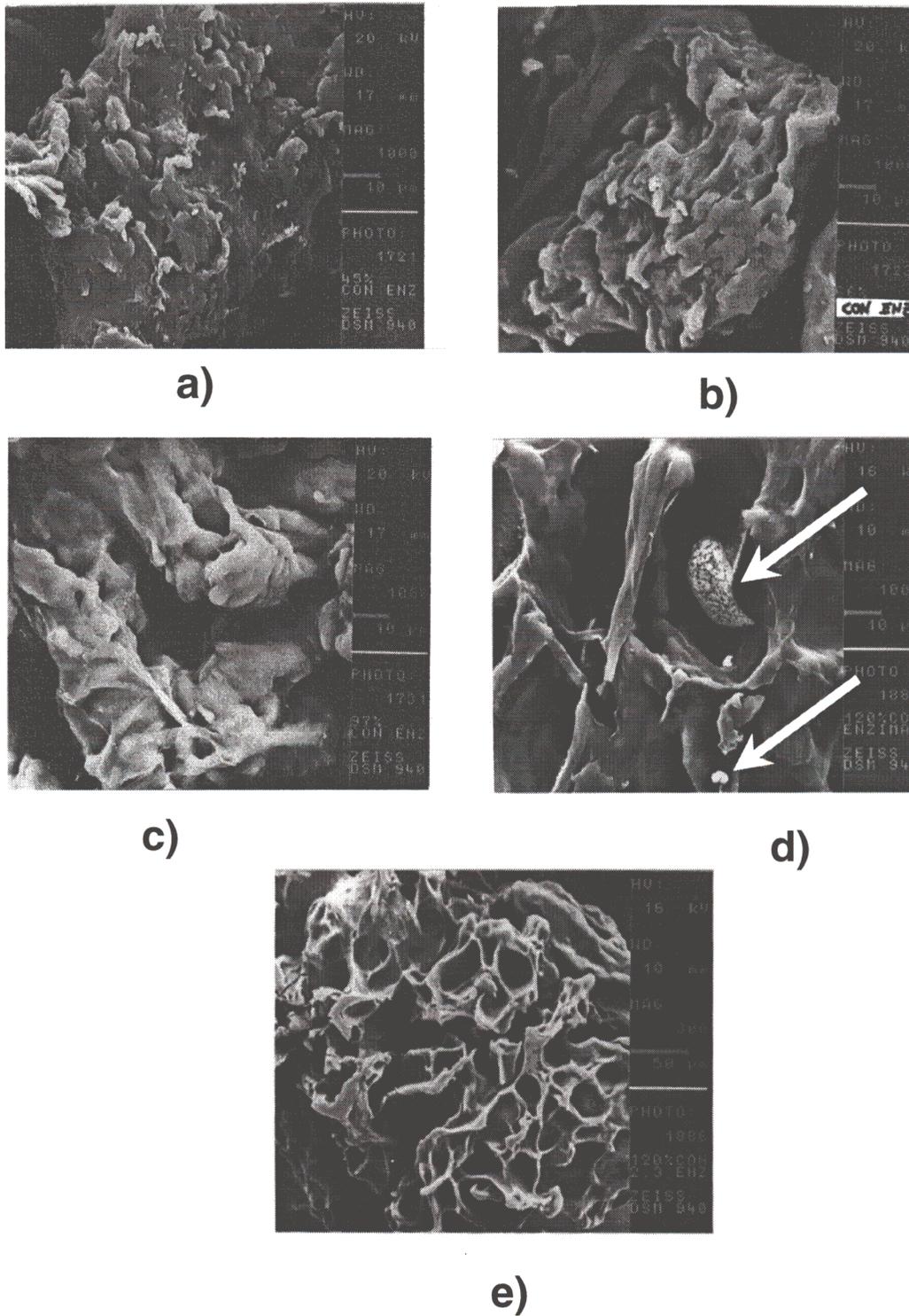


Figura 25.- Fotografías de microscopía electrónica a 1000 aumentos de los derivados inmovilizados sobre copolímeros de injerto. a) C2-CT; b) C1-CT; c) C3-CT; d) C4-CT; e) C5-CT (300 aumentos).

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

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

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

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

a) Enzima libre

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

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

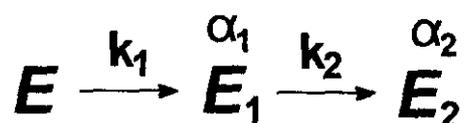
Las temperaturas empleadas fueron 2, 25, 37 y 50 °C, tal y como se recoge en la **Sección III.6.1.**

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

estabilidad de la enzima.

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

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



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

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

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

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

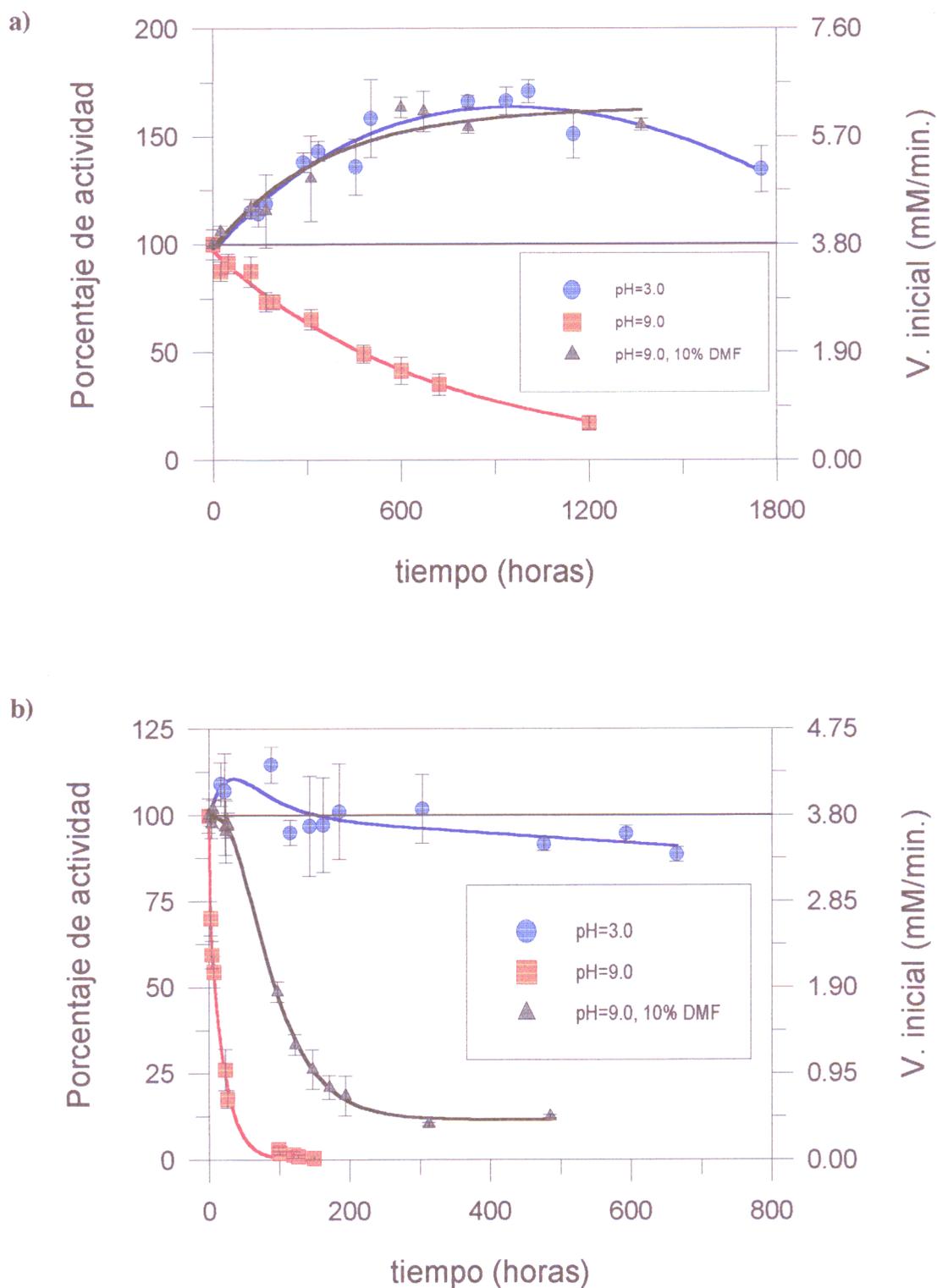


Figura 26.- Estabilidad de la enzima libre, en sistemas sin agitación. a) 2 °C; b) 25 °C.

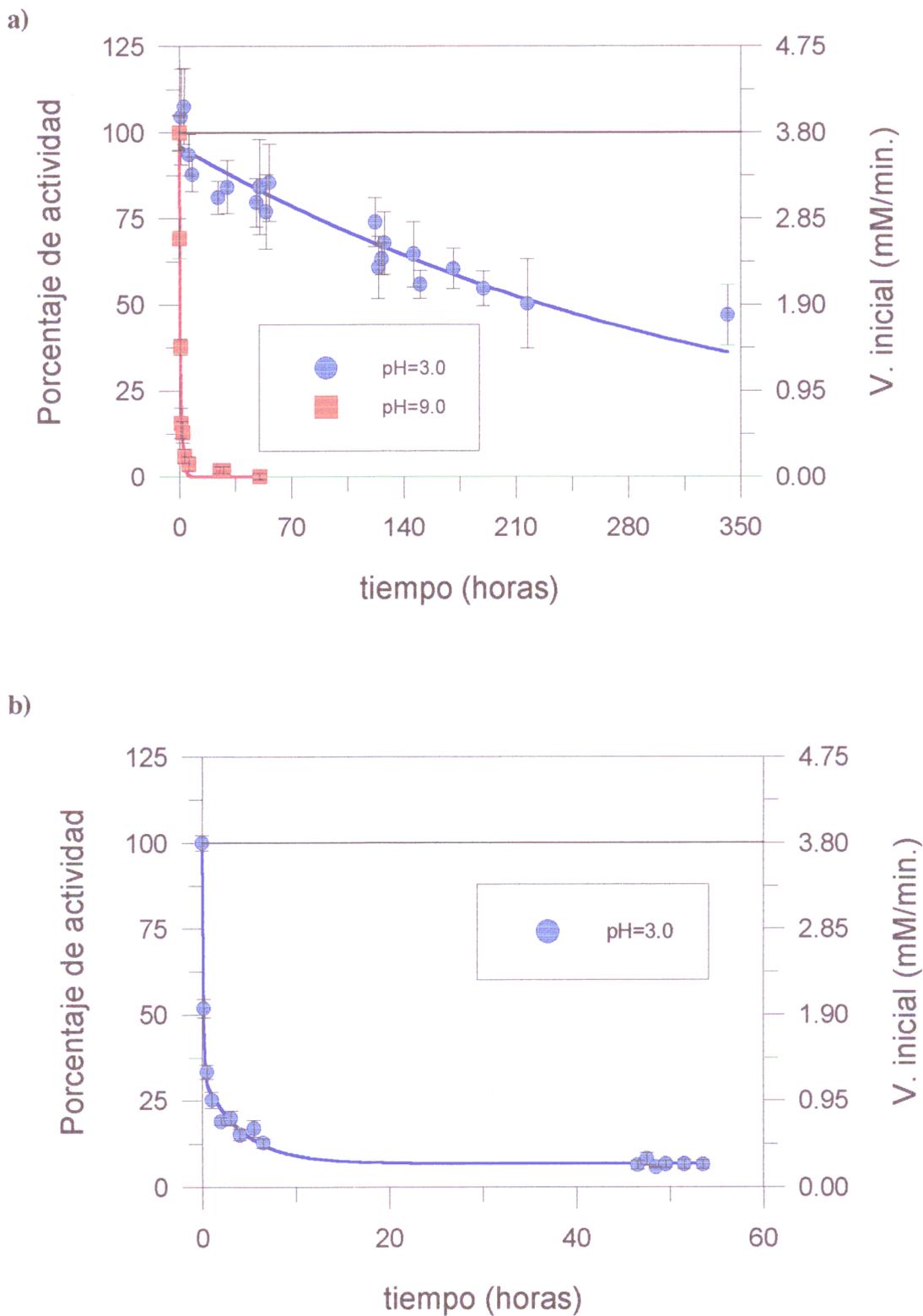


Figura 27.- Estabilidad de la enzima libre, en sistemas sin agitación. a) 37 °C; b) 50 °C.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

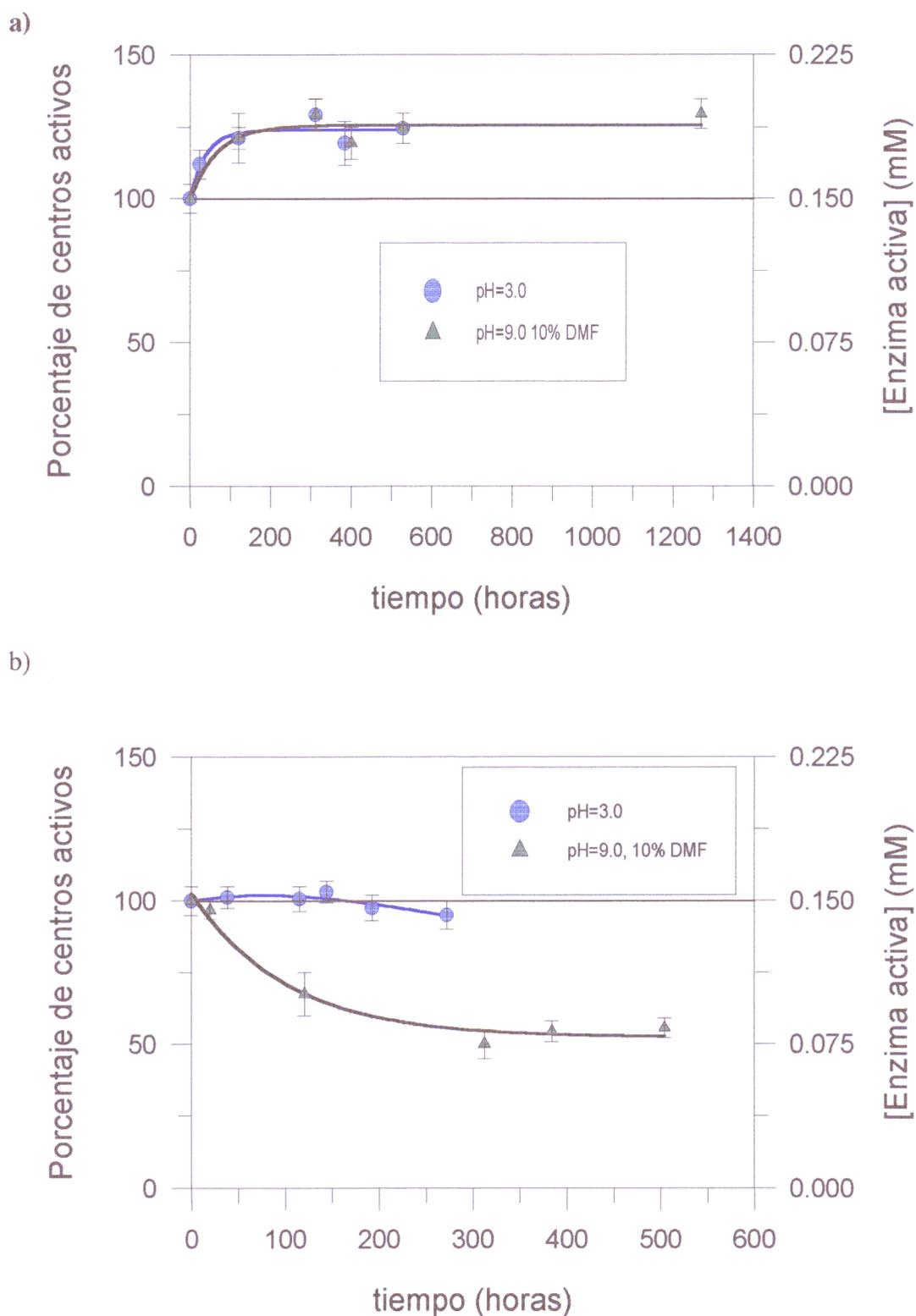


Figura 28.- Medida del número de centros activos de las disoluciones de enzima comercial (5 mg/ml) en tampón ác. cítrico/citrato sódico, pH=3.0, 0.05 M y ác. bórico/NaOH, pH=9.0, 0.05 M, con un 10% de DMF (v/v), empleando sultona como sustrato. a) Enzima incubada a 2 °C; b) enzima incubada a 25 °C.

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

b) Enzima inmovilizada

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

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

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

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

- $R^2 = 0.503$

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

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

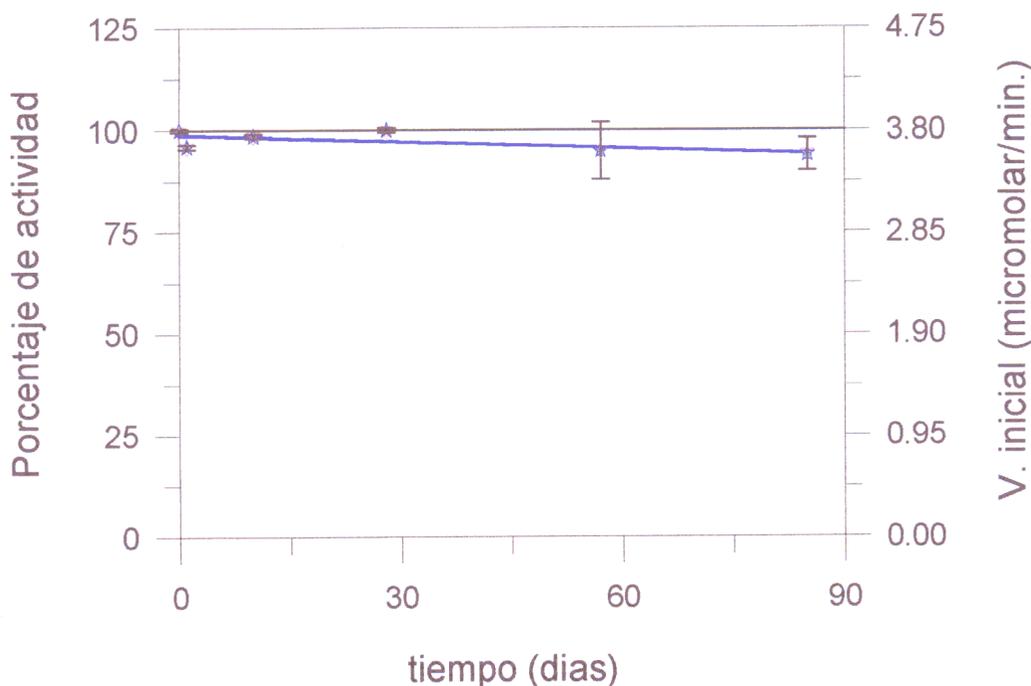


Figura 29.- Estabilidad del derivado C6-CT en condiciones de almacenamiento, liofilizado en estado sólido a 2°C de temperatura.

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

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

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

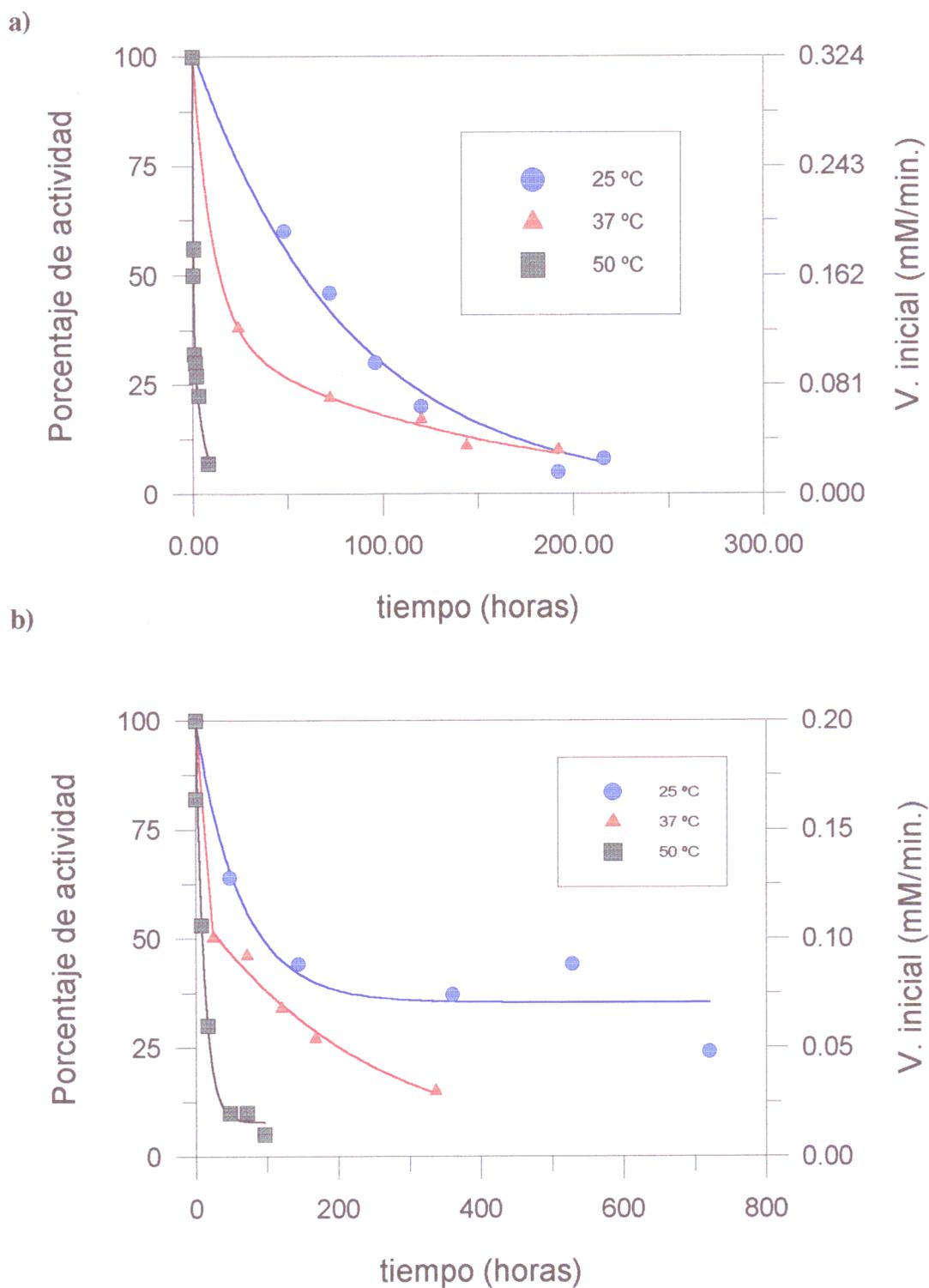


Figura 30.- Estabilidad térmica en sistemas bifásicos con agitación AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 97/3 (v/v). a) Enzima libre (0.075 mg/ml); b) Derivado C6-CT (1.3 mg de derivado/ml equivalentes a 0.113 mg de enzima/ml).

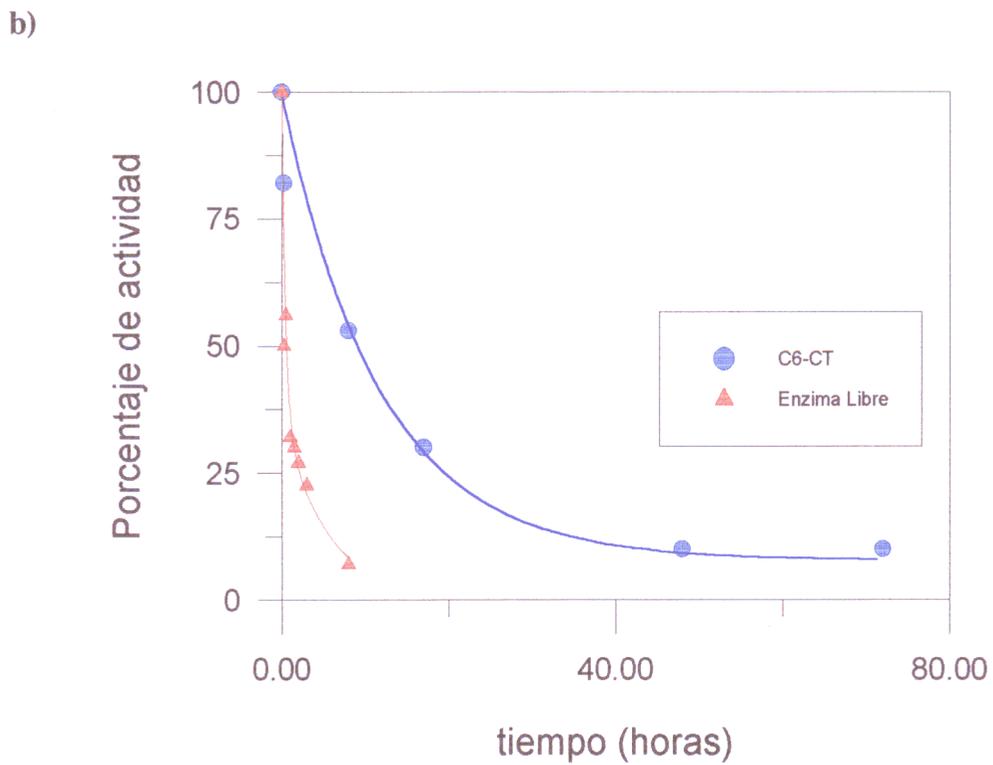
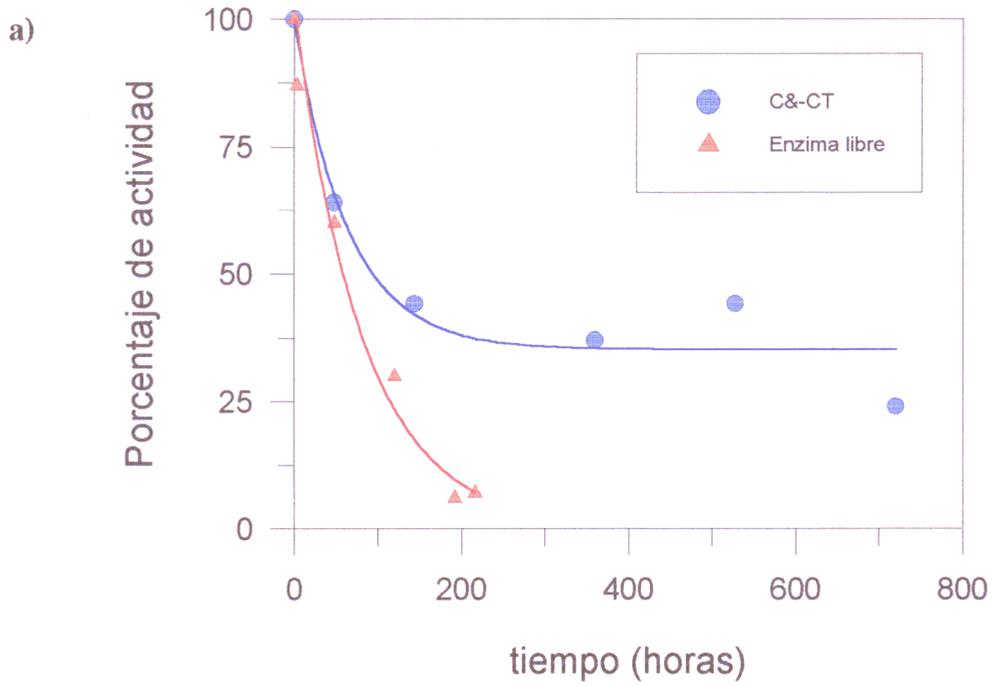


Figura 31 .- Diferencias en la desactivación térmica de la enzima libre (0.075 mg/ml) y del derivado C6-CT (1.3 mg de derivado/ml equivalentes a 0.113 mg de enzima/ml) en sistemas bifásicos con agitación AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 97/3 (v/v). a) 25 °C; b) 50 °C.

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

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

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

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

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

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

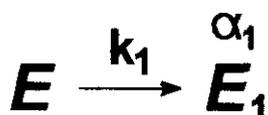
En nuestro grupo también se ha estudiado la estabilidad de derivados de lipasa de *Candida rugosa* inmovilizada sobre geles hidrofílicos de agarosa y sobre un soporte hidrofóbico como es la sílice. Así, los primeros resultan ser más estables debido a su mayor carácter hidrofílico, que les permite fijar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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

IV.1.3.-ENSAYOS DE ABRASIÓN

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

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

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

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

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

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

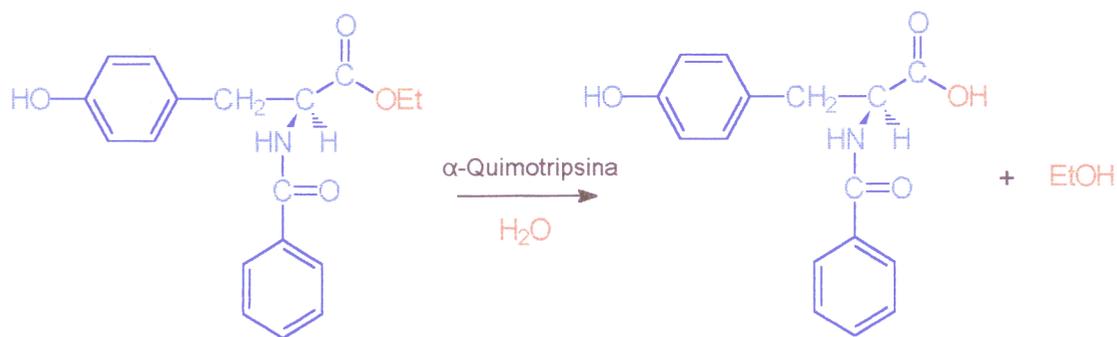
^a *Actividad en los líquidos del filtrado tanto en hidrólisis (μ mol de pNA/min.) como en procesos de síntesis (mmoles de péptido/min.).*

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

IV.1.4.- REACCIONES DE HIDRÓLISIS

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

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



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

IV.1.4.1.- Estudio cinético del proceso de hidrólisis

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

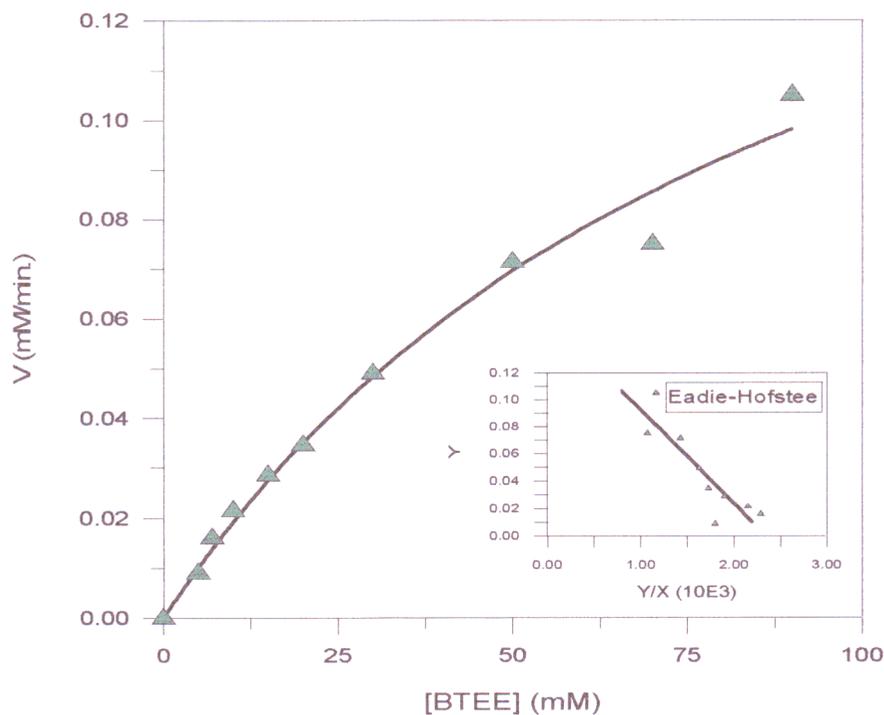


Figura 32.- Estudio cinético del proceso de hidrólisis, empleando el derivado C5-CT (1.3 mg derivado/ml equivalentes a 0.053 mg de enzima/ml).

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

IV.1.4.2.- Influencia del porcentaje de medio acuoso

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

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

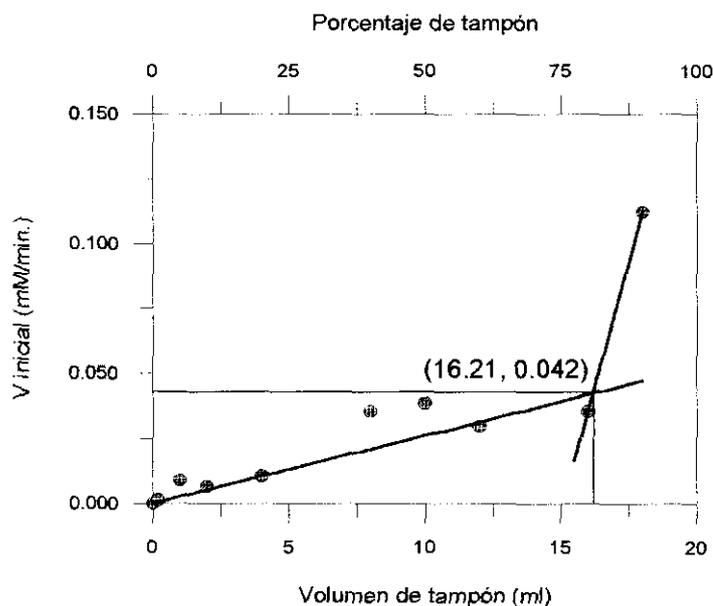


Figura 33.- Influencia del porcentaje de tampón en los procesos de hidrólisis llevados a cabo con el derivado C5-CT (1.3 mg de derivado/ml equivalentes a 0.053 mg de enzima/ml).

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

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

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

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

IV.1.5.1.- Influencia de la cantidad de enzima

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

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

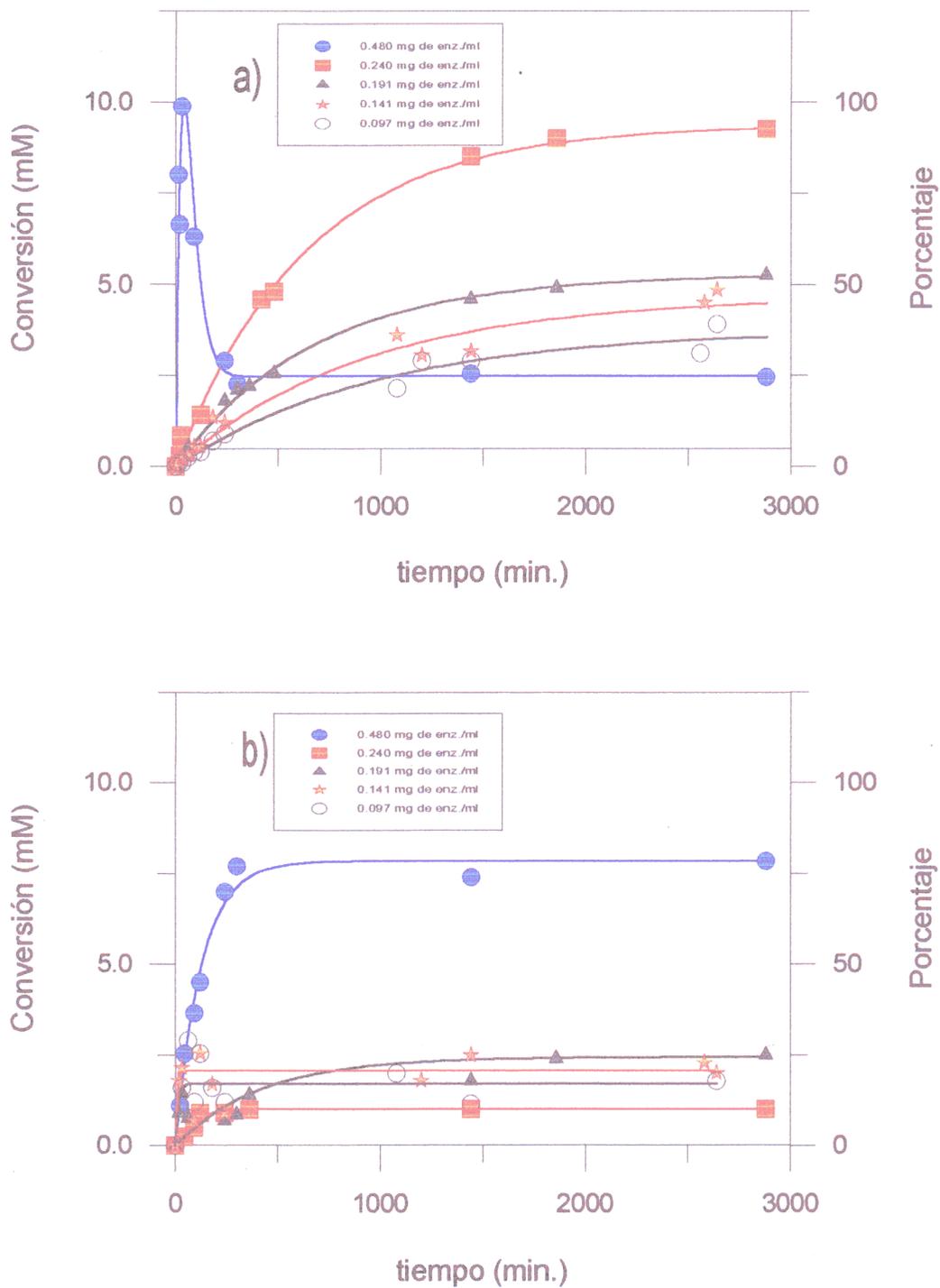


Figura 34.- Influencia de la variación en la concentración de enzima, derivado C1-CT, en la síntesis del dipéptido Bz-L-Tyr-L-Leu-NH₂, empleando como medio AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 2/1, (v/v). a) Péptido; b) ácido.

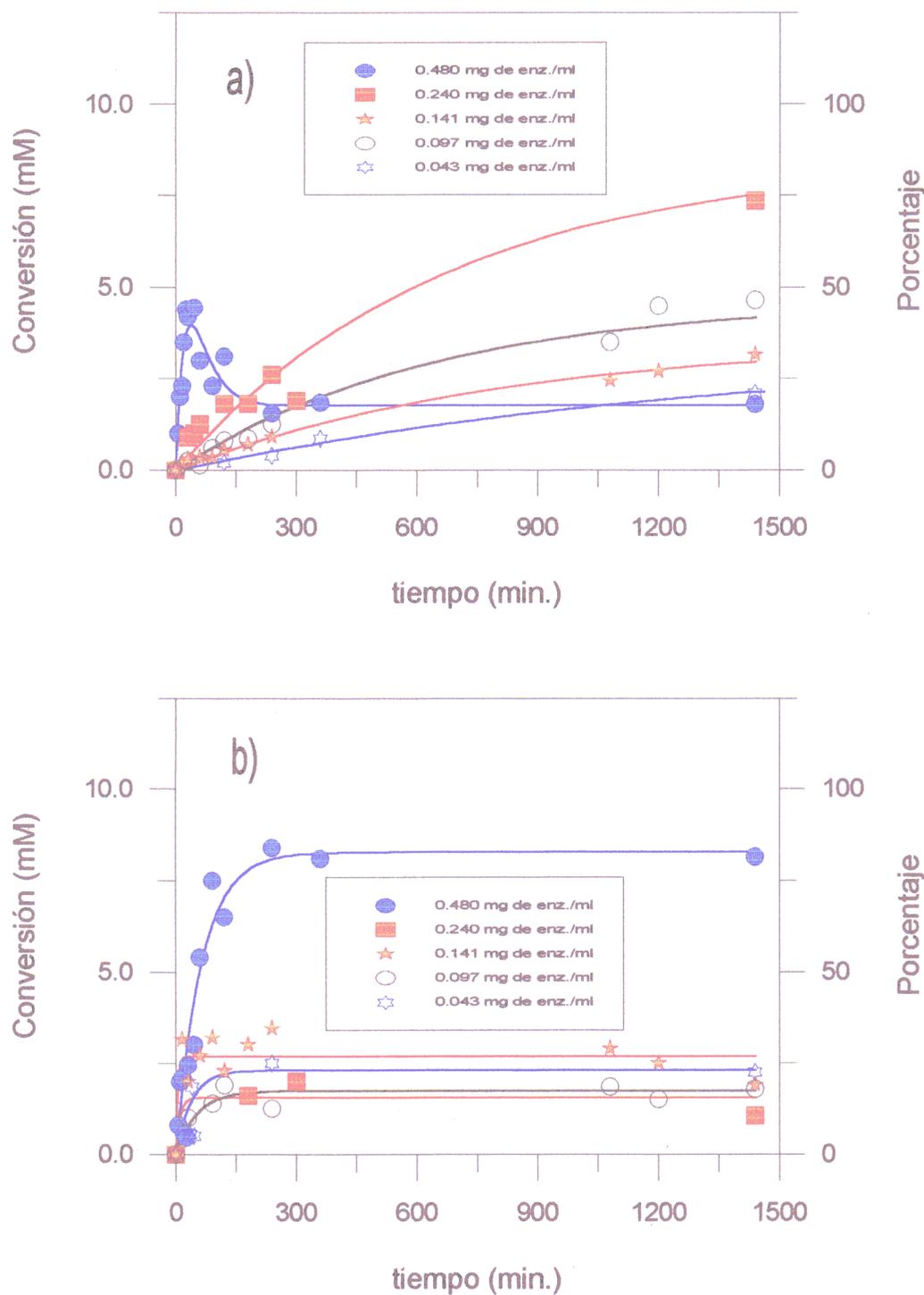


Figura 35.- Influencia de la variación en la concentración de enzima, derivado C2-CT, en la síntesis del dipéptido Bz-L-Tyr-L-Leu-NH₂, empleando como medio AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 2/1, (v/v). a) Péptido; b) ácido.

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

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

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

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

*A partir de ese tiempo aparece la actividad amidásica

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

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

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

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

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

*A partir de ese tiempo aparece la actividad amidásica

Considerando la aparición de la actividad amidásica como una reacción indeseable

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

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

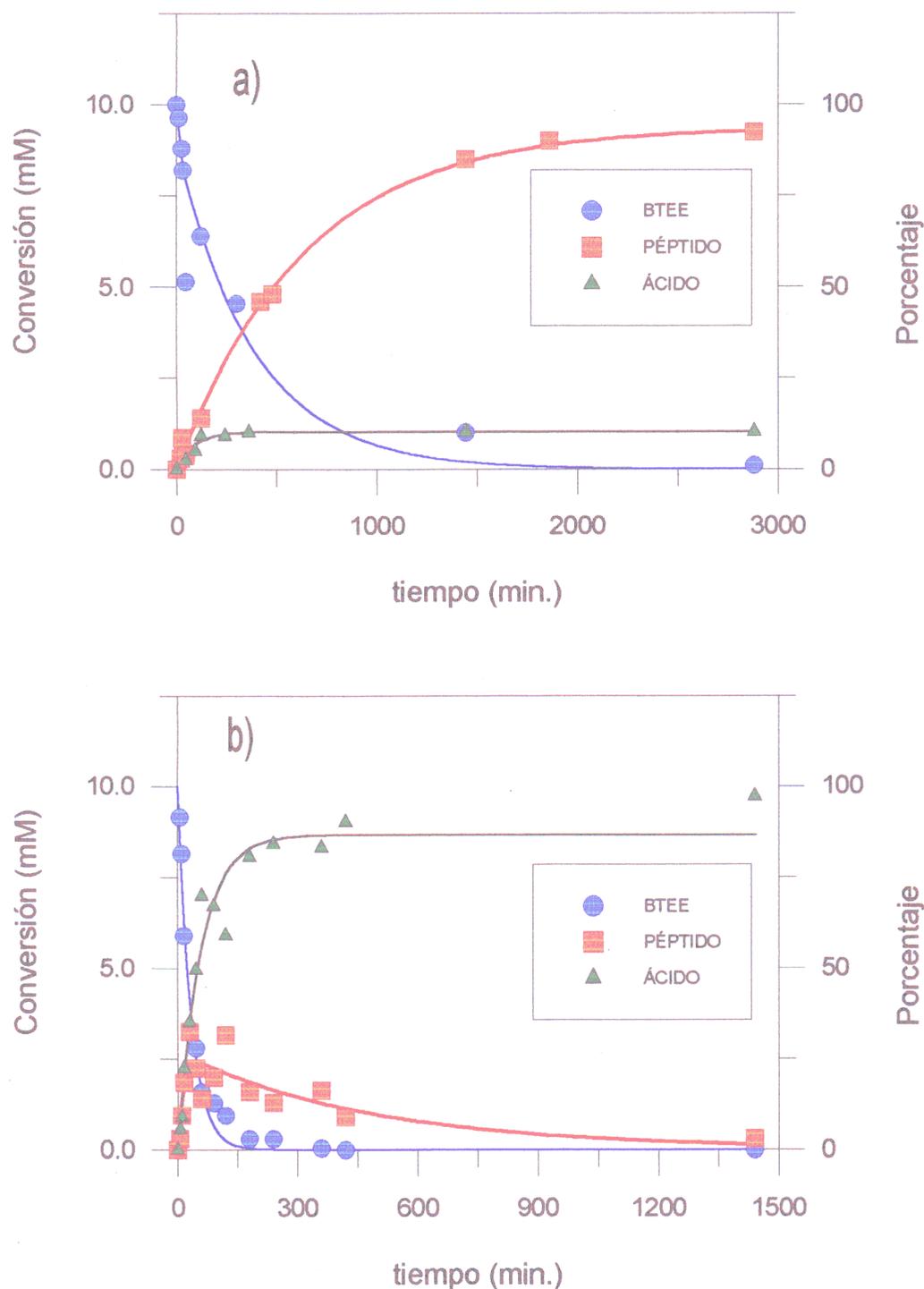
Empleando las condiciones óptimas del ensayo anterior con el derivado C1-CT (2.75 mg de derivado/ml, equivalentes a 0.24 mg de α -quimotripsina/ml, en reactor) se procedió a sintetizar los dipéptidos: Bz-L-Tyr-L-Leu-NH₂, Bz-L-Tyr-L-Ala-NH₂, Ac-L-Phe-L-Leu-NH₂ y Ac-L-Phe-L-Ala-NH₂, para comprobar la posible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

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

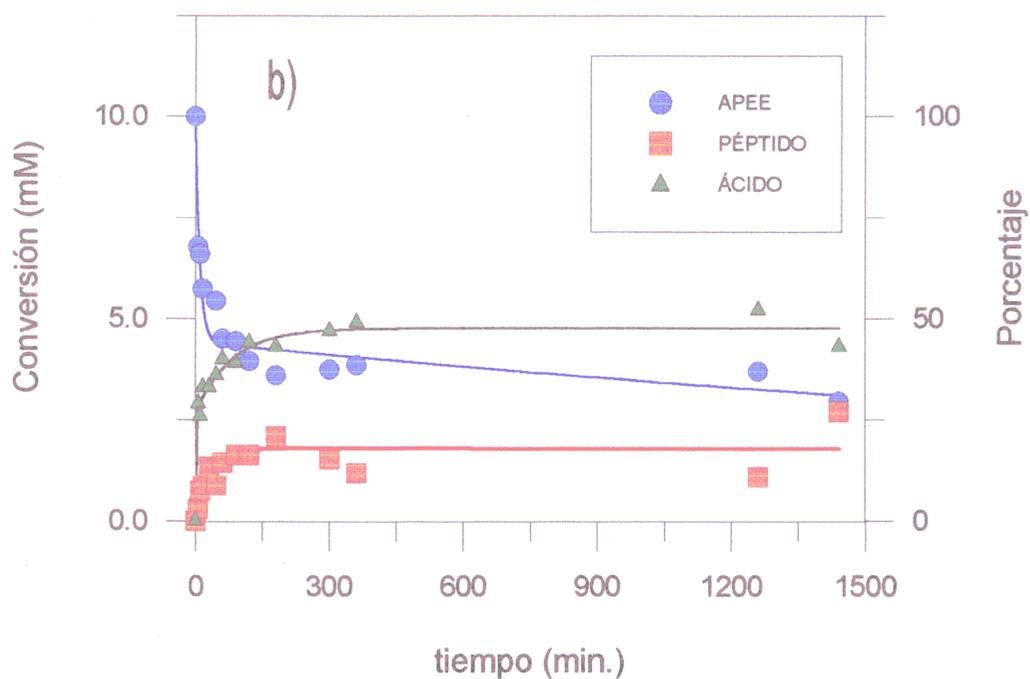
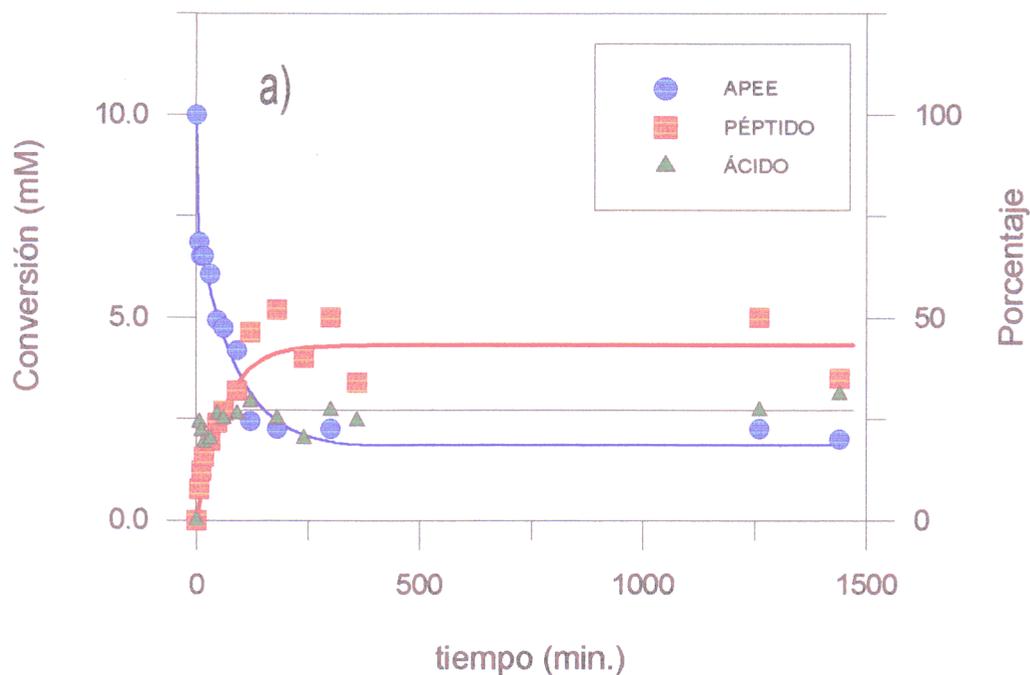
Estas conclusiones quedan patentes en la **Tabla 21**, donde vemos que la relación péptido/ácido es mayor de uno en el caso de H-L-Leu-NH₂ y menor de uno en el caso de la H-L-Ala-NH₂.

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

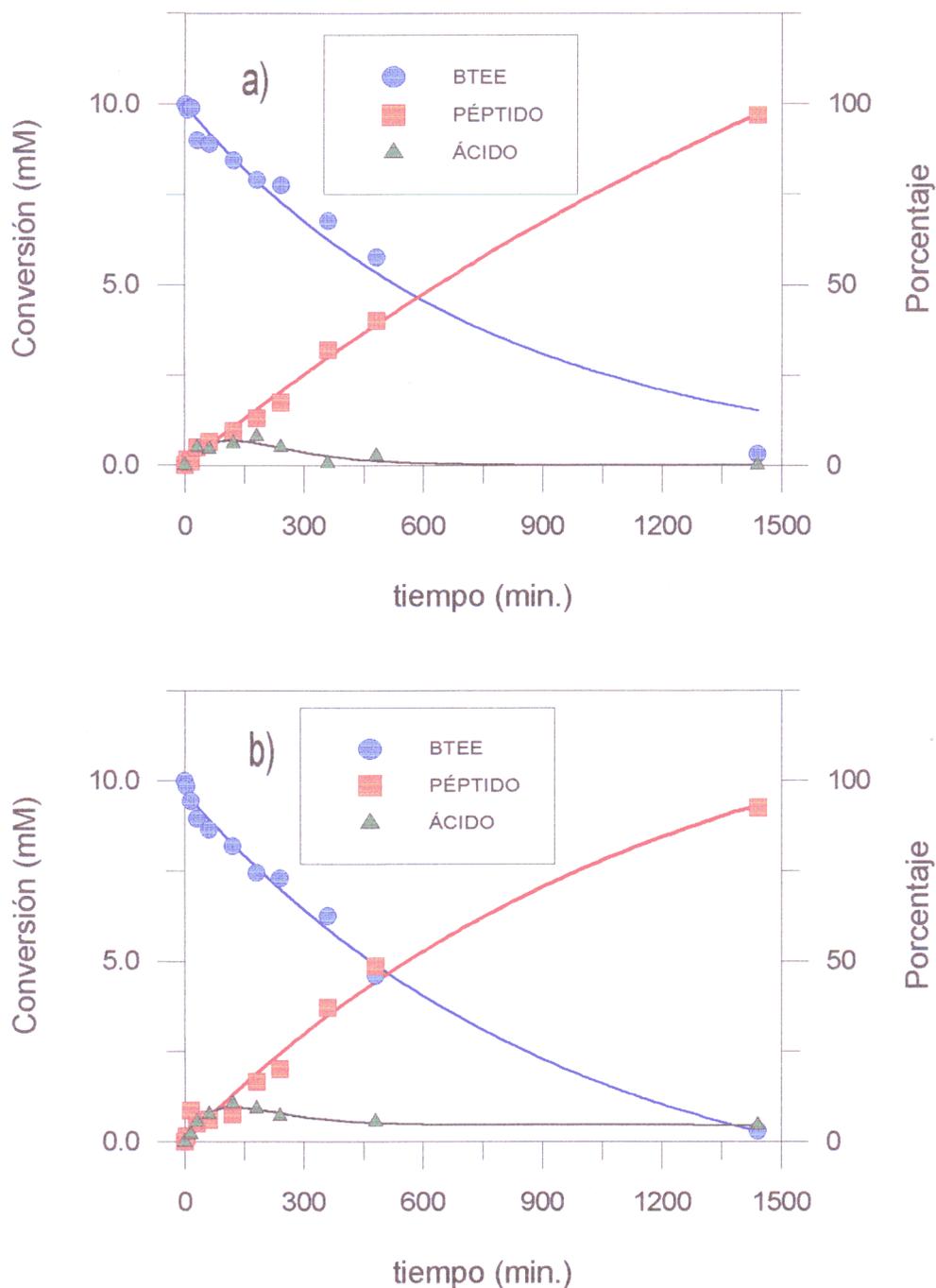
Además por lo que se refiere a la naturaleza del donador de acilo la tirosina se encuentra benzoilada frente a la fenilalanina acetilada resultando este último más polar que el primero, por lo que teniendo en cuenta las especificaciones anteriores el sustrato más lipóide debería "acercarse" mejor al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



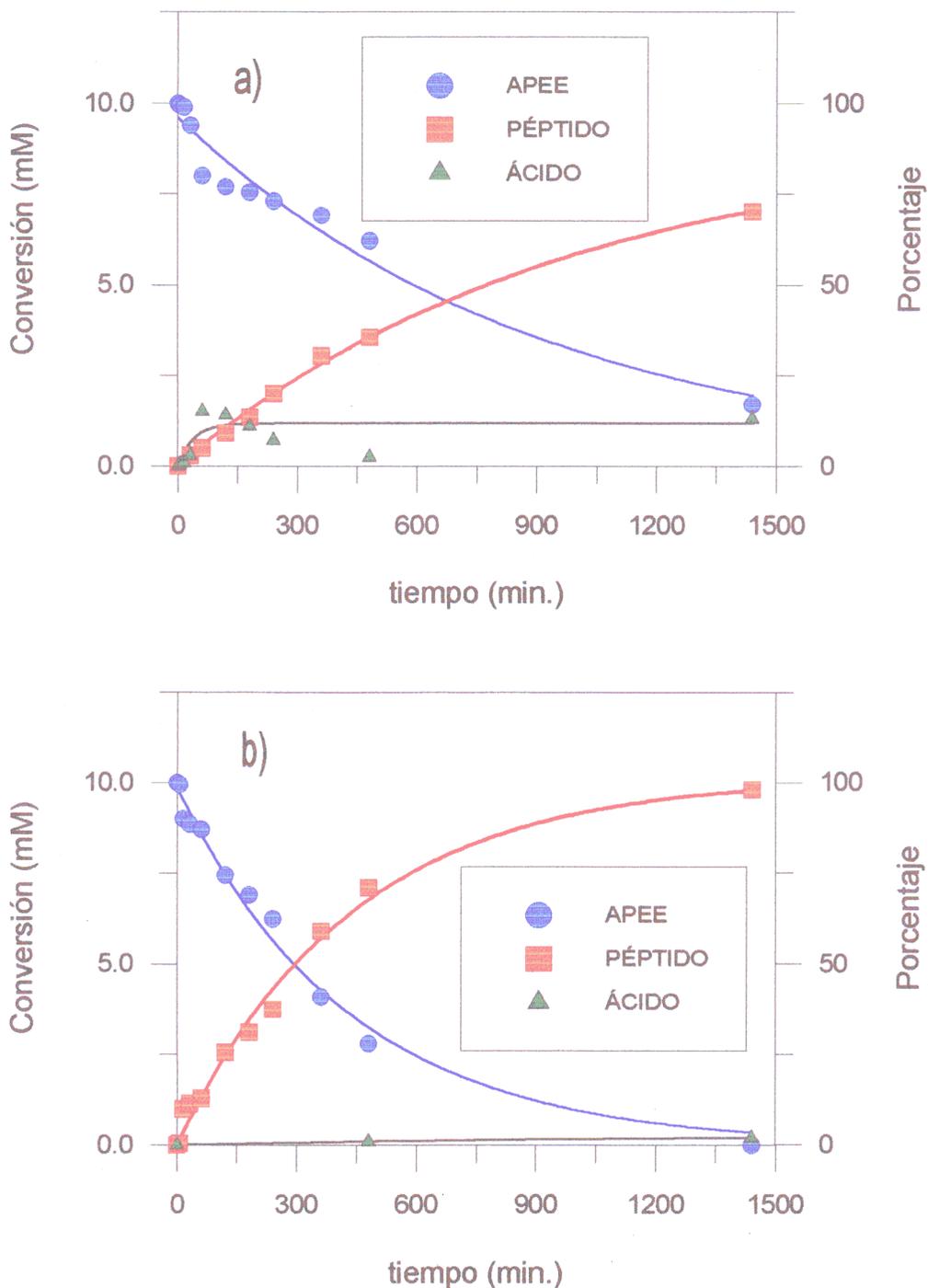
Figuras 36.- Influencia de la naturaleza del nucleófilo en la síntesis de péptidos empleando AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 2/1, (v/v) y C1-CT (2.75 mg de derivado/ml equivalentes a 0.24 mg de enzima/ml) como catalizador y Bz-L-Tyr-OEt (10 mM) como donador de acilo. a) Síntesis de Bz-L-Tyr-L-Leu-NH₂; b) Síntesis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



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



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



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

conversiones con BTEE que con APPE.

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

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

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

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

* A partir de ese tiempo comienza la actividad amidásica.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

IV.1.5.3.- Influencia de la naturaleza del disolvente

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

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

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

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

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

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

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

b.- Cambios globales en la estructura tridimensional:

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

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

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

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

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

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

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

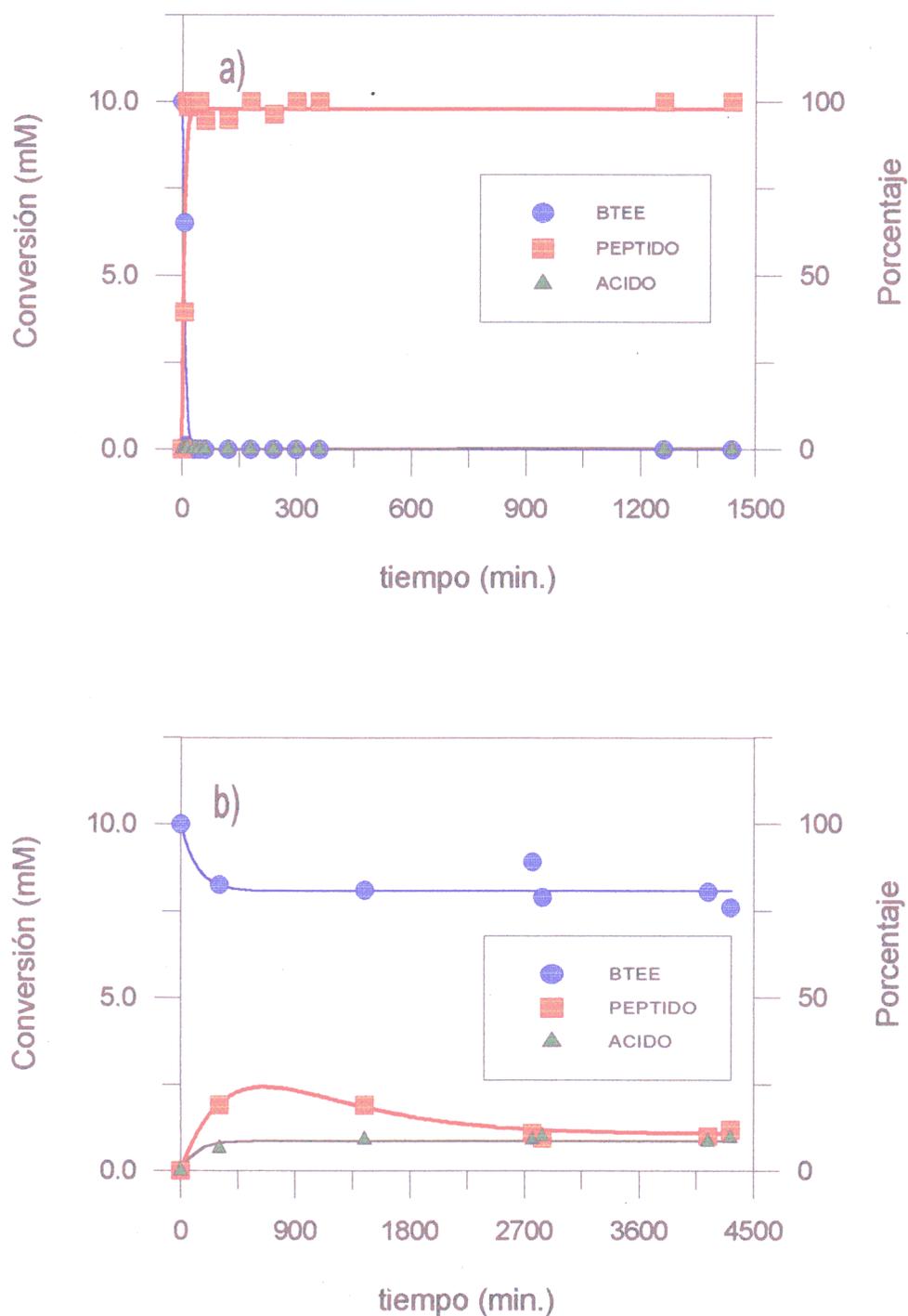


Figura 40.- Influencia del naturaleza del disolvente en la síntesis del dipéptido modelo Bz-*L*-Tyr-*L*-Leu-NH₂, empleando el derivado C1-CT (2.75 mg de derivado/ml equivalentes a 0.24 mg de enzima/ml), en un medio 99/1 (v/v) disolvente orgánico/Tris pH=9.0, 0.1 M. a) 1,1,1-Tricloroetano; b) acetato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

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

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

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

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

^c No ensayadas.

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

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

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

Claramente el disolvente con mejores rendimientos fue el 1,1,1-tricloroetano, el cual posee el valor de $\log P$ más elevado. Mientras que los disolventes con $\log P < 0$, captan todo el agua añadida al medio (1-3)% y además deshidratan a la enzima desactivandola. Por ello, el 1,1,1-tricloroetano que rechaza el agua permite que la enzima este recubierta de su capa de hidratación y por lo tanto sea activa. Por la misma razón, el AcOEt será el segundo disolvente a considerar. Tanto el 1,1,1-tricloroetano como el AcOEt no interaccionan con la enzima libre ni inmovilizada, por ello, permiten que ésta adopte la conformación más activa dentro de su microentorno acuoso y de reacción.

Este resultado está de acuerdo con los datos presentes en la bibliografía, donde se indica cómo el disolvente más apolar es el menos perjudicial (260). No obstante, este disolvente

presenta el inconveniente de la baja solubilidad del donador de acilo en las condiciones de reacción.

Por el contrario, no se consiguió sintetizar dipéptido empleando 1,4-butanodiol ni N,N-dimetilformamida como disolventes, resultados que atribuimos a la elevada hidrofilia que presentan ambos disolventes, con lo cual capturan las pocas moléculas de agua presentes en el medio, evitando que la enzima adquiera *la monocapa de hidratación* que le proporcione la conformación activa para poder llevar a cabo la reacción de síntesis de péptidos (Introducción, **Sección I.4.3.5**).

Por otro lado, empleando disolventes inmiscibles (1,1,1-tricloroetano y acetato de etilo) se observa en ambos casos la formación de un precipitado blanco, cuando el rendimiento a péptido es aproximadamente del 70% lo cual facilita su purificación, y se detecta una baja concentración de ácido a lo largo de toda la reacción sin que aparezca la actividad amidásica. Este cambio en el aspecto del reactor nos indicó que el péptido se extraía del medio de reacción precipitando en la fase orgánica sin sufrir ninguna alteración. Pensando en un sencillo proceso de purificación del dipéptido precipitado (ver Parte Experimental), nos inclinaremos por emplear los sistemas bifásicos (1,1,1-tricloroetano/Tris pH=9.0, 0.1 M y AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M) que también han reportado buenos resultados a otros autores (247).

IV.1.5.4.- Influencia del porcentaje de fase acuosa en el medio de reacción empleado en la síntesis de péptidos

Es de sobra conocido (171-173, 249b), que la proporción de fase acuosa presente en sistemas bifásicos es un factor fundamental en la actividad del catalizador. No obstante, esta cantidad de agua no tiene por que estar directamente relacionada con el agua que rodea al microentorno de la enzima inmovilizada, ya que compiten disolvente, soporte y enzima por retener el agua del medio (Introducción, **Sección I.4.3.5**). Por este motivo y según los resultados anteriores, es lógico plantear un estudio con los diferentes derivados variando la proporción de agua en el reactor. Los resultados aparecen recogidos en las **Figuras 41 a 46** y resumidos en las **Tablas 25 a 29**.

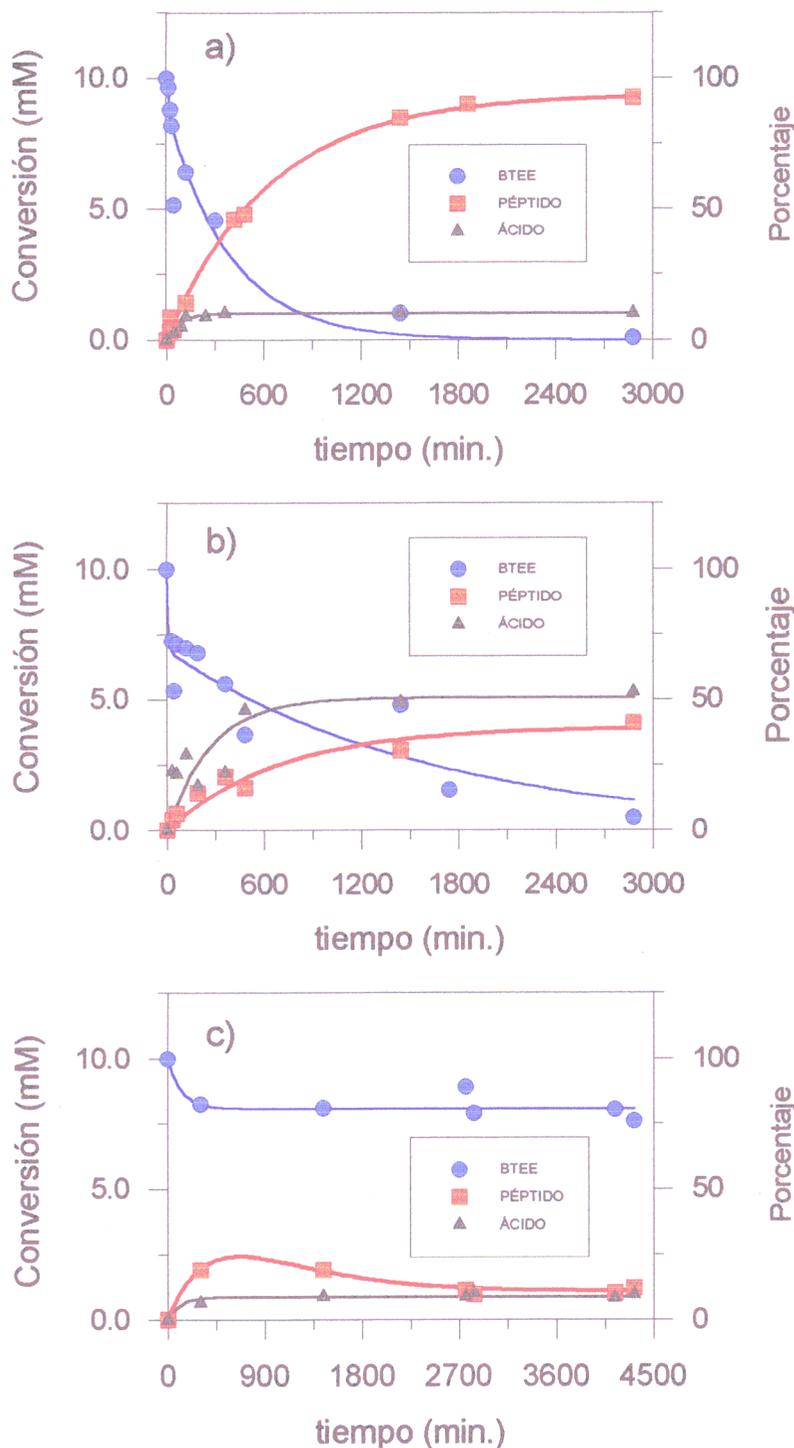


Figura 41.- Síntesis del dipéptido Bz-*L*-Tyr-*L*-Leu-NH₂ empleando el derivado C1-CT (2.75 mg de derivado/ml equivalentes a 0.24 mg de enzima/ml), en un medio AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, a 25 °C de temperatura. a) 2/1; b) 4/1; c) 99/1 (v/v).

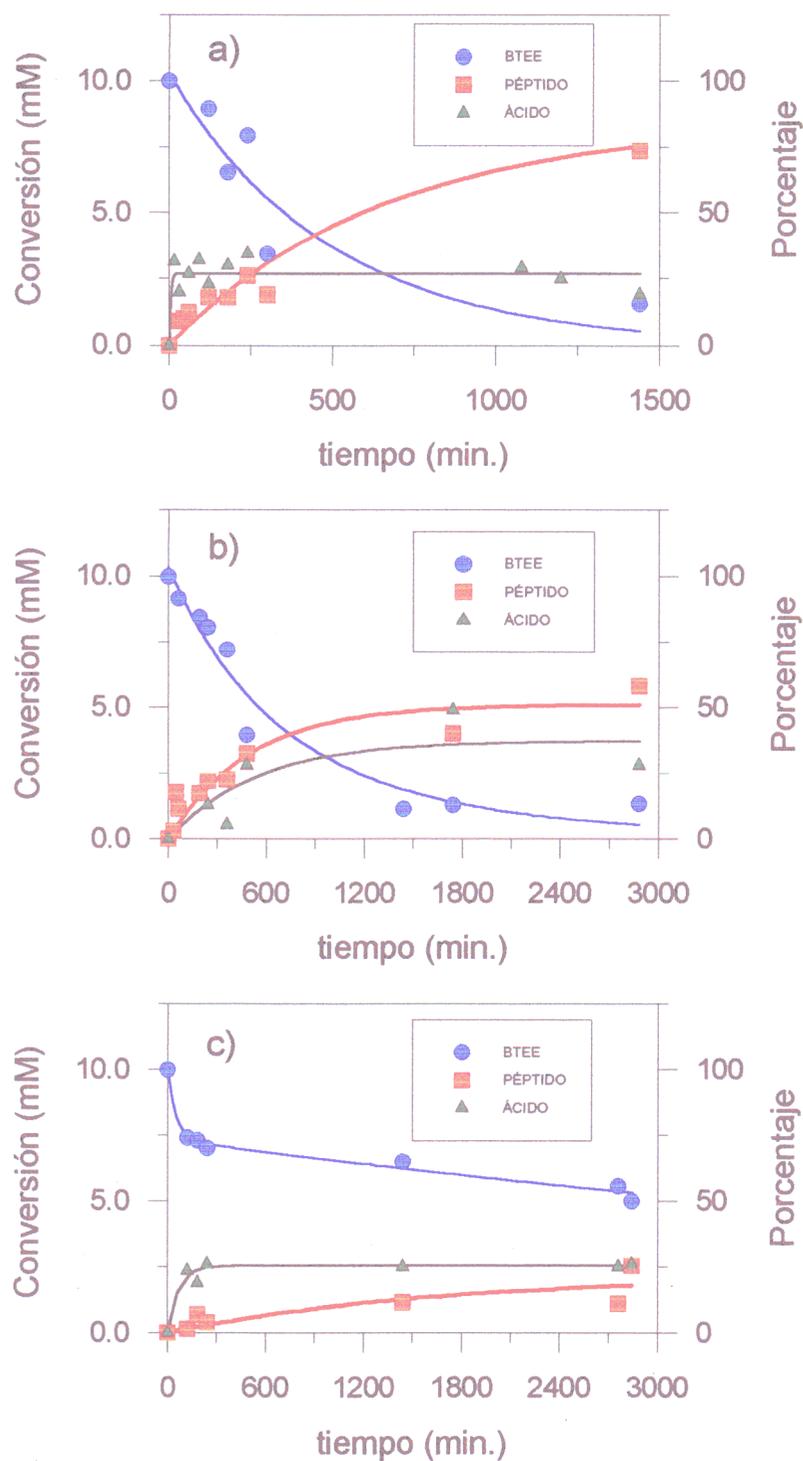


Figura 42.- Síntesis del dipéptido Bz-L-Tyr-L-Leu-NH₂ empleando el derivado C2-CT (7.25 mg de derivado/ml equivalentes a 0.24 mg de enzima/ml), en un medio AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, a 25 °C de temperatura. a) 2/1; b) 4/1; c) 99/1 (v/v).

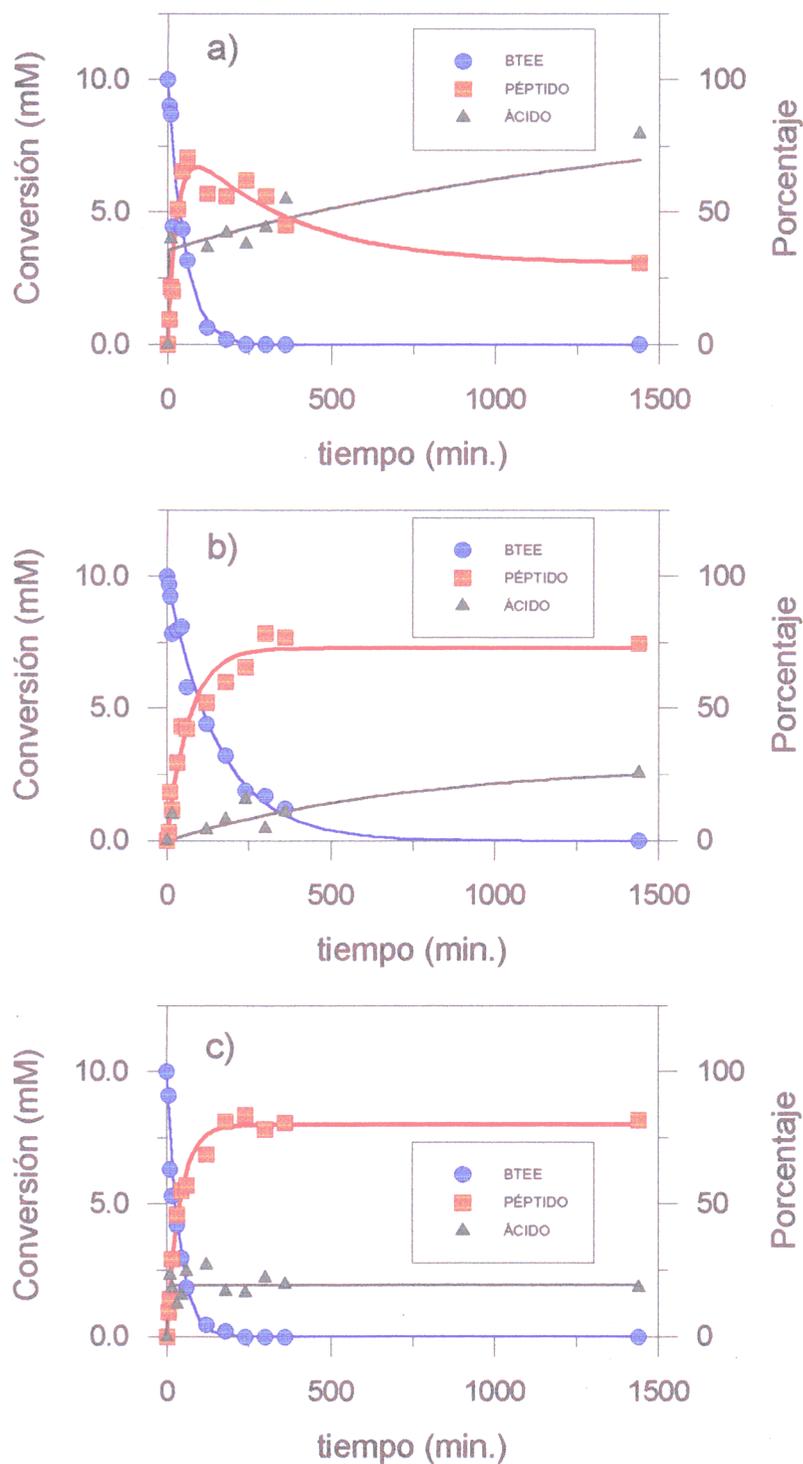


Figura 43.- Síntesis del dipéptido $Bz-L-Tyr-L-Leu-NH_2$, empleando el derivado C3-CT (6.2 mg de derivado/ml equivalentes a 0.24 mg de enzima/ml), en un medio AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, a 25 °C de temperatura. a) 2/1; b) 4/1; c) 99/1 (v/v).

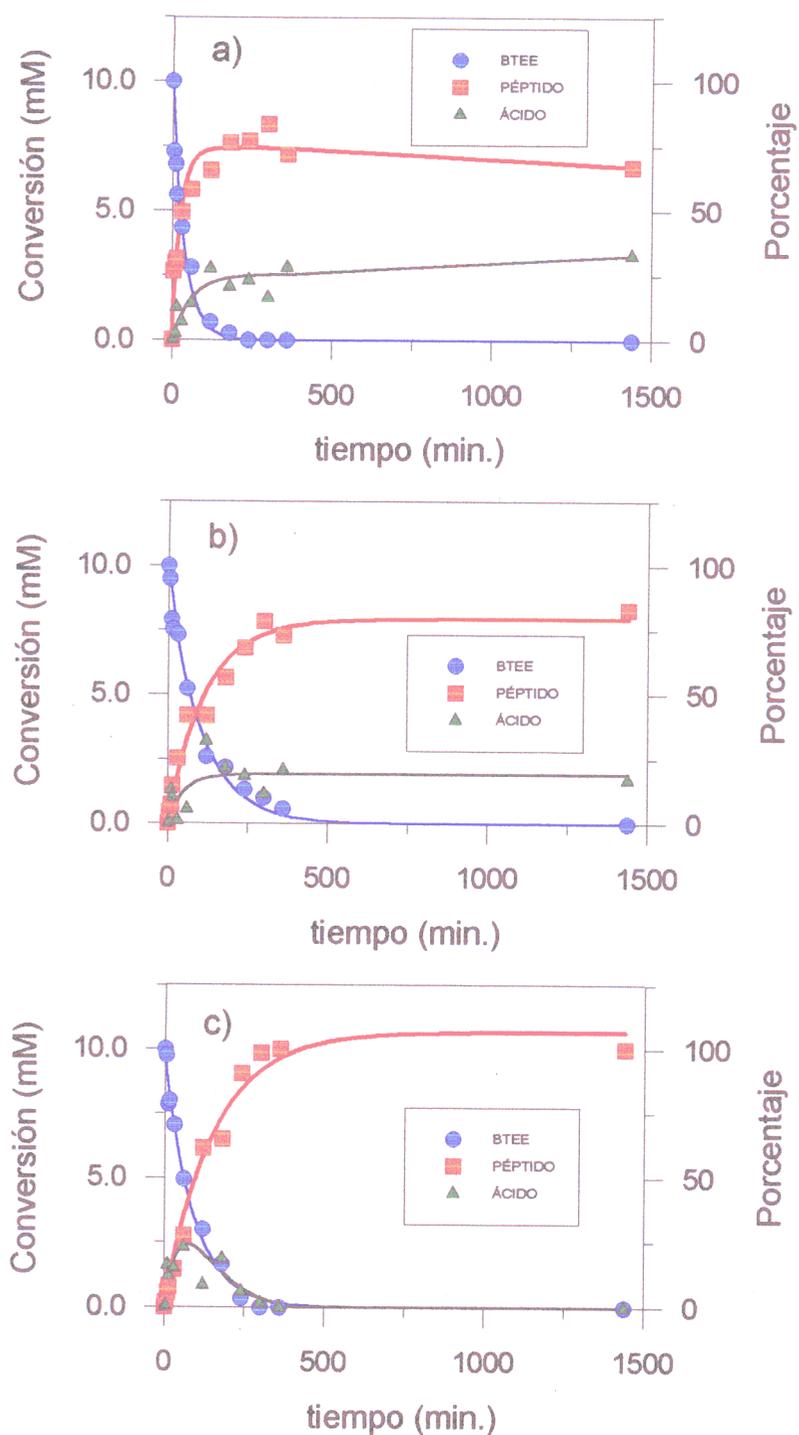


Figura 44.- Síntesis del dipéptido $Bz-L-Tyr-L-Leu-NH_2$ empleando el derivado C4-CT (1.3 mg de derivado/ml equivalentes a 0.24 mg de enzima/ml), en un medio AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, a 25 °C de temperatura. a) 2/1; b) 4/1; c) 99/1 (v/v).

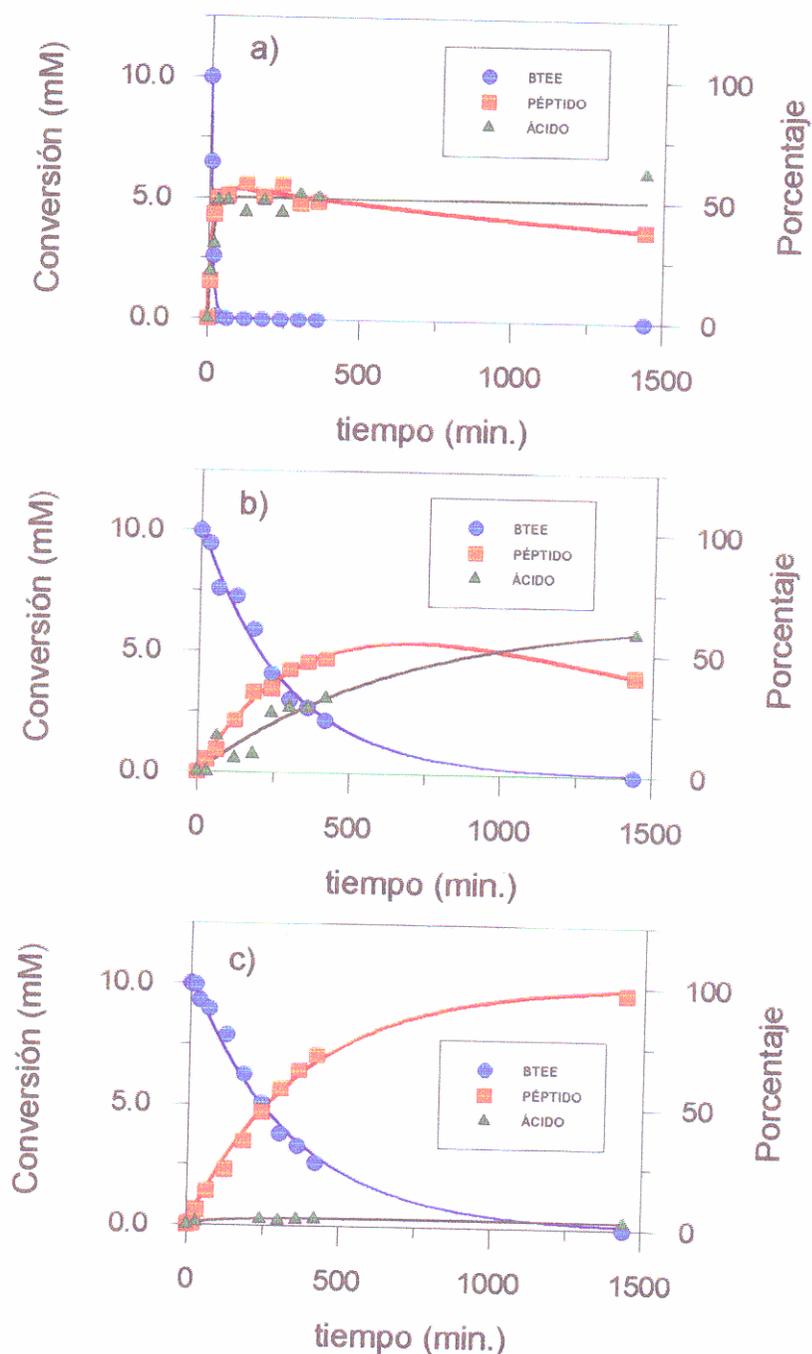


Figura 45.- Síntesis del dipéptido Bz-*L*-Tyr-*L*-Leu-NH₂ empleando el derivado C5-CT (1.3 mg de derivado/ml equivalentes a 0.053 mg de enzima/ml), en un medio AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, a 25 °C de temperatura. a) Tris pH=9.0 0.1 M, saturada con AcOEt; b) 1/1; c) 99/1 (v/v).

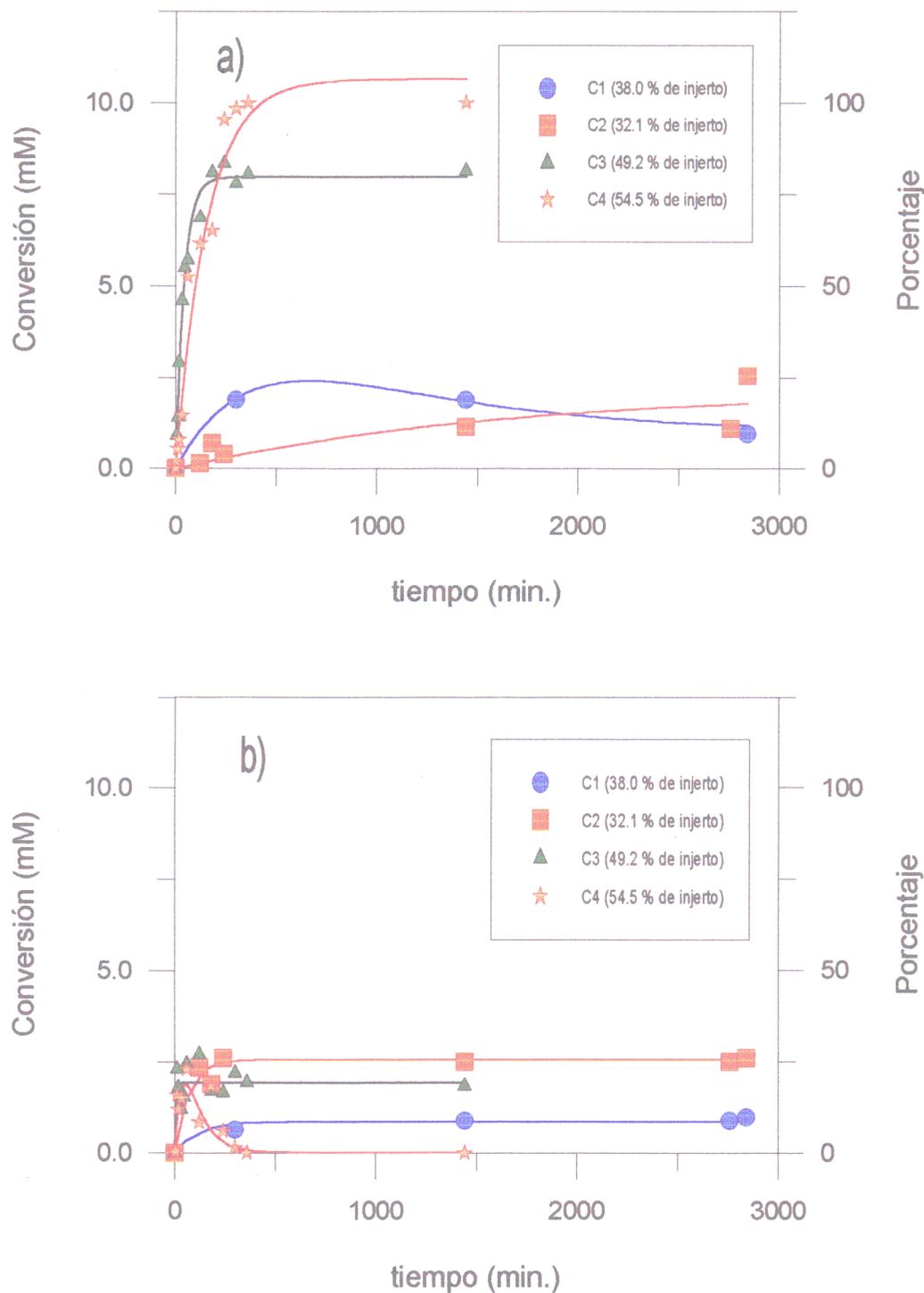


Figura 46.- Influencia del porcentaje de injerto del soporte en la síntesis del dipéptido Bz-L-Tyr-L-Leu-NH₂ empleando como medio de reacción AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 99/1, (v/v) a 25 °C de temperatura. a) Péptido; b) ácido.

Tabla 25.- Síntesis del péptido Bz-L-Tyr-L-Leu-NH₂ con (2.75 mg de derivado C1-CT/ml equivalentes a 0.24 mg de α-quimotripsina/ml), AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, a 25° C de temperatura.

t (h.)	% Péptido	% Ácido	Pép./ác.	V. inicial ^a	Disol./tampón
24	90	10	9.0	0.010	2/1
48	40	50	0.8	0.005	4/1
5	20	5	4.0	0.035	99/1

^a Velocidad inicial de síntesis de péptidos expresada en mM/min.

Tabla 26.- Síntesis del péptido Bz-L-Tyr-L-Leu-NH₂ con (7.75 mg de derivado C2-CT/ml equivalentes a 0.24 mg de α-quimotripsina/ml), AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, a 25° C de temperatura.

t (h.)	% Péptido	% Ácido	Pép./ác.	V. inicial ^a	Disol./tampón
48	84	18	4.7	0.010	2/1
24	52	38	1.4	0.010	4/1
5	18	25	0.7	0.015	99/1

^a Velocidad inicial de síntesis de péptidos expresada en mM/min.

Tabla 27.- Síntesis del péptido Bz-L-Tyr-L-Leu-NH₂ con (6.2 mg de derivado C3-CT/ml equivalentes a 0.24 mg de α-quimotripsina/ml), en AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M a 25° C de temperatura.

t (h.)	% Péptido	% Ácido	Pép./ác.	V. inicial ^a	Disol./tampón
1	70	15	4.7	0.23	2/1
6	77	11	7.0	0.11	4/1
6	81	19	4.3	0.20	99/1

^a Velocidad inicial de síntesis de péptidos expresada en mM/min.

Tabla 28.- Síntesis del péptido Bz-L-Tyr-L-Leu-NH₂ con (1.3 mg de derivado C4-CT/ml equivalentes a 0.24 mg de α -quimotripsina/ml, en AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M a 25° C de temperatura.

t (h.)	% Péptido	% Ácido	Pép./ác.	V. inicial ^a	Disol./tampón
5	84	16	5.3	0.28	2/1
6	83	17	5.3	0.07	4/1
8	99	1	99.0	0.09	99/1

^a Velocidad inicial de síntesis de péptidos expresada en mM/min.

Tabla 29.- Síntesis del péptido Bz-L-Tyr-L-Leu-NH₂ con (1.3 mg de derivado C5-CT/ml equivalentes a 0.053 mg de α -quimotripsina/ml, en AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M a 25° C de temperatura.

t (h.)	% Péptido	% Ácido	Pép./ác.	V. inicial ^a	Disol./tampón
2	52	48	1.1	0.470	Tris saturado ^b
10	58	35	1.7	0.040	1/1
24	95	3	31.7	0.025	99/1

^a Velocidad inicial de síntesis de péptidos expresada en mM/min.

^b Tris pH=9.0, 0.1 M saturado con acetato de etilo.

Como cabía esperar, la proporción óptima de disolventes varía según la naturaleza del soporte y la carga enzimática.

El primer efecto evidente que debe comentarse es el hecho de que al aumentar el porcentaje de injerto, los derivados son más activos (mayor relación péptido/ácido) en medios con menor cantidad de agua, 99/1, (v/v). Por el contrario, cuanto menor es el porcentaje de injerto, el derivado se muestra más activo en un medio eminentemente acuoso (C1-CT, **Tabla 25**). Así, derivados con poco grado de injerto (C1-CT y C2-CT 38.0% y 32.2% respectivamente (**Tabla 16**), referido a la masa total de soporte) requieren grandes cantidades de medio acuoso (2/1) para proporcionarnos una buena relación péptido/ácido, mientras que

con los derivados C4-CT y C5-CT (54.5% de injerto, referido a la masa total de soporte) ocurre lo contrario (mejor medio 99/1). El derivado C3-CT (49.2% de injerto, referido a la masa total de soporte) se encuentra en una posición intermedia, donde la proporción más interesante es 4/1, (v/v) AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M.

Estos hechos indican claramente como derivados más hidrófilos requieren menos cantidad de agua para llevar a cabo la síntesis peptídica puesto que el microentorno enzimático será más favorable, y necesitaremos menos cantidad de agua en el macroentorno. Por tanto, la competencia entre el sistema enzima-soporte y el disolvente por captar agua se inclina más fácilmente hacia el primer término en aquellos derivados con elevado porcentaje de injerto.

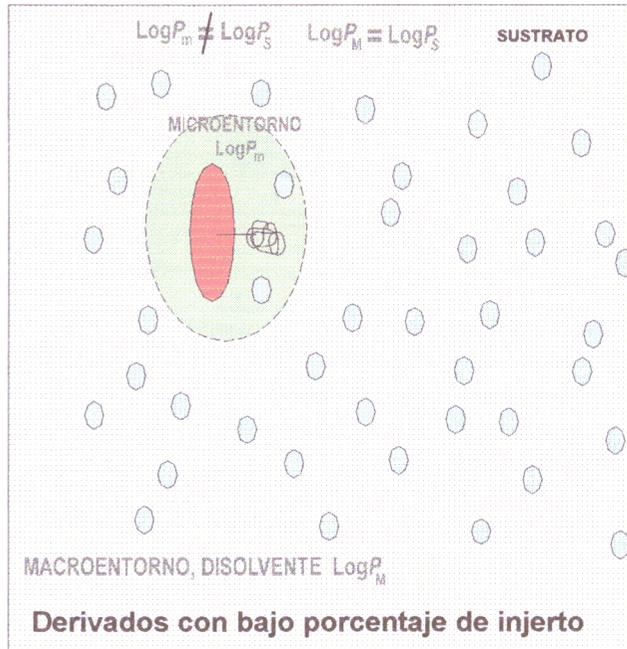
Muchos autores (242), han observado la existencia de problemas de transferencia de masa en sistemas líquido-sólido, especialmente cuando los reactivos y la matriz del soporte difieren mucho en hidrofobicidad. Este hecho fue estudiado por Fukui y cols (220, 221), los cuales llevaron a cabo la inmovilización de biocatalizadores en geles obtenidos por fotopolimerización de resinas y macromoléculas de uretano, tal y como indicamos en la introducción teórica (Sección I.4.4.2) variando la relación entre moléculas de fragmentos hidrofóbicos e hidrofílicos, alterando así las características de los geles hasta encontrar una relación óptima hidrofilia/hidrofobia entre los sustratos y el gel, solucionando los problemas de transferencia de masa. Para minimizar los problemas de transferencia de masa anteriormente citados Mattiasson y cols (159) postulan que la velocidad de reacción en sistemas biocatalizados que contienen una interfase puede ser optimizada según estas reglas:

- 1.- $|\log P_M - \log P_S|$ debe ser máximo.
- 2.- $|\log P_m - \log P_s|$ debe ser mínimo.

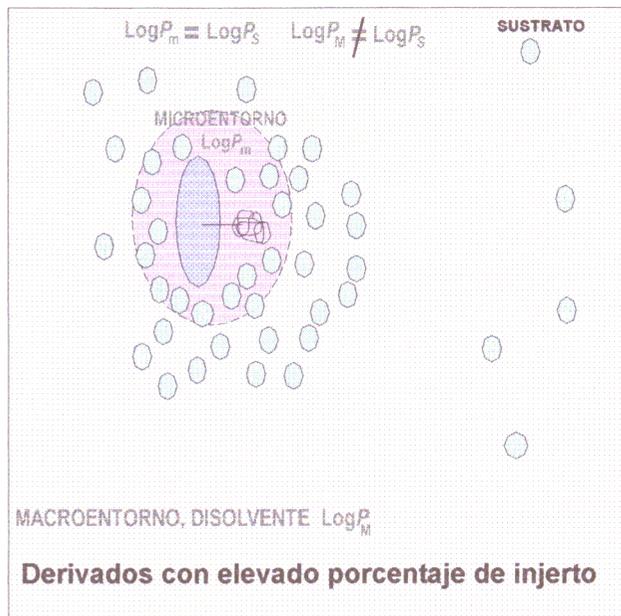
donde $\log P_M$, $\log P_m$ y $\log P_S$ representan, respectivamente, los coeficientes de reparto del macroentorno ("bulk phase"), del microentorno o interfase en el que se encuentra el biocatalizador, y el del sustrato (Esquema 31).

En el caso de los dos derivados con igual porcentaje de injerto C4-CT y C5-CT (Fig. 44 y 45), tenemos que el derivado con más carga enzimática (C4-CT) conduce a mayores conversiones en péptido y sobre todo a mejores relaciones péptido/ácido.

a)



b)



Esquema 31.- Influencia del coeficiente de reparto de los sustratos, del microentorno del derivado y del macroentorno en las reacciones de síntesis peptídica. a) $\log P_m \neq \log P_s$, derivados con bajo porcentaje de injerto b) $\log P_m \approx \log P_s$, derivados con elevado porcentaje de injerto

En nuestro caso, a la luz de los resultados recogidos en las **Figuras 44 y 45** se observa un aumento de la velocidad inicial de síntesis con el incremento del porcentaje de medio acuoso, 2/1 vs 99/1, (v/v). Este hecho ha sido recogido en la bibliografía (159) para el caso de la α -quimotripsina adsorbida sobre celite empleando acetonitrilo como disolvente y se explica en función de la hidratación de la enzima inmovilizada.

Para una mejor visualización de los resultados se han representado en la **Figura 46** las curvas de progreso para la reacción estándar de síntesis, empleando un medio 99/1 (v/v) AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, obtenidas para los diferentes derivados. Como puede verse los derivados con mayor porcentaje de injerto conducen a un mayor rendimiento en péptido.

IV.1.5.5.- Influencia de la temperatura en los procesos de síntesis peptídica

A fin de estudiar la influencia de la temperatura en nuestros procesos de síntesis peptídica, se llevaron a cabo ensayos a diferentes temperaturas; 4, 25 y 37 °C, con el derivado C4-CT y siguiendo el esquema general de síntesis descrito en la Parte Experimental (**Sección III.6.4.5**), en las condiciones más interesantes desde el punto de vista sintético para este derivado AcOEt/(Tris pH=9.0, 0.1 M en proporciones 99/1, (v/v). Los resultados aparecen reflejados en la **Figura 47**.

El rendimiento final, cercano al 100% obtenido a 4 °C y a 25 °C es similar aunque la velocidad de síntesis es mucho menor para la reacción a 4 °C, como puede observarse en la **Figura 47**. Es de sobra conocido que un incremento moderado de la temperatura origina un aumento en las velocidades de reacción (137, 261).

Cuando la reacción se llevo a cabo a una temperatura de 37 °C, el rendimiento final en péptido resultó ser menor. Este hecho confirma la desactivación observada de los derivados a esta temperatura, (**Sección IV.2.2**). Este resultado concuerda con la importancia actual de la "crioenzimología" (161-163), metodología que minimiza estos problemas de desactivación enzimática por la temperatura y permite obtener buenas relaciones péptido/ácido a temperaturas inferiores a 0 °C.

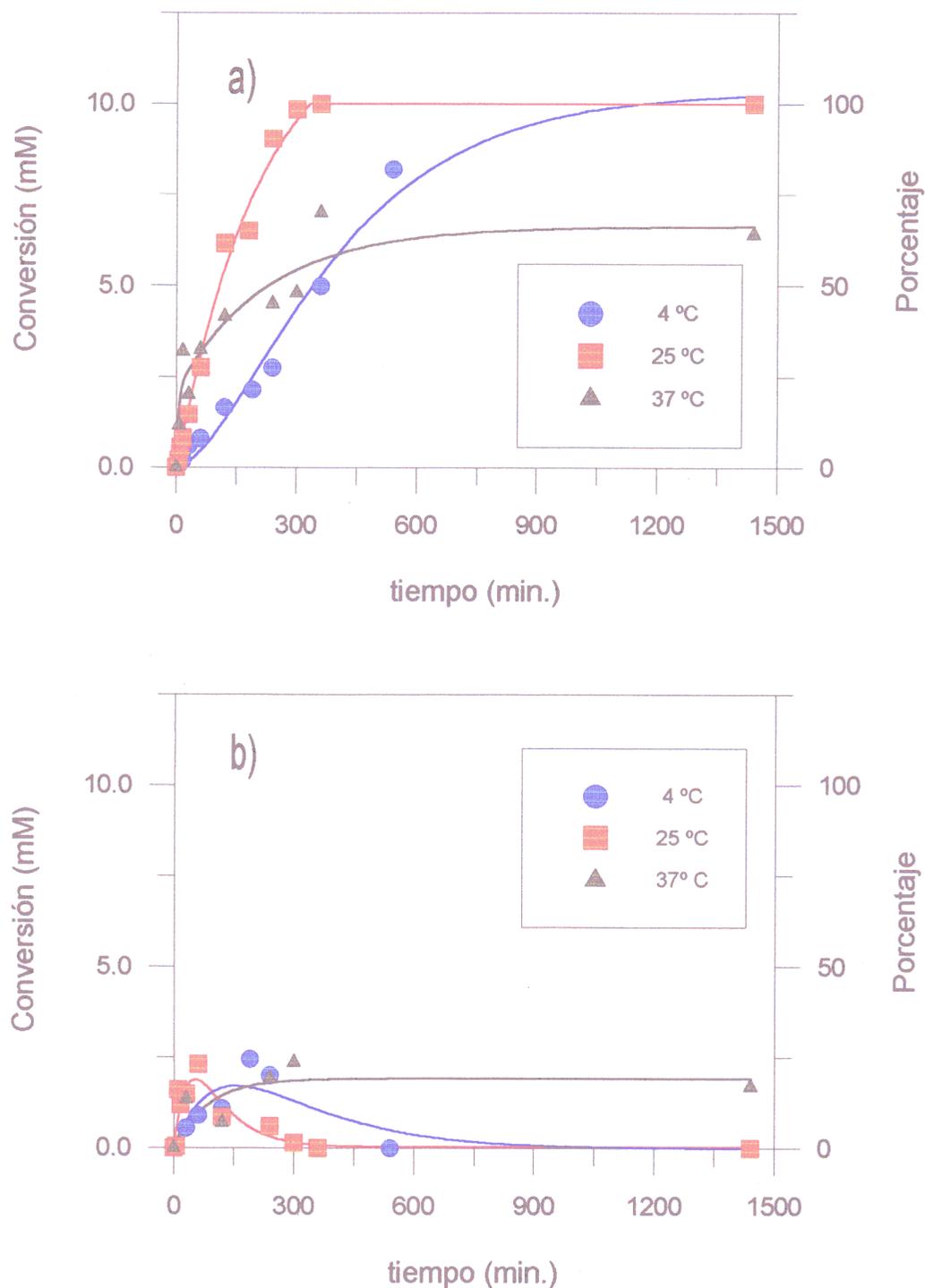


Figura 47.- Influencia de la temperatura en la síntesis del dipéptido modelo Bz-*L*-Tyr-*L*-Leu-NH₂ empleando el derivado C4-CT (1.3 mg de derivado/ml equivalentes a 0.24 mg de enzima/ml) y como medio de reacción AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 99/1, (v/v). a) Péptido; b) ácido.

El soporte parece influir en este tipo de experimentos de forma decisiva ya que tal y como se ha descrito en la bibliografía (233), cuando se llevan a cabo reacciones de esterificación (entre Ac-*L*-Trp-OH y feniletanol) con derivados de α -quimotripsina sobre geles de agarosa en el intervalo de temperaturas comprendido entre 18 y 38°C, se produce un incremento paulatino de la velocidad inicial de síntesis de forma opuesta a lo que sucede en el caso de nuestros derivados inmovilizados sobre copolímeros de injerto.

IV.1.5.6.- Influencia de la concentración de donador de acilo

La variación de la concentración de donador de acilo (desde 5 hasta 20 mM) en la síntesis de péptidos catalizada por el derivado C5-CT debería seguir un comportamiento michaeliano, como cabría esperar cuando la concentración de BTEE, se encuentra siempre en defecto con respecto a la de nucleófilo (40 mM). En la **Figura 48** aparece representada dicha variación.

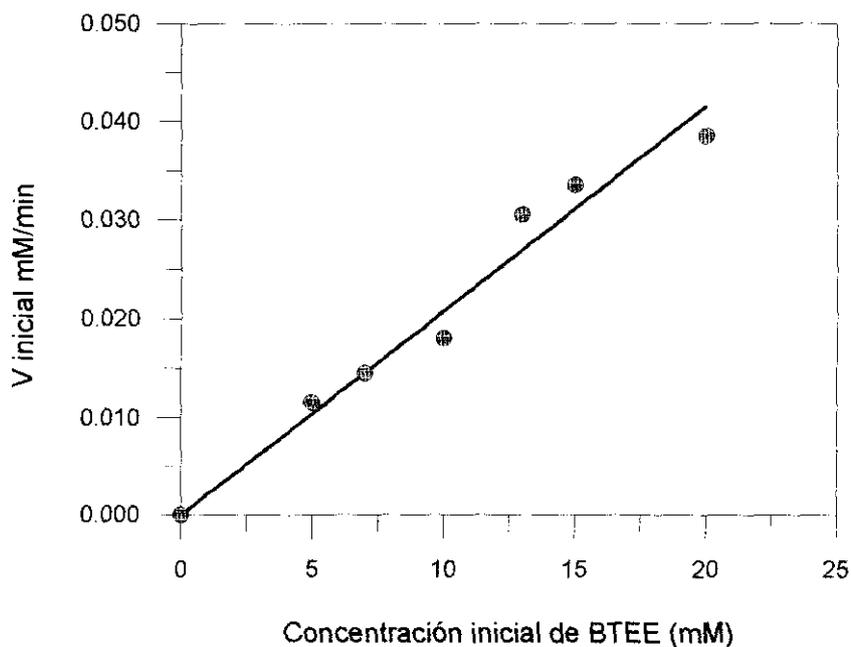


Figura 48.- Variación de la velocidad inicial de síntesis del dipéptido Bz-*L*-Tyr-*L*-Leu-NH₂, en función de la concentración de donador de acilo empleando el derivado C5-CT (1.3 mg de derivado/ml equivalentes a 0.053 mg de enzima/ml) como medio AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 97/3, (v/v) y 40 mM de *L*-leucinamida.

Los datos se ajustan perfectamente a una recta que pasa por el origen de pendiente $(2,1 \pm 0.2) \times 10^{-3} \text{ min.}^{-1}$ y $R^2 = 0.991$, lo que nos sitúa en el tramo inicial de una curva michaeliana, indicándonos que la concentración de donador de acilo empleada no satura en ningún momento al catalizador ($S \ll K_m$), con lo cual el aprovechamiento del catalizador es prácticamente óptimo (159).

En este tramo inicial de la curva michaeliana $\text{Pendiente}/[E_0] = k_{\text{cat}}/K_m$, siendo este cociente una medida de la eficacia catalítica de una enzima, en este caso su valor es aproximadamente 1, con lo cual $k_{\text{cat}} \approx K_m$, como en los procesos de hidrólisis **Sección IV.1.4.1.**

Otros autores empleando como donador de acilo (*Z-L-Phe-OMe*) en procesos de síntesis de péptidos utilizando acetato de etilo saturado con agua y α -quimotripsina inmovilizada sobre celite como catalizador (2.25 mg de enzima/ml) han obtenido resultados similares a los nuestros (159) obteniendo valores muy elevados de K_m , aparente.

IV.1.5.7.- Influencia de la concentración de nucleófilo

Para estudiar el efecto de la concentración de nucleófilo y tomando como referencia un trabajo realizado por Jakubke y cols (145) en el cual se estudiaba la eficacia de varios nucleófilos en los procesos de deacilación del complejo acil-enzima ($\text{H-L-Leu-NH}_2 > \text{H-L-Val-NH}_2 > \text{H-D-Leu-NH}_2$), se realizó un estudio similar en el que se varió la concentración de un solo nucleófilo para conocer su influencia a lo largo de todo el proceso sintético.

Así se llevaron a cabo reacciones de síntesis del dipéptido modelo *Bz-L-Tyr-L-Leu-NH₂* en presencia de AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 97/3, (v/v), el derivado empleado fue C5-CT y siguiendo el esquema general de síntesis peptídica (**Sección III.5**). Se varió la concentración de nucleófilo desde 5 hasta 50 mM, manteniendo constante la concentración de donador de acilo BTEE en 10 mM. Los resultados aparecen recogidos en las **Figuras 49, 50 y 51**, mientras que en la **Figura 52** se recogen las velocidades iniciales de formación de péptido a diferentes concentraciones de nucleófilo. Observando estas figuras, se comprueba como aumentando la cantidad de nucleófilo en la reacción, se consigue disminuir la concentración

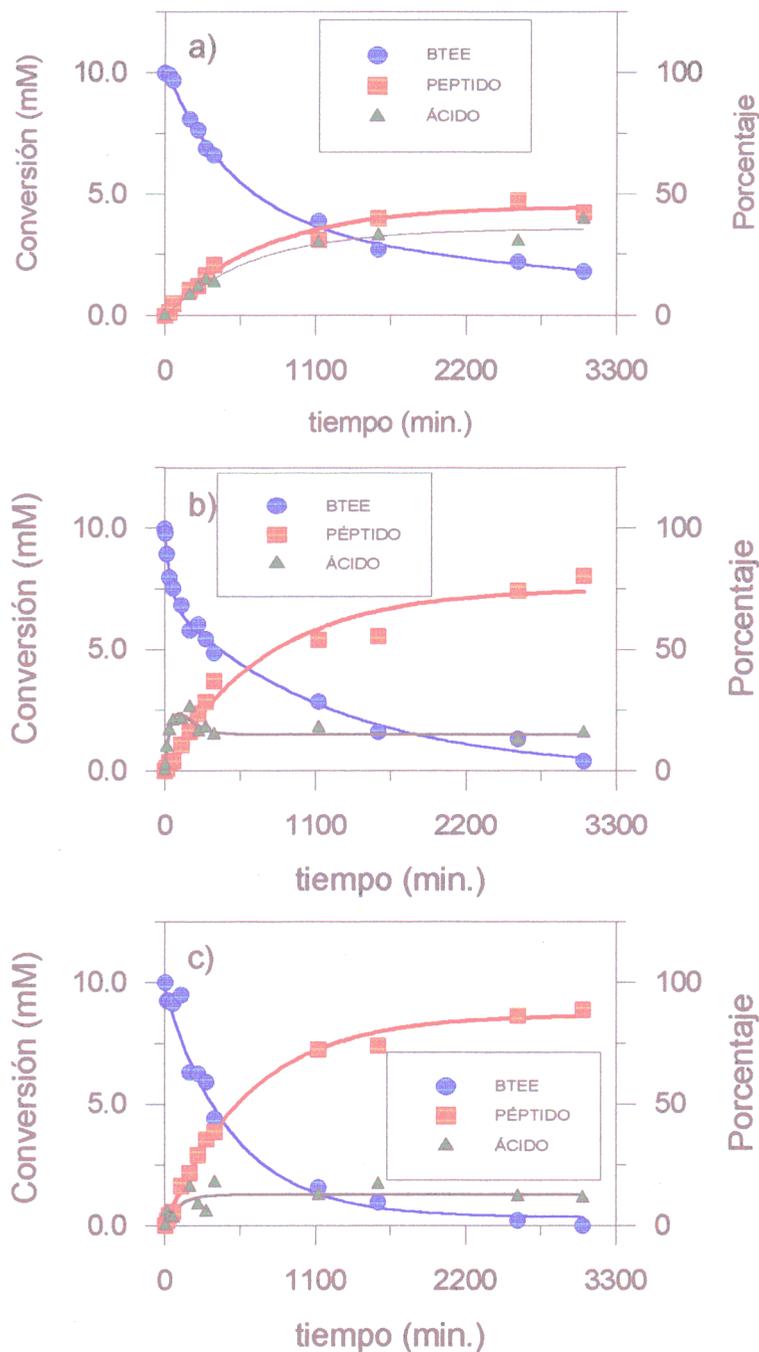


Figura 49.- Influencia de la concentración de nucleófilo ($H-L-Leu-NH_2$) en la síntesis del dipéptido modelo $Bz-L-Tyr-L-Leu-NH_2$ empleando BTEE (10 mM) como donador de acilo, como catalizador, el derivado C5-CT (1.3 mg de derivado/ml equivalentes a 0.053 mg de enzima/ml) y como medio de reacción AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 97/3, (v/v). a) 5 mM b) 10 mM y c) 15 mM.

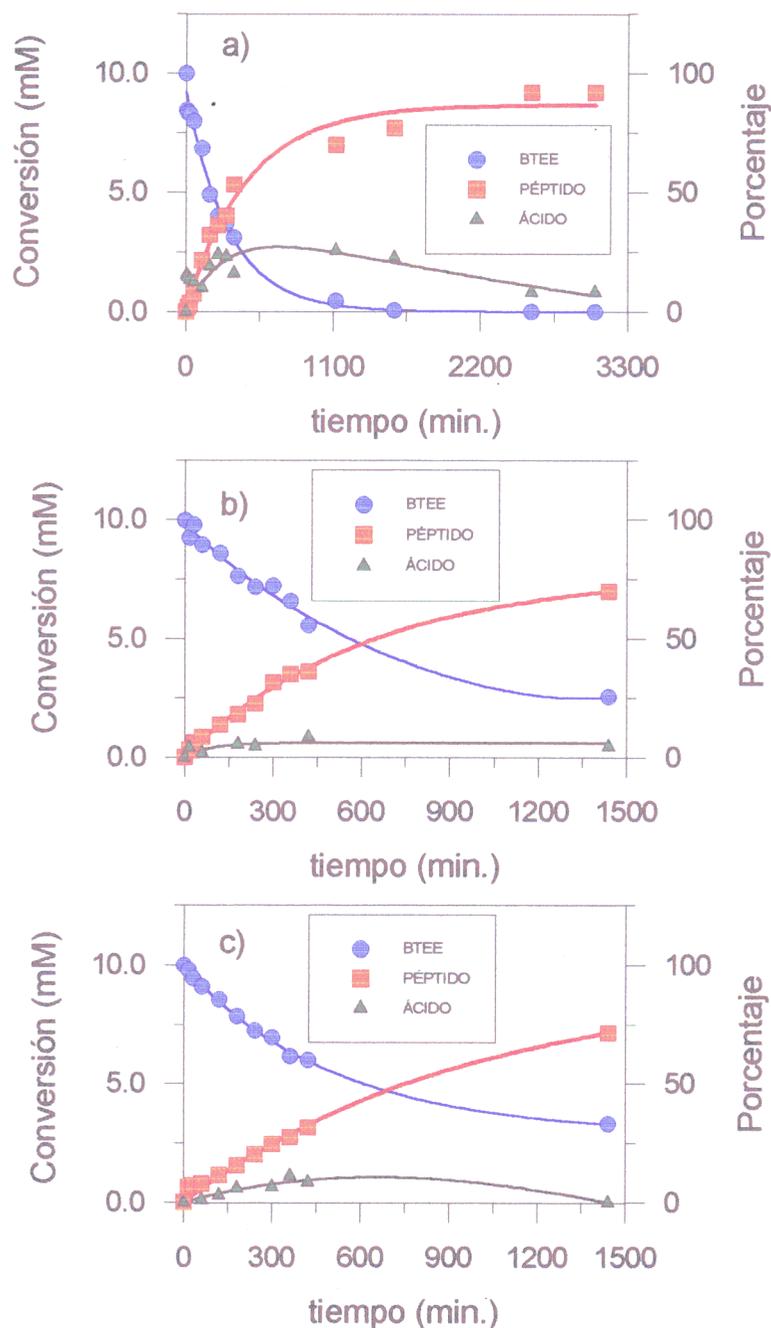


Figura 50.- Influencia de la concentración de nucleófilo ($H\text{-}L\text{-Leu-NH}_2$) en la síntesis del dipéptido modelo $Bz\text{-}L\text{-Tyr-L-Leu-NH}_2$, empleando BTEE (10 mM) como donador de acilo, como catalizador, el derivado C5-CT (1.3 mg de derivado/ml equivalentes a 0.053 mg de enzima/ml) y como medio de reacción AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 97/3, (v/v). a) 20 mM b) 25 mM y c) 30 mM.

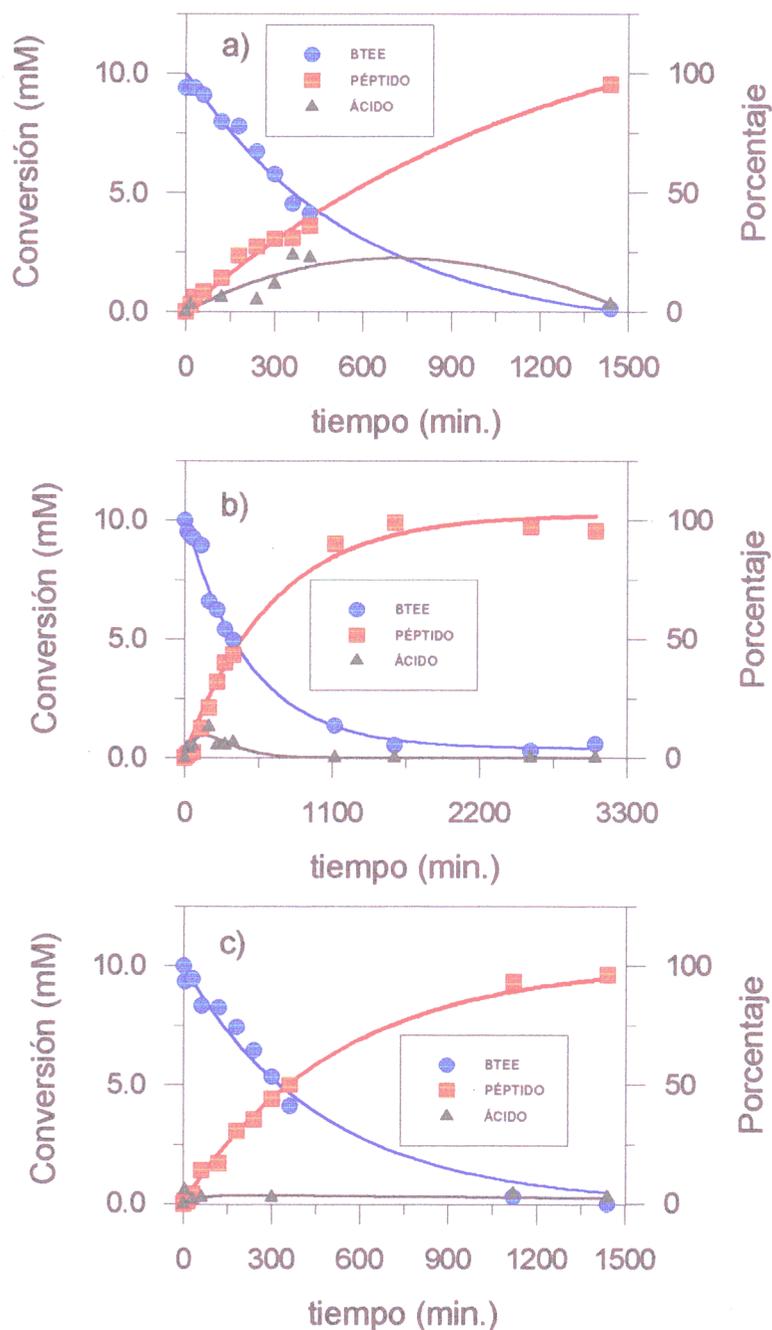


Figura 51.- Influencia de la concentración de nucleófilo ($H-L\text{-Leu-NH}_2$) en la síntesis del dipéptido modelo $Bz-L\text{-Tyr-L-Leu-NH}_2$ empleando BTEE (10 mM) como donador de acilo, como catalizador, el derivado C5-CT (1.3 mg de derivado/ml equivalentes a 0.053 mg de enzima/ml) y como medio de reacción AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 97/3, (v/v). a) 35 mM b) 40 mM y c) 50 mM.

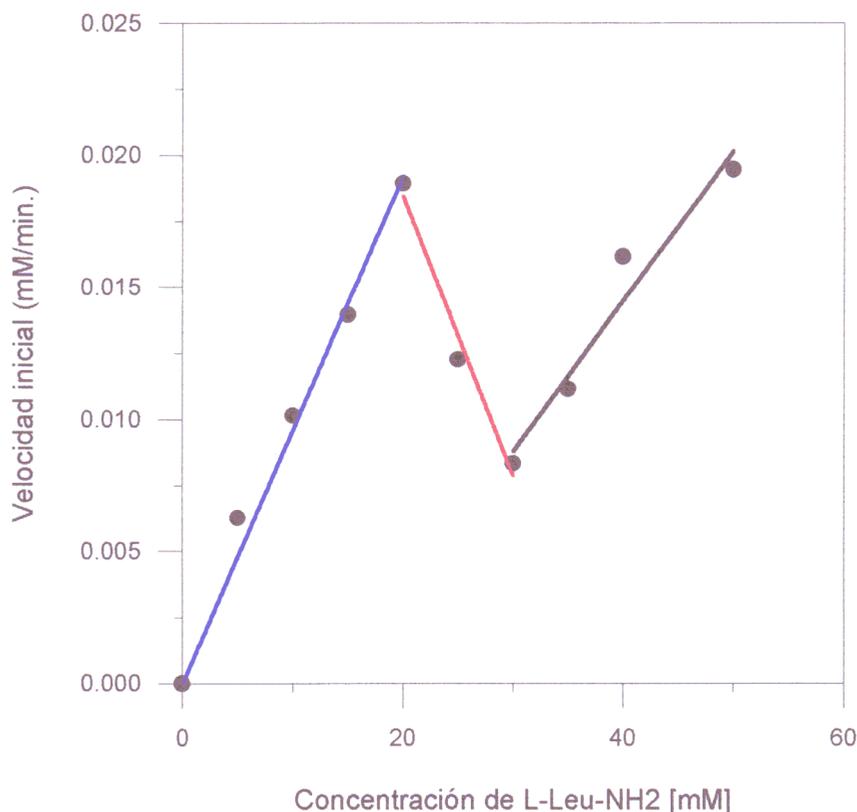


Figura 52.- Variación de la velocidad inicial de síntesis del dipéptido Bz-*L*-Tyr-*L*-Leu-NH₂, en función de la concentración de nucleófilo empleando el derivado C5-CT (1.3 mg de derivado/ml equivalentes a 0.053 mg de enzima/ml) como medio AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 97/3, (v/v) y 10 mM de BTEE.

final de ácido. Este resultado está indicando la existencia de dos tipos de reacciones: una principal, bajo control cinético, y otra que se manifiesta cuando la reacción está muy avanzada, hecho que podría atribuirse a la reacción de síntesis de péptidos termodinámicamente controlada, esto es, aquella que conduce al péptido por reacción directa del ácido con el nucleófilo (**Figura 9, Sección I.4.2**).

Como puede observarse, se produce una total desaparición de BTEE para 20, 40 y 50 mM de *L*-leucinamida, mientras que para 25 y 30 mM de *L*-leu-NH₂ existe una cantidad de BTEE remanente al tiempo final de reacción, lo que nos hizo pensar en la existencia de procesos dependientes de la concentración de nucleófilo, hecho que queda reflejado en la **Figura 52**, donde se pueden distinguir 3 tramos bien diferenciados:

1) Para las concentraciones bajas de nucleófilo comprendidas entre 0 y 20 mM, puede observarse como se aumenta la velocidad inicial de síntesis de péptido al incrementarse la concentración de nucleófilo, hecho lógico, teniendo en cuenta el carácter hidrofóbico que el soporte induce en el microentorno enzimático, que hace necesaria una elevada concentración de nucleófilo polar en el macroentorno para disponer de una óptima concentración del mismo en las cercanías de la enzima. Por tanto, consideramos que el paso lento de la velocidad de reacción, en este sistema, será la desacilación por el nucleófilo del complejo acil-enzima.

2) Desde 20 mM hasta 30 mM se produce el efecto contrario, actuando el nucleófilo como inhibidor, impidiendo la desaparición total de BTEE al finalizar la reacción (comparar Figuras 49a y 49b con 50b y 50c). Este hecho puede atribuirse a una ocupación competitiva del centro de reconocimiento del sustrato donador de acilo (ρ_2) por el exceso de nucleófilo presente en el medio, puesto que la α -quimotripsina es capaz de aceptar ésteres y/o amidas de leucina como agentes acilantes (133, 252).

3) A partir de 30 mM, el microentorno del derivado ya se encontraría saturado por la *L*-leucinamida; sin embargo, se produce un aumento en la velocidad inicial de síntesis peptídica, posiblemente debido a existencia de procesos de control termodinámico que se acentúan con elevadas proporciones de medio orgánico 97/3, (v/v) AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M y altas concentraciones de uno de sustratos (Sección I.4.2.2). Puesto que estamos estudiando velocidades iniciales de síntesis de péptidos, hemos de concluir que estos procesos de síntesis termodinámica se producen simultáneamente con los procesos de síntesis cinéticamente controlada ya desde el inicio de la reacción para estas elevadas concentraciones de nucleófilo, como se refleja en la Figura 51c, donde se observa ya que desde el comienzo de la reacción no se detecta la presencia de ácido.

Volviendo a las especificaciones de Jakubke y cols, los cuales, después de varios tratamientos matemáticos, llegaron a la siguiente expresión (145):

$$\frac{[\text{ácido}]}{[\text{péptido}]} = \frac{\ln \frac{N}{N - [\text{péptido}]}}{[\text{péptido}]} * \rho_0 + \rho_N$$

donde si representásemos la relación $[\text{ácido}]/[\text{péptido}]$ en función del $\ln(N/(N-$

[péptido])/[péptido] obtendríamos una recta, siempre teniendo en cuenta las consideraciones hechas por estos autores entre las que no aparece la existencia de un proceso termodinámico.

Por lo tanto, no es de extrañar que nuestros resultados no se ajustaran a una recta, lo que hace inservible este método para el cálculo del coeficiente de partición

IV.1.6.- REACCIONES DE SÍNTESIS DE PÉPTIDOS TERMODINÁMICAMENTE CONTROLADAS

A fin de comprobar nuestras hipótesis acerca de la presencia en ciertos casos de procesos de síntesis peptídica bajo control termodinámico, se realizó un ensayo en el cual se utilizó únicamente como donador de acilo Ac-L-Tyr-OH (10 mM), con una elevada concentración de nucleófilo (H-L-Leu-NH₂ (50 mM) para favorecer la aparición de dicho proceso sintético, en condiciones experimentales similares a los descritos en el apartado anterior. El resultado aparece recogido en la **Figura 53**, donde puede comprobarse como se

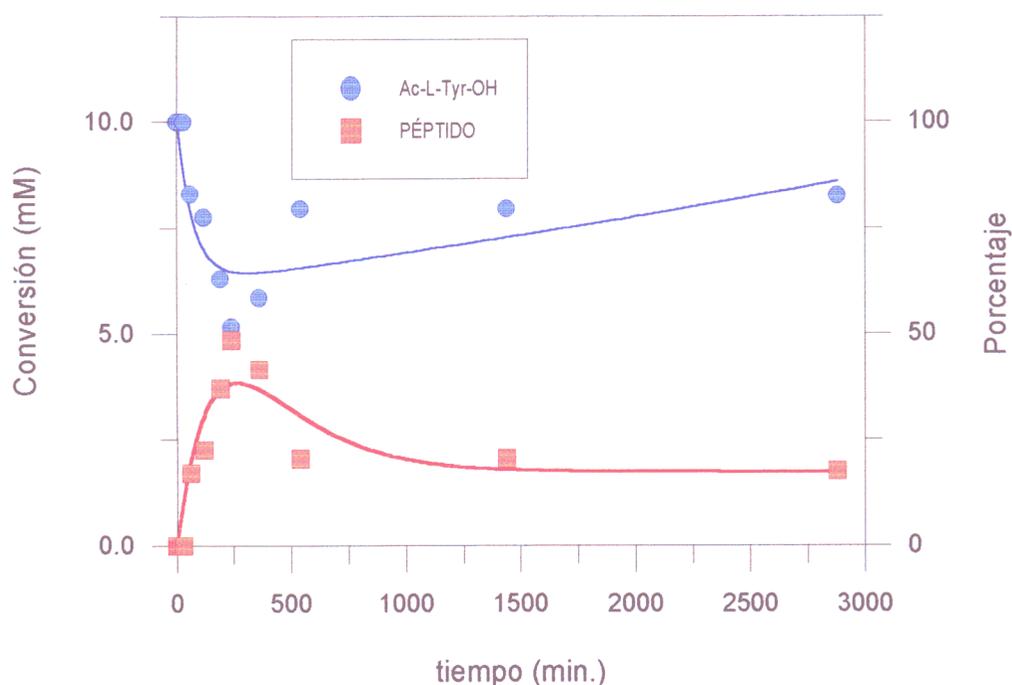


Figura 53.- Síntesis termodinámicamente controlada del dipéptido Ac-L-Tyr-L-Leu-NH₂, empleando, Ac-Tyr-OH (10 mM) como único donador de acilo, 1.3 mg del derivado C4-CT (0.24 mg de enzima/ml), AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 97/3, (v/v) a 25 °C de temperatura.

produce la síntesis del péptido desde el comienzo de la reacción, de manera que aumenta la concentración de péptido con el tiempo hasta un punto a partir del cual podemos decir que se alcanza el equilibrio. Por tanto, se puede concluir que cuando se trabaja con altas concentraciones de nucleófilo y un elevado porcentaje de medio orgánico, se puede producir fenómenos bajo control termodinámico.

Probablemente, no se alcanzó un mayor rendimiento en péptido pues las condiciones experimentales empleadas no son las ideales para llevar a cabo este tipo de procesos como se comentó en la Introducción de esta memoria (Secciones I.4).

IV.1.7.- REACCIONES DE SÍNTESIS DE PÉPTIDOS EN REACTOR DISCONTINUO Y POSTERIOR PURIFICACIÓN DE LOS MISMOS

IV.1.7.1.- Reutilización de los derivados inmovilizados sobre copolímeros de injerto (PE/HEMA).

Un aspecto muy interesante en todo trabajo en biocatálisis aplicada es la posibilidad de reutilizar el biocatalizador después de un ciclo productivo (**Figura 13, Sección I.4.4.2**). Estos ensayos se llevaron a cabo, según se describe en la **Sección III.6.6.1**, empleando una concentración de 0,24 mg de α -quimotripsina/ml y los derivados C1-CT (2.75 mg de derivado/ml), C2-CT (7.25 mg de derivado/ml), utilizando AcOEt/Tris pH=9.0 80/20 (v/v) como medio de reacción, mientras que para el derivado C4-CT (1.3 mg de derivado/ml) las proporciones para llevar a cabo las reacciones de síntesis peptídica fueron (99/1) (v/v), empleando como disolventes acetato de etilo y 1,1,1-tricloroetano. Los resultados obtenidos aparecen en las **Figuras 54, 55, 56 y 57**, recogiéndose en las **Tablas 30, 31, 32 y 33**, los parámetros medidos para cada caso.

Observando los resultados representados en la **Figura 54** con C1-CT puede apreciarse que la peor relación péptido/ácido (**Tabla 30**) se obtiene en la primera utilización del biocatalizador. En la reutilización posterior disminuye de manera drástica el porcentaje de ácido obtenido; este hecho puede explicarse puesto que, al no haber sido liofilizado este derivado inmovilizado previamente a su uso, la enzima debe poseer una elevada proporción

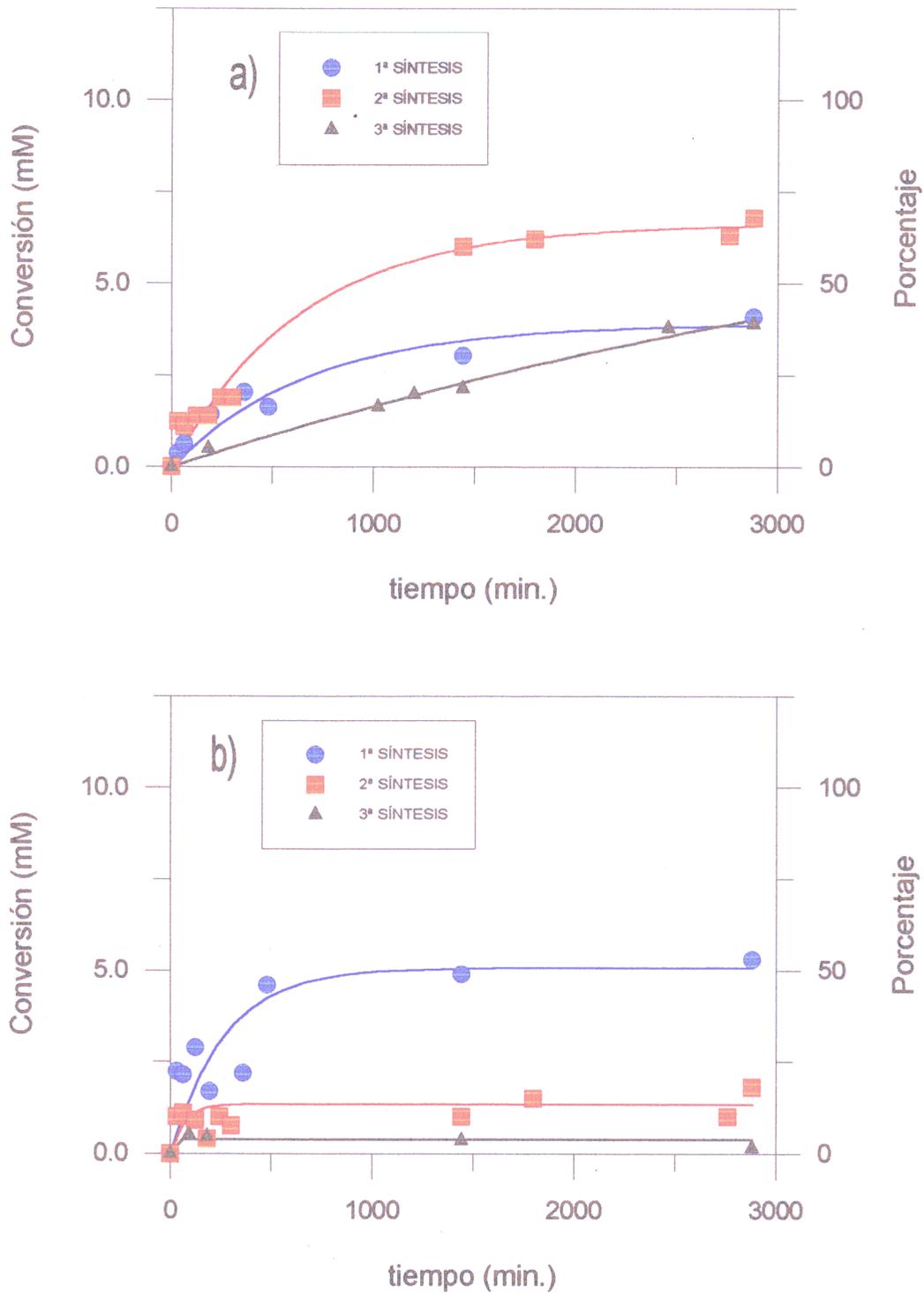


Figura 54.- Reutilización del derivado C1-CT (2.75 mg de derivado/ml equivalentes a 0.24 mg de enzima/ml), empleando como medio de reacción AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 4/1, (v/v), a 25 °C de temperatura. a) Péptido; b) ácido

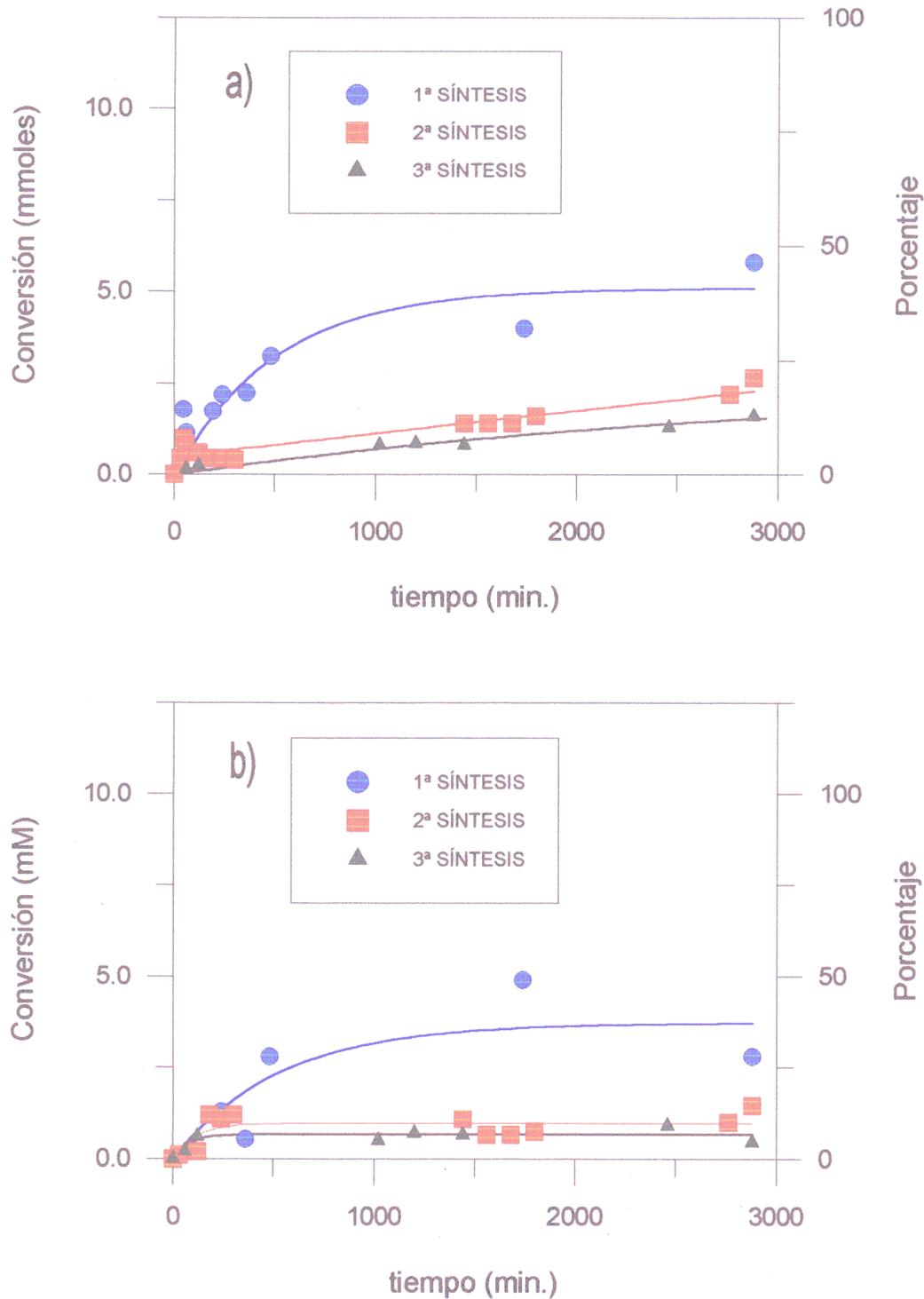


Figura 55.- Reutilización del derivado C2-CT (7.25 mg de derivado/ml equivalentes a 0.24 mg de enzima/ml), empleando como medio de reacción AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 4/1, (v/v), a 25 °C de temperatura. a) Péptido; b) ácido

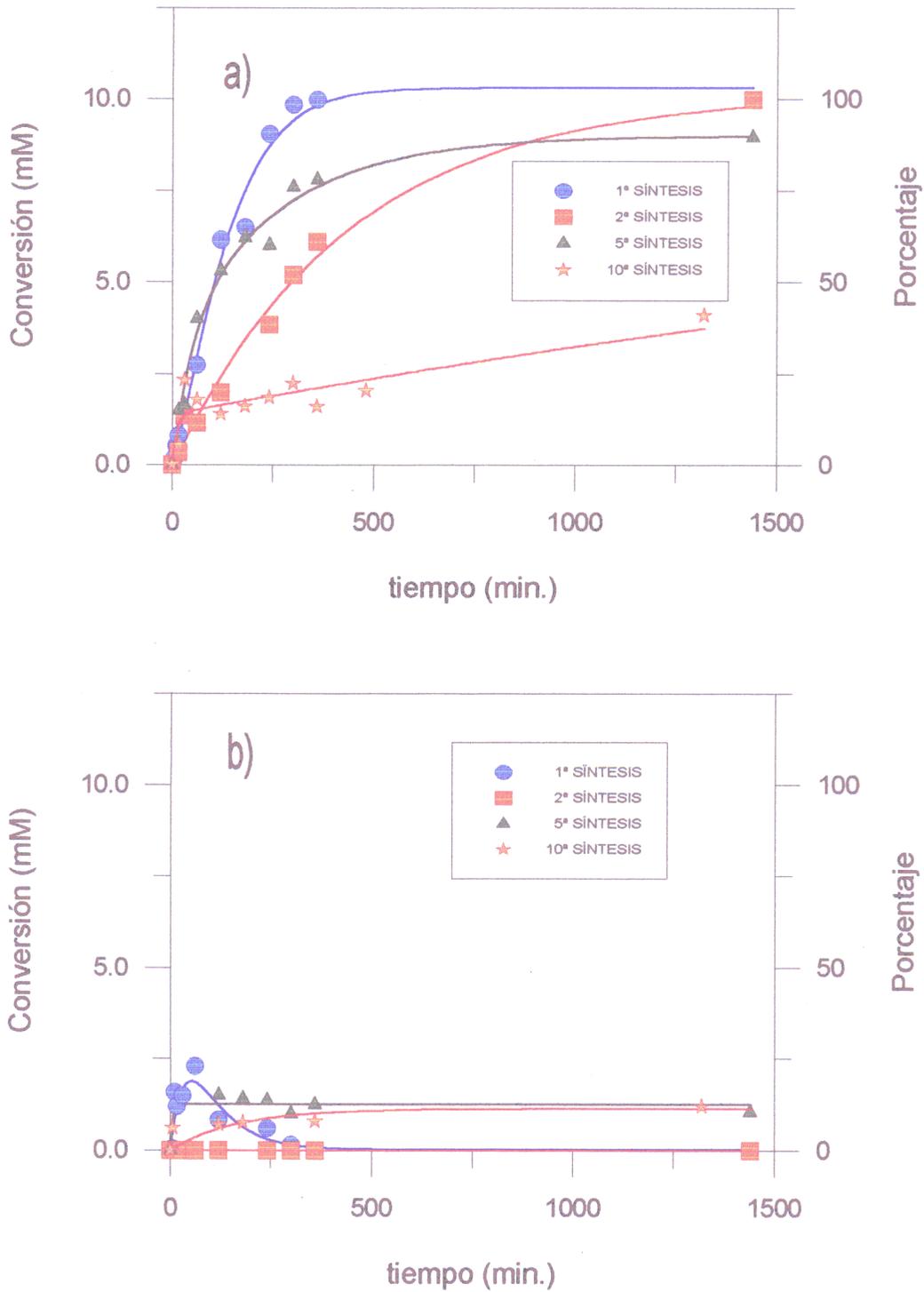


Figura 56.- Reutilización del derivado C4-CT (1.3 mg de derivado/ml equivalentes a 0.24 mg de enzima/ml), empleando como medio de reacción AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 99/1, (v/v), a 25 °C de temperatura. a) Péptido; b) ácido

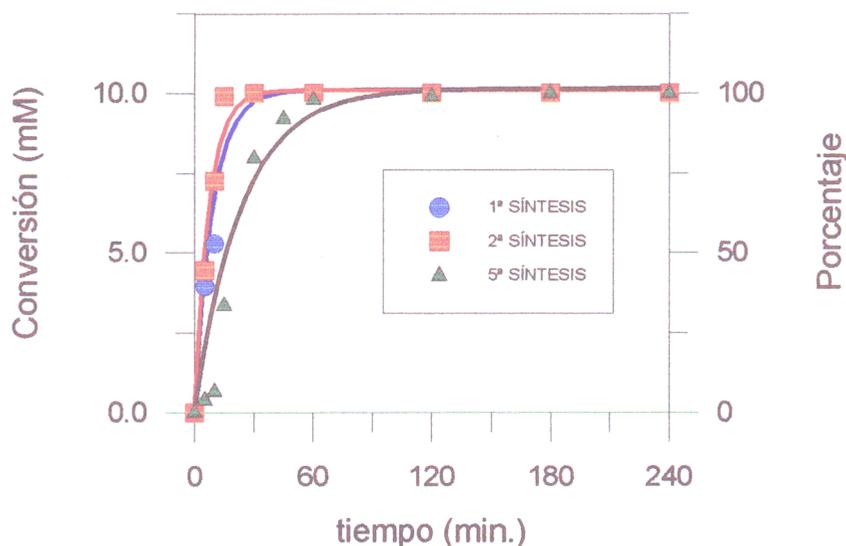


Figura 57.- Reutilización del derivado C4-CT (1.3 mg de derivado/ml equivalentes a 0.24 mg de enzima/ml), empleando como medio de reacción 1,1,1-tricloroetano/Tris pH=9.0, 0.1 M, 99/1, (v/v), a 25 °C de temperatura. a) Péptido; b) ácido

de agua en el microentorno humectado que le proporciona el soporte, lo cual facilita el proceso de hidrólisis del éster. Después de estar en contacto el derivado con la mezcla acetato de etilo/tampón (4/1) durante 48 h (2880 min.), esto es, tras el primer ciclo catalítico, se elimina el agua del microentorno fundamentalmente por el efecto del disolvente (AcOEt, $\log P = 0.73$). Es por ello por lo que la actividad transferásica se favorece frente a la esterásica en el segundo ciclo catalítico (Fig. 54).

Estos resultados están de acuerdo con los mostrados por Heras y cols (262), que han encontrado una relación entre el tiempo de liofilización del derivado inmovilizado de α -quimotripsina sobre agarosa y sus actividades transferásica y esterásica. Así, el catalizador con un mayor grado de liofilización, presenta mayor actividad en la síntesis de péptidos y menor en la hidrólisis de ésteres.

En la segunda reutilización (3^{er} ciclo catalítico) vuelve a disminuir el porcentaje de hidrólisis por el mismo efecto apuntado arriba, mientras que la actividad transferásica sigue siendo importante, si bien es inferior a la observada en la primera reutilización. De ello cabe deducir una paulatina desactivación del derivado inmovilizado, sin pérdida de proteína, ya que los experimentos de abrasión (Sección IV.1.3), arrojaron resultados negativos.

Tabla 30.- Síntesis del péptido Bz-L-Tyr-L-Leu-NH₂, con 0.24 mg de enzima/ml, (2.75 mg de derivado C1-CT/ml), en AcOEt/Tris/HCl pH=9 (4/1) a 25°C.

t (h.)	% Péptido	% Ácido	Pept./ac.	Reacción
48	40	50	0.8	1ª SÍNTESIS
48	67	18	3.7	1ª RECUPER.
48	40	4	10.0	2ª RECUPER.

El comportamiento del derivado C2-CT (Figura 55 y Tabla 31) en las reutilizaciones es más cercano a C1-CT (Figura 54 y Tabla 30) que a C4-CT (Figura 56 y Tabla 32). El derivado C2-CT en un medio de AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 4/1, (v/v) presenta un comportamiento diferente al del derivado C1-CT, (Fig. 54). El derivado C2-CT se desactiva después de cada reutilización, disminuyendo tanto la actividad transferásica como la esterásica a pesar de lo cual la relación péptido/ácido crece ligeramente. Ello debe atribuirse al menor grado de injerto del polímero C2, que lo hace más lipóide y por tanto, más sensible a la alteración de su estructura por un disolvente relativamente lipóide como es el acetato de etilo. No obstante, al igual que pasaba en el caso del derivado C1-CT, la disminución en la reacción de hidrólisis del donador de acilo con el número de reutilizaciones, es más acusada que la observada en el caso de la actividad transferásica (Tabla 30) como se aprecia por el aumento de la relación péptido/ácido.

Tabla 31. Síntesis del péptido Bz-L-Tyr-L-Leu-NH₂, con 0.24 mg de enzima/ml, (7.25 mg de derivado C2-CT/ml), en AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, (4/1) a 25°C.

t(h.)	% Péptido	% Ácido	Pep./Ac.	Reacción
24	50	35	1.42	1ª SÍNTESIS
48	22	11	2.00	1ª RECUPER.
48	16	7	2.29	2ª RECUPER.

A diferencia de los dos derivados anteriores, el derivado C4-CT, además de proporcionarnos un mayor rendimiento, no se desactiva apreciablemente en los primeros ciclos, siendo necesarios 5 de ellos para que se empiece a apreciar una desactivación, y 10 para que su actividad disminuya por debajo del 50%. No obstante, y a diferencia del comportamiento de los derivados C1-CT y C2-CT, con el derivado C4-CT (Fig. 56), a medida que se reutiliza la enzima desciende la actividad transferásica y aumenta aunque muy ligeramente la actividad hidrolítica. Este hecho, es atribuible al gran porcentaje de injerto del soporte empleado, y a la elevada carga enzimática.

Tabla 32.- Síntesis del péptido Bz-L-Tyr-L-Leu-NH₂, con 0.24 mg de enzima/ml, (1.3 mg de derivado C4-CT/ml), en AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M (99/1, v/v) a 25° C.

t (h.)	% Péptido	% Ácido	Pept./ac.	V. Inicial ^a	Reacción
6	99	1	99.0	0.070	1 ^a SÍNTESIS
24	99	1	99.0	0.023	2 ^a SÍNTESIS
24	90	10	9.0	0.066	5 ^a SÍNTESIS
24	44	12	3.7	0.011	10 ^a SÍNTESIS

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

Cuando el disolvente es 1,1,1-tricloroetano ($\log P = 2.49$) (234), no se aprecia disminución en el rendimiento (Figura 57 y Tabla 33), ni la aparición de ácido, solamente un ligero descenso en la velocidad de síntesis, después de 5 ciclos productivos, demostrando claramente como estos disolventes inmiscibles con el agua, de elevado $\log P$, son menos perjudiciales para la enzima que el acetato de etilo (260).

El conseguir 10 ciclos de síntesis con buenos rendimientos en péptido es un excelente resultado teniendo en cuenta el efecto destructor sobre el derivado que ejerce el sistema de agitación en el fondo del reactor.

Comparando los valores de velocidades iniciales de las Tablas 32 y 33, nos llama

primeramente la atención la enorme diferencia que existe entre ambos disolventes, siendo la velocidad inicial de síntesis en 1,1,1-tricloroetano 10 veces superior a la obtenida en acetato de etilo; por otra parte, en el caso del disolvente clorado la velocidad de la 2ª síntesis es superior al de la 1ª síntesis, lo que parece indicar que la enzima se habitúa a reconocer a estos sustratos, modificando su forma y adaptándola a los requerimientos del BTEE y de la *L*-leucimamida, soportando este cambio las manipulaciones de los procesos de recuperación del catalizador. Este hecho se demuestra más claramente con los datos recogidos en el apartado siguiente.

Tabla 33.- Síntesis del péptido Bz-*L*-Tyr-*L*-Leu-NH₂, con 1.3 mg de derivado C4-CT/ml, equivalentes a 0.24 mg de enzima/ml, en 1,1,1-tricloroetano/Tris pH=9.0, 0.1 M, 99/1, (v/v) a 25° C.

t (min.)	% Péptido	% Ácido	Pept./ac.	V. inicial*	Reacción
15	99	1	99.0	1.092	1ª SÍNTESIS
30	99	1	99.0	1.383	2ª SÍNTESIS
120	99	1	99.0	0.350	5ª SÍNTESIS

* Velocidad inicial de síntesis de péptido (mM/min.)

IV.1.7.2.- Reacciones de síntesis consecutivas empleando derivados inmovilizados de α -quimotripsina sobre copolímeros de injerto.

Se han denominado "síntesis consecutivas" a aquellos ciclos de producción de dipéptidos que tienen lugar dentro del mismo reactor sin purificar el producto, y donde la separación entre un ciclo y otro, viene definida por el consumo total del donador de acilo, a diferencia de las reutilizaciones, en las cuales, después de cada ciclo, se extrae el producto y se aísla el catalizador, para posteriormente emplear dicho catalizador recuperado en el seno de otro reactor, con un medio de reacción fresco, sin que exista un acumulo de péptido, como

sucede en las reacciones de síntesis consecutivas (**Sección III.6.6.2**).

Guisán y cols. (263), han llevado a cabo procesos de "regeneración del catalizador", los cuales también implican la existencia de ciclos, pero que son diferentes de los definidos por nosotros, puesto que estos autores aunque también miden la actividad de la enzima, la aíslan del medio de reacción, la desnaturalizan con urea o guanidina y posteriormente, en medio acuoso, hacen que se vuelva a plegar para a continuación medir de nuevo su actividad, repitiendo este proceso varias veces con el fin de observar si la enzima pierde o no actividad. (263).

Hemos estudiado lo que sucede en este tipo de síntesis consecutivas, debido al hecho de que el objetivo de todo proceso que se intente llevar a una escala al menos semi-industrial pasa por obtener grandes cantidades de producto, con sencillos procesos de purificación y con bajas cantidades de catalizador.

Estos ensayos han sido posibles gracias a los resultados obtenidos anteriormente con los estudios con diferentes soportes, en las distintas condiciones de reacción. Así, hemos podido encontrar condiciones en las que la actividad amidásica no aparece (97/3, (v/v) AcOEt/(Tris pH=9.0, 0.1 M), ya que el dipéptido se extrae precipitando en la fase orgánica, permaneciendo lejos de la enzima y no hidrolizándose a lo largo del tiempo (**Fig. 44 y 45, Sección IV.1.5.4**), hecho que es fundamental para llevar a cabo estas reacciones. También es imprescindible obtener rendimientos elevados (próximos al 100%) como los que se obtienen con derivados de elevado porcentaje de injerto (**Fig. 46, Sección IV.1.5.4**). El hecho de la existencia en estas condiciones de síntesis termodinámica, además de aumentar el rendimiento, favorece la purificación de los productos al disminuir la cantidad de ácido presente en la reacción (**Fig. 51 b y c, Sección IV.1.5.7 y Fig. 53, Sección IV.1.6**).

Analizadas estas consideraciones llevamos a cabo síntesis consecutivas según se describe en la parte experimental (**Sección III.6.6.2**) empleando como medio de reacción AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 97/3, (v/v), obteniendo los resultados que se reflejan en las **Figuras 58 y 59**.

En la **Figura 58** se muestra como, lejos de perder actividad tras el primer ciclo productivo y los tres siguientes, se produce un aumento de la actividad enzimática, hasta llegar a un máximo en el 4^o ciclo, para posteriormente pasar a una etapa que dura 6 ciclos en

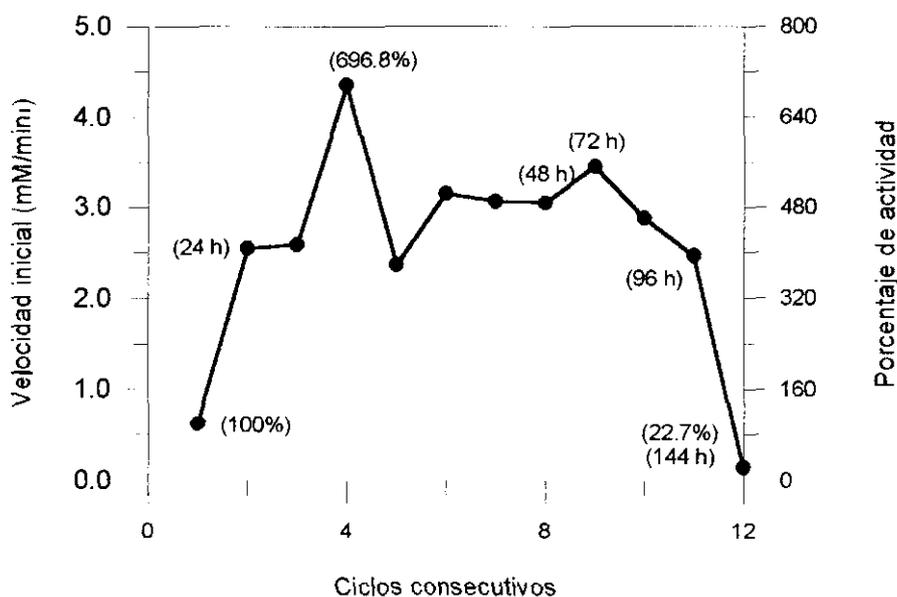


Figura 58.- Variación de la velocidad inicial de síntesis de péptidos ($Bz-L-Tyr-L-Ala-NH_2$), en función del número de ciclos de "síntesis consecutivas", empleando 1.3 mg del derivado C6-CT/ml, (0.113 mg de enzima/ml), en un medio AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 97/3, (v/v) y a 25 °C de temperatura.

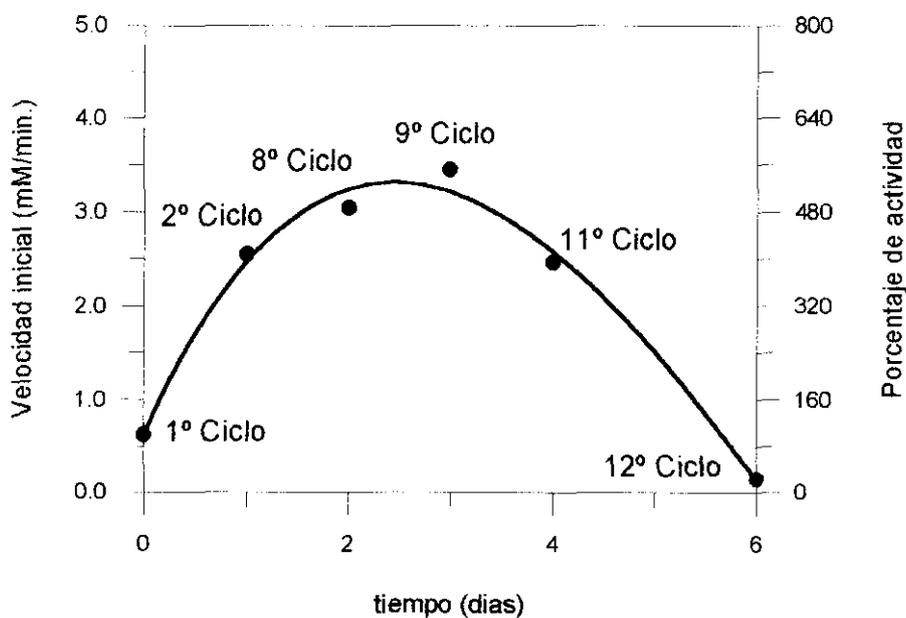


Figura 59.- Variación de la velocidad inicial en procesos de síntesis consecutivas de péptidos ($Bz-L-Tyr-L-Ala-NH_2$), en función del tiempo, empleando 1.3 mg del derivado C6-CT/ml, (0.113 mg de enzima/ml), en un medio AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 97/3, (v/v) y a 25 °C de temperatura.

los que la actividad enzimática se estabiliza en un valor muy por encima del inicial ($\approx 500\%$), para finalmente comenzar a descender hasta llegar, después de 12 ciclos sintéticos a una actividad inferior a la inicial.

Conociendo las curvas de desactivación del catalizador en este mismo medio (**Figuras 30 y 31**), en las cuales se observa como éste pierde actividad desde el principio y comparándolas con la **Figura 59** en la que se aprecia como el catalizador aumenta su actividad por encima del valor inicial hasta las 72 h., podemos, pues, concluir que el comportamiento del biocatalizador en presencia de los sustratos es distinto al que se describe cuando éste se incubaba, en las mismas condiciones experimentales, en ausencia de dichos sustratos (**Figura 30**). Ello se debe al *Bioimprinting* que realiza el sustrato sobre el derivado inmovilizado. Estos hechos concuerdan con los resultados descubiertos por Guisán y cols. los cuales han observado cambios de actividad en la α -quimotripsina al inmovilizarla sobre geles de agarosa en presencia de ciertos sustratos, (264).

Comparando las **Figuras 58 y 59** entre sí podemos deducir que tanto el número de ciclos como el tiempo que permanece el catalizador en el reactor son factores importantes en este tipo de reacciones, aumentando la actividad hasta llegar a un máximo en el 4º ciclo, para descender paulatinamente a continuación (**Fig 58**), mientras que con respecto al tiempo, el máximo se alcanza a los 3 días, para a partir de entonces disminuir la actividad hasta un valor inferior al inicial transcurridos 6 días.

De forma análoga, se llevaron a cabo síntesis consecutivas para obtener los dipéptidos Bz-L-Tyr-Ala-NH₂, Ac-L-Phe-L-Leu-NH₂ y Ac-L-Phe-L-Ala-NH₂, obteniendo resultados similares.

IV.1.7.3.- Purificación del péptido sintetizado en las reacciones consecutivas

Una vez realizados los procesos de síntesis consecutivas, con un rendimiento muy próximo al 95% de péptido en cada ciclo, mediante una sencilla metodología, (**Sección III.6.6.3**), se logró la purificación de los dipéptidos consiguiendo Bz-L-Tyr-L-Leu-NH₂, Bz-L-Tyr-L-Leu-NH₂, Ac-L-Phe-L-Leu-NH₂, Ac-L-Phe-L-Ala-NH₂ (este dipéptido presentó algunos problemas de purificación debido a su mayor solubilidad en medio acuoso). Estos productos

han sido caracterizados mediante análisis elemental y espectroscopia de resonancia magnética nuclear de (¹H) protón . A continuación se muestran dos ejemplos en los cuales el grado de pureza es próximo al 98 %:

Microanálisis del dipéptido Bz-L-Tyr-L-Ala-NH₂:

	% Carbono	% Hidrógeno	% Nitrógeno
Valores teóricos	64.21	5.95	11.82
Valores prácticos	63.43	5.98	11.61

Microanálisis del dipéptido Bz-L-Tyr-L-Leu-NH₂:

	% Carbono	% Hidrógeno	% Nitrógeno
Valores teóricos	66.48	6.85	10.57
Valores prácticos	65.10	6.69	10.48

Los resultados del espectro de Resonancia Magnética nuclear de protón (RMN ¹H) se muestran a continuación:

Dipéptido Bz-L-Tyr-L-Ala-NH₂

(RMN ¹H) ((CD₃)₂SO, 250 MHz) δ(ppm)= 1.2 (d, 3H, CH₃ (2´)); 2.85-3.00 (dd, 2H (H_a, H_b)); 4.20 (q, 1H, CH (2)); 4.57 (m, 1H, CH (2´)); 6.62 (d, 2H, NH₂ (4´)); 7.03-7.28 (2S, NH (10 y 1´)); 7.13 (d, 2H, CH (5), CH (9)); 7.49 (m, 3H; CH (14), CH (15), CH (16)); 7.76 (d, 2H, CH (6), CH (8)); 8.10-8.52 (2d, 2H, CH (13), CH (17)); 9.15 (S, 1H, OH fenólico).

Dipéptido Bz-L-Tyr-L-Leu-NH₂

(RMN ¹H) ((CD₃)₂SO, 250 MHz) δ(ppm)= 0.85 (dd, 2CH₃, 6H, (3´´´ y 4´´)); 1.49 (m, 1H, CH (3´)); 1.60 (m, 2H, CH₂ (2´)); 2.85-2.97 (dd, 2H (H_a, H_b)); 4.23 (m, 1H, CH (2)); 4.59 (m, 1H, CH (2´)); 6.62 (d, 2H, NH₂ (4´)); 7.01-7.29 (2S, NH (10 y 1´)); 7.13 (d, 2H, CH (5), CH (9)); 7.45 (m, 3H; CH (14), CH (15), CH (16)); 7.76 (d, 2H, CH (6), CH (8)); 7.98-8.50 (2d, 2H, CH (13), CH (17)); 9.15 (S, 1H, OH fenólico).

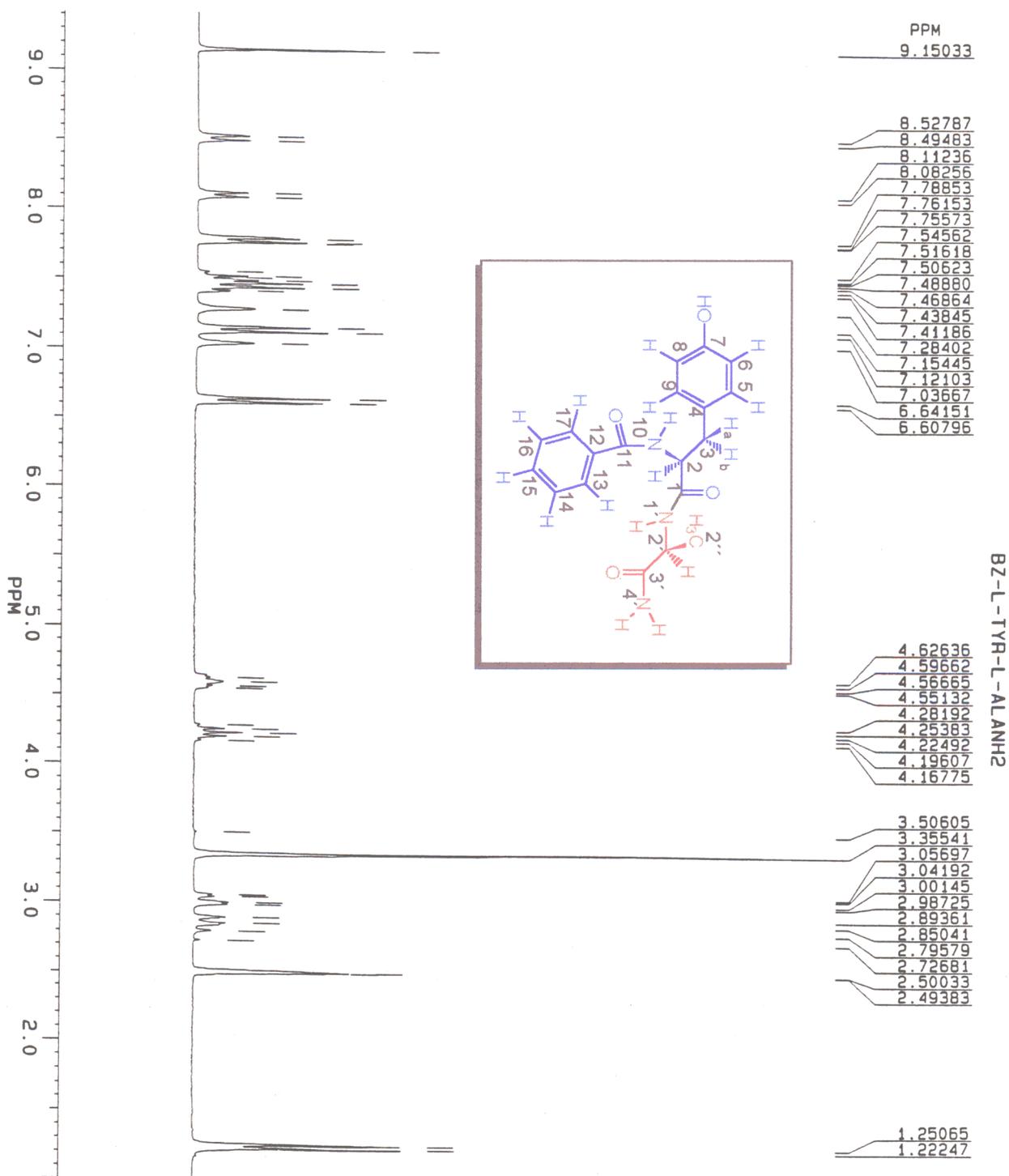


Figura 60.- Espectro de resonancia de protón ¹H del dipéptido Bz-L-Tyr-L-Ala-NH₂.

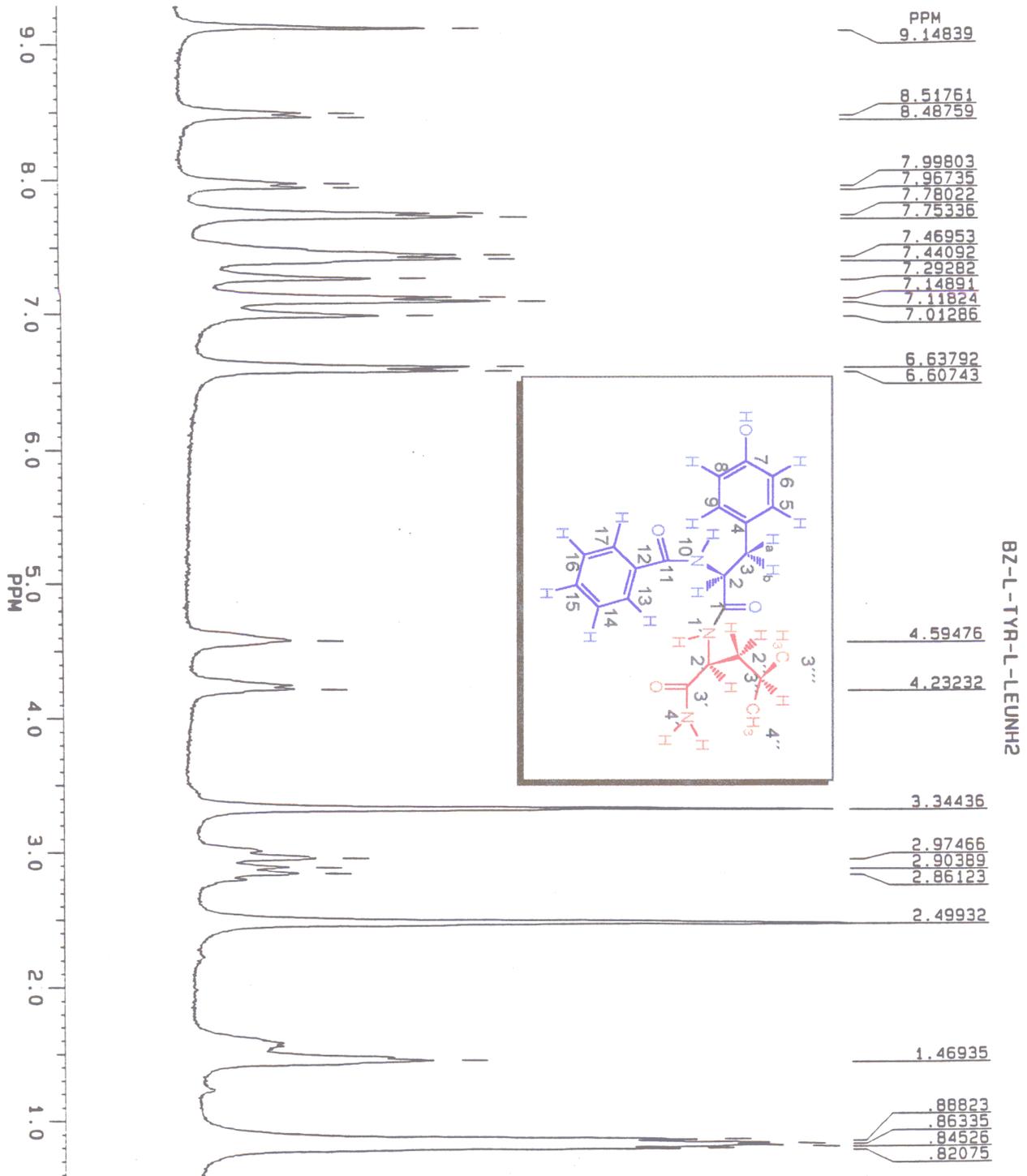


Figura 61.- Espectro de resonancia de protón ¹H del dipéptido Bz-L-Tyr-L-Leu-NH₂.

IV.2.- ENSAYOS CON DERIVADOS INMOVILIZADOS DE α -QUIMOTRIPSINA SOBRE GELES DE AGAROSA.

Para comparar los derivados de α -quimotripsina inmovilizada sobre copolímeros de injerto (PE/HEMA) con otros conocidos, hemos llevado a cabo ensayos similares con unos derivados de α -quimotripsina inmovilizada sobre geles de agarosa perfectamente caracterizados por el grupo del Dr. Guisán, a los cuales hicimos referencia en el **Apartado III.4.**

Así pues, en este apartado nos vamos a centrar en comentar los resultados obtenidos en ciertos experimentos muy concretos que nos valdrán como termino de comparación.

IV.2.1.- CARACTERIZACIÓN DE LOS DERIVADOS INMOVILIZADOS SOBRE GELES DE AGAROSA

En la **Tabla 34**, se muestran las características de los tres derivados de α -quimotripsina inmovilizada sobre geles de agarosa.

El derivado obtenido por unión unipuntual y con mayor carga enzimática (AGU1-CT) presenta una baja actividad retenida si bien esta se midió a pH=6.0. En los otros dos derivados, la determinación de la actividad hidrolítica se realizó a pH=7.8, (óptimo para la enzima) (159, 229). Puede apreciarse que estos derivados AGU2-CT y AGM1-CT de igual carga enzimática presentan valores muy similares de actividad específica de hidrólisis a cortos tiempos de reacción, independientemente de si se trata de un derivado uni o multipuntual.

Si comparamos la actividad específica de estos derivados en la hidrólisis del GpNA (229), (**Tabla 34**) (3.76 y 2.70 μ M/min. mg de enzima) con los derivados inmovilizados sobre copolímeros, (**Tabla 16**) (0.36-4.26 μ M/min. mg de enzima) vemos que ambos grupos de derivados inmovilizados presentan valores similares, a pesar de tener los derivados inmovilizados sobre geles de agarosa una carga enzimática sensiblemente inferior, (6 mg de enzima/ml de gel) frente a (33-189 mg de enzima/g de copolímero) (**Tabla 16**). Esto indica que toda la enzima inmovilizada se comporta de la misma forma independientemente de la carga del derivado, no observándose problemas difusionales en aquellos derivados más cargados como cabría esperar.

Tabla 34 Caracterización de los derivados de α -quimotripsina inmovilizada sobre geles de agarosa.

Derivado	Soporte	Derivado			
	Activación ^a	Carga ^b	% Act. ret. ^c	Activ. esp. ^d	Activ. esp. ^e
AGU1-CT	0.5	19.0	---	---	0.07 \pm 0.006 ^g
AGU2-CT	0.5	6.0	67 \pm 2	3.76 \pm 0.08	3.3 \pm 0.2 ^h
AGM1-CT	75	6.0	49.5 \pm 0.7	2.70 \pm 0.06	2.8 \pm 0.2 ^h

^a Activación del soporte (μmol de aldehído/ml de gel).

^b Determinada por el método de Lowry (mg de enz./ml de gel), (densidad del gel = 0.7 g/ml) (237).

^c Porcentaje de actividad retenida expresada como: (mg de enzima activa/mg de enzima unida) \times 100.

^d Actividad específica calculada por el método del GpNA, ($\mu\text{M}/\text{min.}$ mg de enz.) (229).

^e Actividad específica calculada en pHstat en la hidrólisis de BTEE (mM/min. mg de enz.).

^g Actividad enzimática en la hidrólisis de BTEE, empleando tampón fosfato pH=6.0 0.01 M.

^h Actividad enzimática en la hidrólisis de BTEE, empleando tampón fosfato pH=7.8 0.01 M.

IV.2.2.- REACCIONES DE HIDRÓLISIS DE BTEE

IV.2.2.1- Estudio cinético del proceso de hidrólisis

Primeramente se realizó un estudio cinético del proceso de hidrólisis, con los derivados (AGU2-CT y AGM1-CT) y el éster que posteriormente emplearíamos como donador de acilo en las reacciones de síntesis de péptidos (BTEE), en diferentes concentraciones, variando desde 5 hasta 90 mM, y empleando un medio con una importante fase acuosa para favorecer el proceso de hidrólisis, AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M 2/1, (v/v). Para ello, se siguieron las condiciones experimentales descritas en el apartado III.7.1.1.

Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 62 y 63:

Como se puede observar el proceso sigue una cinética michaeliana, para ambos catalizadores, presentado para el derivado AGU2-CT los siguientes valores de parámetros V_{max} ,

K_m y k_{cat} :

$$V_{max} = (0.15 \pm 0.02) \text{ mM/min.}$$

$$K_m = (62 \pm 19) \text{ mM.}$$

$$k_{cat} = (45 \pm 6) \text{ min.}^{-1}$$

$$R^2 = 0.973$$

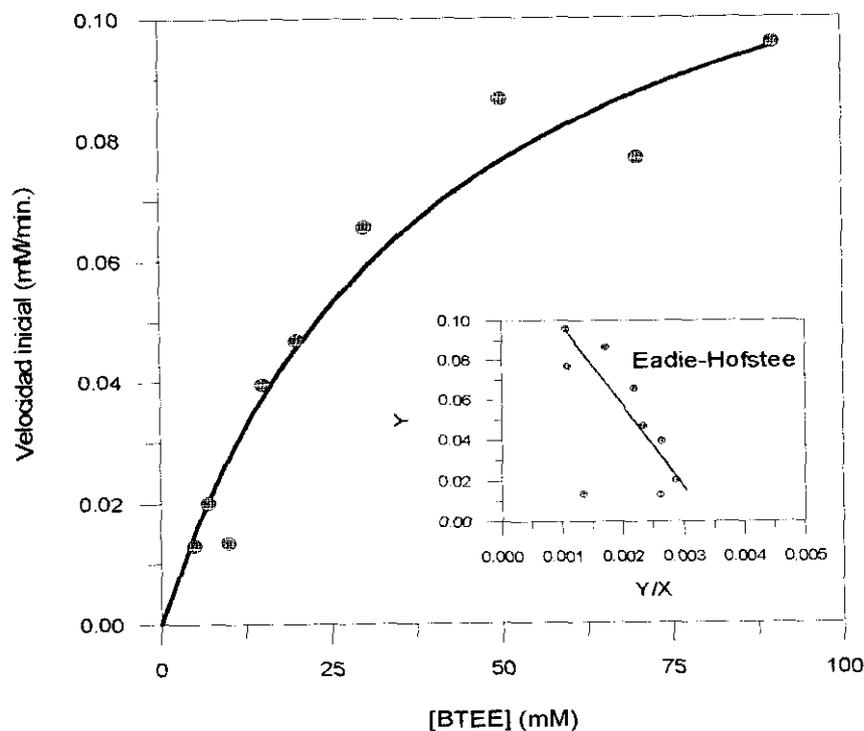


Figura 62.- Representación de Michaelis-Menten, para el proceso de hidrólisis de BTEE, empleando el derivado AGU2-CT (8.85 mg de derivado/ml, 0.076 mg de enzima/ml).

Mientras que en el caso del derivado AGM1-CT estos fueron:

$$V_{max} = (0.10 \pm 0.01) \text{ mM/min.}$$

$$K_m = (27 \pm 6) \text{ mM.}$$

$$k_{cat} = (33 \pm 3) \text{ min.}^{-1}$$

$$R^2 = 0.974$$

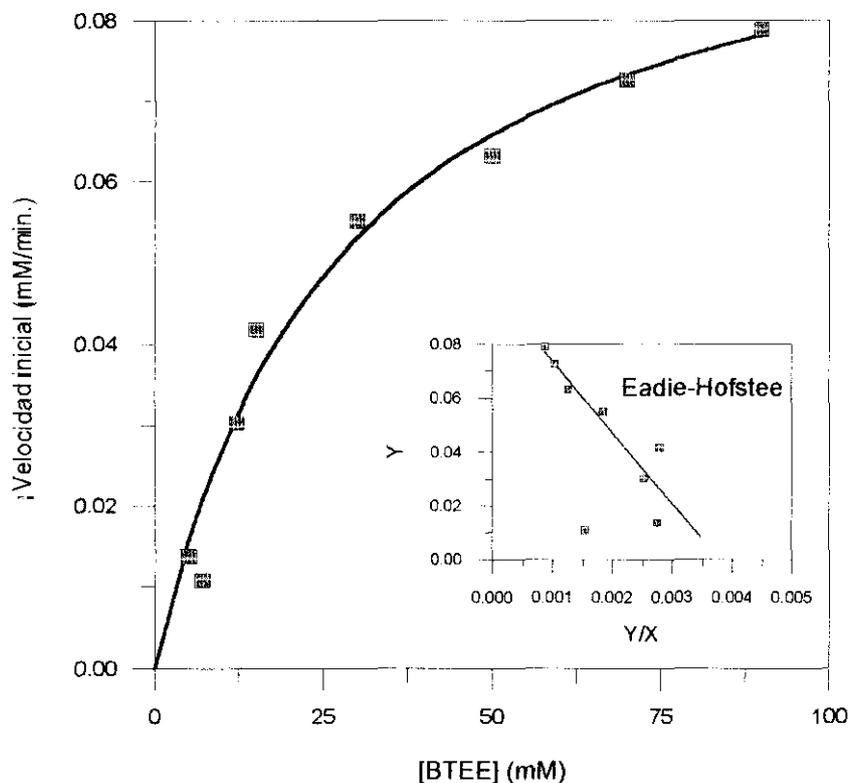


Figura 63.- Representación de Michaelis-Menten, para el proceso de hidrólisis de BTEE, empleando el derivado AGMI-CT (8.85 mg de derivado/ml, 0.076 mg de enzima/ml).

Teniendo en cuenta el error experimental, no parece que exista una diferencia notable entre ambos derivados, siendo el derivado unipuntual ligeramente más eficaz en la catálisis debido a su mayor valor de constante catalítica o número de recambio, lo que indica que el distinto grado de rigidez de los dos derivados modifica el reconocimiento del sustrato y la consiguiente acilación de la serina del centro activo. Comparando los valores de (V_{max} , K_m y k_{cat}) con los obtenidos con los derivados sobre copolímeros de injerto, observamos como para todos los casos, los valores obtenidos con derivados inmovilizados sobre geles de agarosa son menores. Por lo tanto, existen problemas para que se lleve a cabo el acto catalítico, con lo cual las constantes son realmente aparentes.

Un valor elevado de K_m , como en el caso de los derivados obtenidos sobre copolímeros de injerto ($K_m = 95 \pm 25$), indica que se necesita una mayor cantidad de sustrato para alcanzar la saturación con BTEE, o lo que es lo mismo, que estos derivados obtenidos sobre geles de agarosa presentan mayor afinidad por el sustrato. Por otro lado, el hecho de que la constante

catalítica sea también menor para los derivados inmovilizados sobre geles de agarosa, significa que estos son menos eficaces en el proceso de hidrólisis de BTEE, o lo que es lo mismo el número de moléculas de sustrato convertidas por unidad de tiempo es menor.

Todas estas consideraciones demuestran que la naturaleza del soporte (geles de agarosa o copolímeros de (PE/HEMA)) afecta enormemente a la actividad de la enzima.

IV.2.2.2.- Influencia del porcentaje de medio acuoso

Como paso previo al estudio del proceso de síntesis cinéticamente controlada se llevaron a cabo algunos ensayos de hidrólisis del éster que se utilizará como donador de acilo en los posteriores procesos de síntesis; aumentando paulatinamente la proporción de fase acuosa en el medio de reacción, variando desde 99/1 hasta 10/90 (v/v) AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, observando que los dos catalizadores presentan un comportamiento similar, como se indica en la **Figura 64**. A medida que aumenta la cantidad de agua en el medio se produce un pequeño incremento en la actividad hidrolítica, cuantificada como velocidad inicial de hidrólisis, hasta alcanzar un punto en el que la actividad se dispara, consiguiendo con pequeños incrementos en la cantidad de agua un gran aumento en la actividad hidrolítica.

Estos datos coinciden con los obtenidos por Peter Halling al analizar la influencia de la actividad de agua en la velocidad inicial de síntesis del éster Ac-*L*-Trp-OEt, empleando 3-pentanona como disolvente y como catalizadores derivados de α -quimotripsina inmovilizada sobre geles de agarosa, obteniendo a partir de una actividad de agua cercana a 0.75 un incremento brusco de actividad. Contrario a lo que cabría pensar en este tipo de reacciones en las que un exceso de agua dificultaría la reacción de síntesis del éster Ac-*L*-Trp-OEt, ya que es uno de los productos. Estos autores opinan que este tipo de derivados requieren gran cantidad de agua para conferir a la enzima la flexibilidad necesaria y llevar a cabo la reacción en condiciones óptimas (265).

Por otro lado, Arroyo y cols, han obtenido resultados similares a los anteriormente expuestos para los derivados de agarosa, empleando derivados inmovilizados de lipasa B de *Candida antártica* sobre sílice en la reacción de esterificación de ibuprofeno con 1-propanol, desarrollando un método semiempírico para conocer el valor de a_w al que se debe preequilibrar

un sistema, coincidiendo este con el punto de corte entre la 2ª pendiente de la isoterma de adsorción y el eje en el que se representa la actividad de agua, llegando a alcanzar un valor de 0.9 en este tipo de reacciones. Valores superiores a este pueden causar un descenso de la actividad y favorecer la hidrólisis del éster formado, ya que durante la reacción también se origina agua (182).

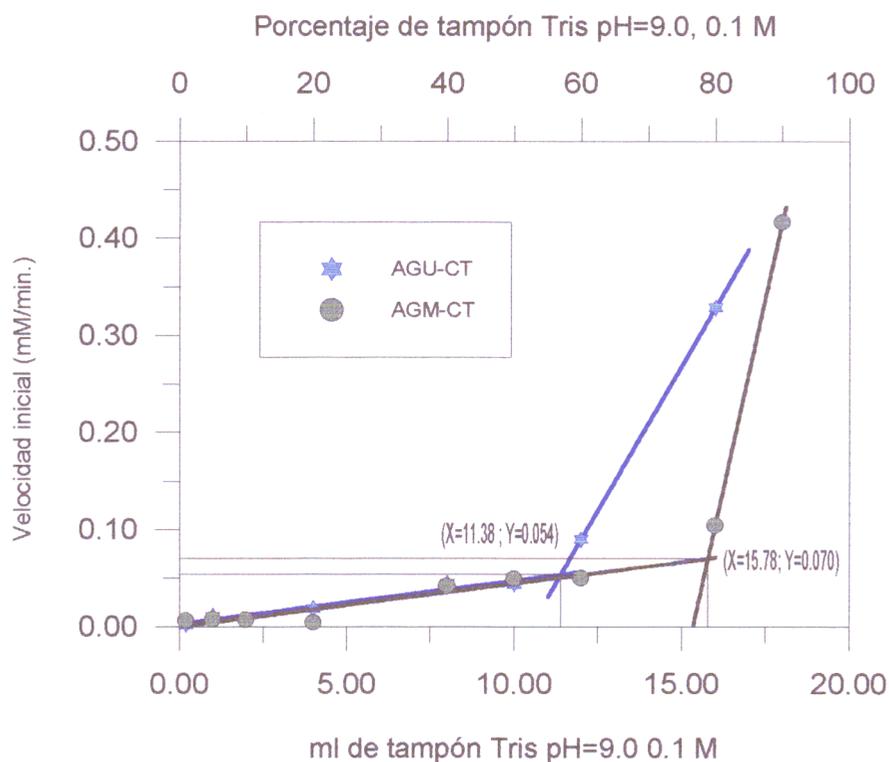


Figura 64.- Influencia del porcentaje de medio acuoso en la reacción de hidrólisis de BTEE, 10 mM, llevada a cabo por los derivados AGU2-CT y AGM1-CT (8.85 mg de derivado/ml, 0.076 mg de enzima/ml).

Los primeros puntos se pueden ajustar a una recta que resultó ser la misma para ambos derivados, cuyos parámetros serían:

$$\text{Pendiente} = (4.4 \pm 0.5) \mu\text{M}/(\text{min. ml de tampón})$$

Ordenada en el origen es no significativa en ambos casos según el test "t de Student" al 99% de certeza.

$R^2=0.96$ en el caso de derivado AGU2-CT y 0.90 para el derivado AGM1-CT.

Estos datos demuestran que a bajas concentraciones de medio acuoso, ambos derivados

presentan el mismo comportamiento, ya que se estaría hidratando la agarosa y ambos derivados poseen la misma carga, cosa que no sucede cuando el porcentaje de agua en el reactor supera el 60% (Figura 64). A partir de dicho punto ambos derivados actúan de forma diferente: así, mientras el derivado unipuntual AGU2-CT muestra un incremento brusco de actividad hidrolítica para un porcentaje de medio acuoso inferior al 60% (11.38 ml), con el derivado multipuntual (AGM1-CT) dicho incremento se manifiesta cuando el porcentaje de medio acuoso es cercano al 80% (15.78 ml). Obviamente, este hecho indica claramente como el sistema más rígido (multipuntual) precisa de mayor cantidad de agua para disponerse en la conformación óptima para llevar a cabo la hidrólisis, mientras que para bajos contenidos en agua ambos sistemas se comportan de manera similar (265).

Los derivados obtenidos sobre copolímeros de injerto (derivado C5-CT) se comportaban como el derivado multipuntual, teniendo el punto de corte entre ambas rectas próximo al 80% de tampón (16.21 ml). Ello indica que el aumento de la rigidez de la molécula de enzima producido por la unión multipuntual, aumenta la hidrofobicidad aparente del derivado, ya que se parece más al derivado inmovilizado sobre el copolímero (PE/HEMA) hidrofobo (Figura 33).

IV.2.3.- REACCIONES DE SÍNTESIS DE PÉPTIDOS CINÉTICAMENTE CONTROLADAS

IV.2.3.1- Influencia de la cantidad de enzima.

Para determinar la zona de trabajo en la cual la conversión a péptido es función lineal de la cantidad de enzima presente en el reactor, se realizaron diversos experimentos con cantidades crecientes de catalizador, (AGU1-CT), (desde 1.6 hasta 17.7 mg de derivado/ml equivalentes a 0.043 y 0.48 mg de enzima/ml), empleando como medio AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M 2/1 (v/v), mostrándose los resultados obtenidos en la Fig. 65 y Tabla 35.

Puede apreciarse que para una concentración elevada (0,48 mg de enzima/ml en reactor), se obtiene una rápida conversión a péptido, alcanzando un 50% de péptido en 3 horas, si bien para tiempos superiores puede apreciarse la actividad amidásica del derivado,

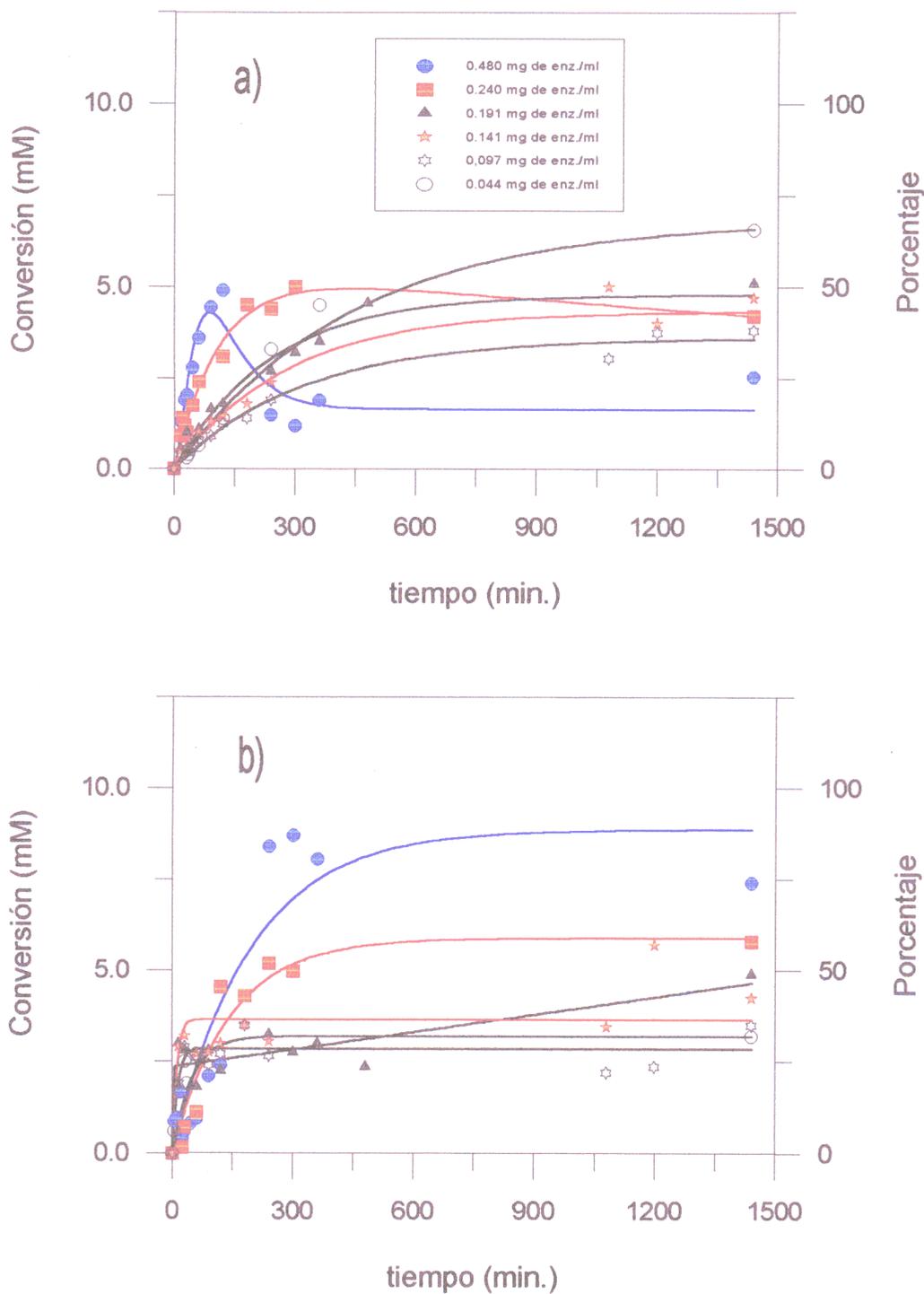


Figura 65.- Influencia de la cantidad de enzima en la síntesis del dipéptido modelo, empleando el derivado AGU1-CT como catalizador y AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M 2/1, (v/v) como medio de reacción a $T=25^{\circ}\text{C}$, con una relación BTEE/H-L-Leu-NH₂ de 1/4 (M/M). a) Péptido; b) ácido.

lo que conduce a una gran proporción de ácido a largos tiempos de reacción. El mismo comportamiento se obtuvo cuando se utilizó esta misma cantidad de enzima con los derivados C1-CT y C2-CT (Fig. 34 y 35)

Estos valores pueden considerarse mejores que los previamente obtenidos en el grupo por Salvador *y cols* (209), empleando derivados inmovilizados sobre geles de agarosa a una concentración de 8 mg de enzima inmovilizada/ml (17 veces más enzima que la empleada por nosotros) en una mezcla DMF/H₂O, estos autores alcanzan una máxima conversión de un 47% en péptido en 60 minutos.

Tabla 35.- Influencia de la cantidad de derivado añadido en la síntesis del dipéptido modelo, (AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M) (2/1, v/v) a T=25°C, y con una relación (BTEE)/(H-L-Leu-NH₂) de 1/4).

Entr.	mg/ml de Ag- α -CT	mg de α -CT/ml	t (h.)	% Péptido	% Ácido	Pép./Ác.
1	17.70	0.480	2 ^a	49	30	1.63
2	8.85	0.240	5 ^a	48	52	0.92
3	7.05	0,191	18	48	52	0.92
4	5.25	0.141	18	45	35	1.29
5	3.40	0.097	24	30	32	0.94
6	1.60	0.044	24	70	30	2.30

^a A tiempos mayores se aprecia actividad amidásica

De ello cabe deducir que la mezcla bifásica acetato de etilo/tampón es mejor que la monofásica DMF/H₂O, para llevar a cabo la síntesis de péptidos. Este resultado con los datos expuestos por Guisán *y cols*. (209, 247). No obstante, conviene recordar que las formaciones de péptido y de ácido en estas condiciones son procesos competitivos, pues se forman ambos productos ya desde el comienzo de la reacción, según se muestra la **Figura 9** (Sección I.4.2).

Con 0.24 mg de enzima inmovilizada/ml, se observa una ligera acción amidásica, no apreciándose ya para cantidades inferiores de enzima (Fig. 65). De los resultados indicados en la Fig. 65 y Tabla 35 podemos observar como la menor cantidad de derivado empleado (entrada 6) conduce a la mayor relación péptido/ácido, no manifestándose la acción amidásica en ningún momento.

La máxima relación péptido/ácido y el tiempo que se tarda en alcanzarla son los parámetros que mejor definen un proceso de síntesis cinéticamente controlado. De estos valores, recogidos en la Tabla 35, podemos deducir que la mayor selectividad hacia la formación de péptido se alcanza con la menor cantidad de biocatalizador (0.043 mg de enzima/ml), si bien la reacción transcurre muy lentamente, pues como se comentó en la Introducción (Sección I.4.2) la concentración de enzima afecta fundamentalmente al tiempo que se tarda en alcanzar el máximo porcentaje en péptido.

La relación péptido/ácido obtenida es, en general, inferior a la conseguida con los derivados inmovilizados sobre copolímeros hidrofóbicos (Tablas 19 y 20). Ello se explica en función de la naturaleza hidrofílica del soporte, agarosa, que en estas condiciones favorece la hidrólisis del donador de acilo a ácido. Así, el porcentaje de ácido en el caso de los derivados inmovilizados sobre agarosa es más elevado que para los derivados inmovilizados sobre copolímeros.

No obstante, no se observan grandes diferencias a bajas concentraciones de enzima, tal y como describen Clapés y cols. para el caso de α -quimotripsina adsorbida sobre celite (251). Esto nos induce a pensar que la agarosa actuando como soporte no ejerce ninguna acción sobre la actividad enzimática cuando el parámetro en estudio es la concentración de enzima en el reactor.

IV.2.3.2.- Influencia de la estructura del nucleófilo y del donador de acilo en procesos de síntesis peptídica.

Como se indica en la introducción teórica de esta Memoria, la α -quimotripsina nativa es una endoproteasa que reconoce en el subsitio ρ_2 (según la nomenclatura de Hansch, (111)) ("ar", según la nomenclatura de Niemann y Cuningham (104)) a un aminoácido aromático (33,

96), mientras que carece prácticamente de especificidad en el subsitio p_1 ó "n" que reconoce al nucleófilo (266). Para comprobar si el derivado inmovilizado sobre agarosa mantiene la misma especificidad que la enzima nativa, se procedió a sintetizar cuatro dipéptidos diferentes empleando dos donadores de acilo: Bz-*L*-Tyr-OEt y Ac-*L*-Phe-OEt. y dos nucleófilos: H-*L*-Leu-NH₂ y H-*L*-Ala-NH₂. Se utilizó asimismo una concentración de enzima de 0.24 mg de enzima/ml (8.85 mg de derivado AGU1-CT/ml), con tres disolventes en los que el comportamiento del derivado es muy diferente; 1,1,1-tricloroetano, metilisobutilcetona (MIBK) y acetato de etilo (AcOEt), en proporciones 99/1 (v/v) disolvente orgánico/Tris pH=9.0, 0.1 M.

Los resultados aparecen recogidos en las Figuras 66-71 y en la Tabla 36.

Observando los resultados obtenidos en 1,1,1-tricloroetano (Fig. 66 y 67) podemos apreciar como se logra mayor conversión cuando se emplea como nucleófilo la *L*-leucinamida frente a la *L*-alaninamida. De ello cabe deducir, en principio, que cuando se emplea un disolvente de $\log P > 2$ e inerte frente al derivado inmovilizado, tal y como el 1,1,1-tricloroetano, cuanto más lipóide es el nucleófilo, mayor conversión a péptido se obtiene. Por el contrario, para el caso de la MIBK (Fig. 68 y 69) no influye tanto la naturaleza de nucleófilo, pues las diferencias son menos acusadas. Resultados análogos se han descrito en la bibliografía utilizando medios orgánicos con bajo contenido en agua, v. g; empleando α -quimotripsina libre liofilizada en acetonitrilo con un 5% de agua (132), en acetonitrilo (1% H₂O) con α -quimotripsina adsorbida sobre quitina (132b). Por el contrario, estos resultados son opuestos a los obtenidos en medios que contienen una elevada cantidad de H₂O v. g.: 20% DMF con α -quimotripsina inmovilizada sobre geles de agarosa, donde ambos nucleófilos se comportan de forma similar (267) y con α -quimotripsina libre (138). Estos hechos se deben, según describen Kise y cols. (132), a la alteración de K_m por efecto de la interacción enzima-medio, pero no a una variación de k_{cat} , lo cual implica una alteración de la conformación del centro activo o del microentorno de la enzima y no de la maquinaria catalítica. Esto nos estaría hablando de una alteración de la conformación de la α -quimotripsina por transformación de los grupos hidrófilos (Enz-NH₂) en hidrófobos (Enz-N=C(Me)(ibu) por alquilación con la MIBK, tal y como sugiere Kise.

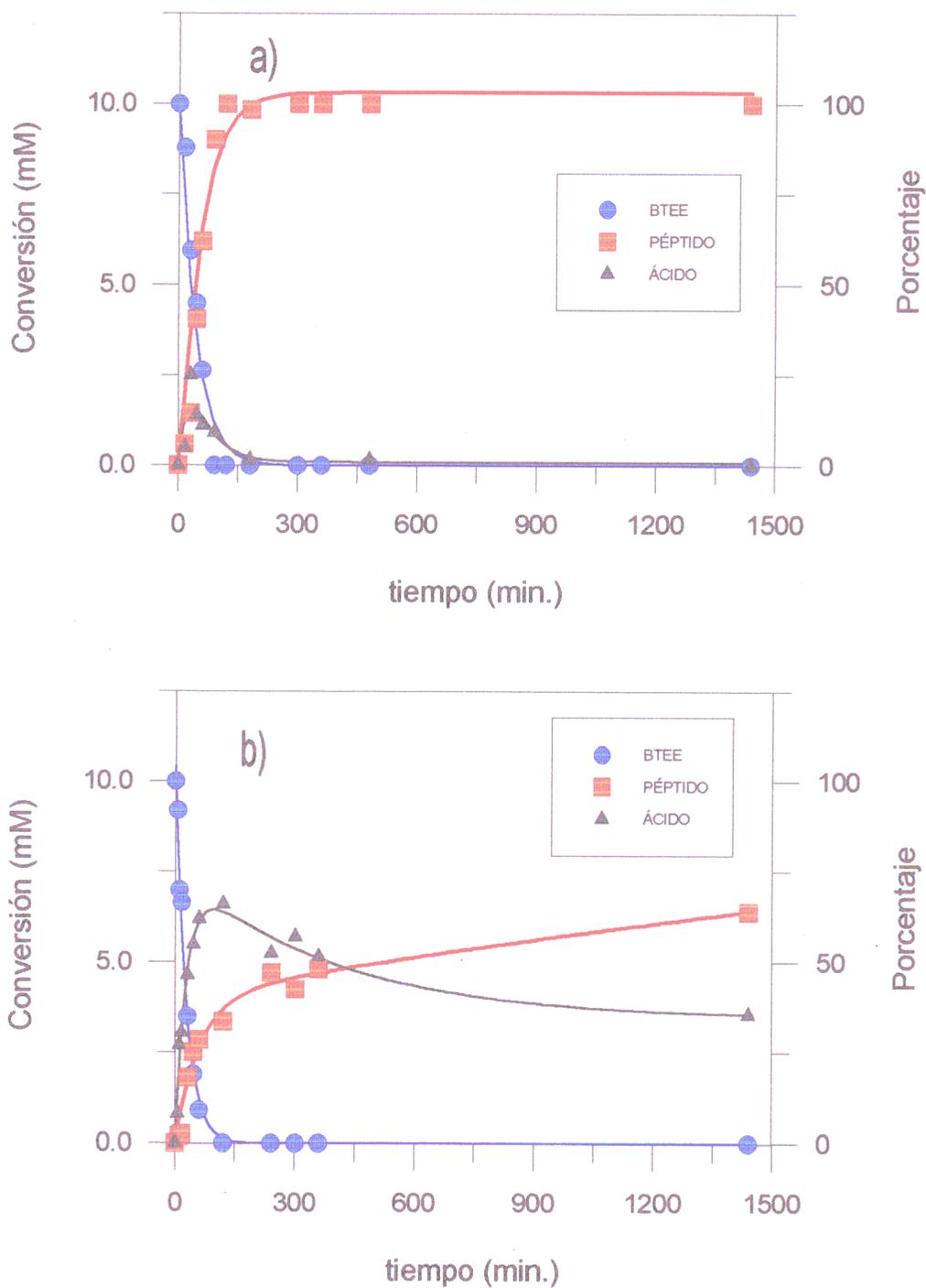


Figura 66,- Influencia del nucleófilo, empleando 1,1,1-tricloroetano/Tris pH=9.0, 0.1 M 99/1, (v/v) como medio y 0.24 mg de enzima/ml (8.85 mg de derivado AGU1-CT/ml). a) Síntesis del dipéptido Bz-L-Tyr-L-Leu-NH₂; b) síntesis del dipéptido Bz-L-Tyr-L-Ala-NH₂.

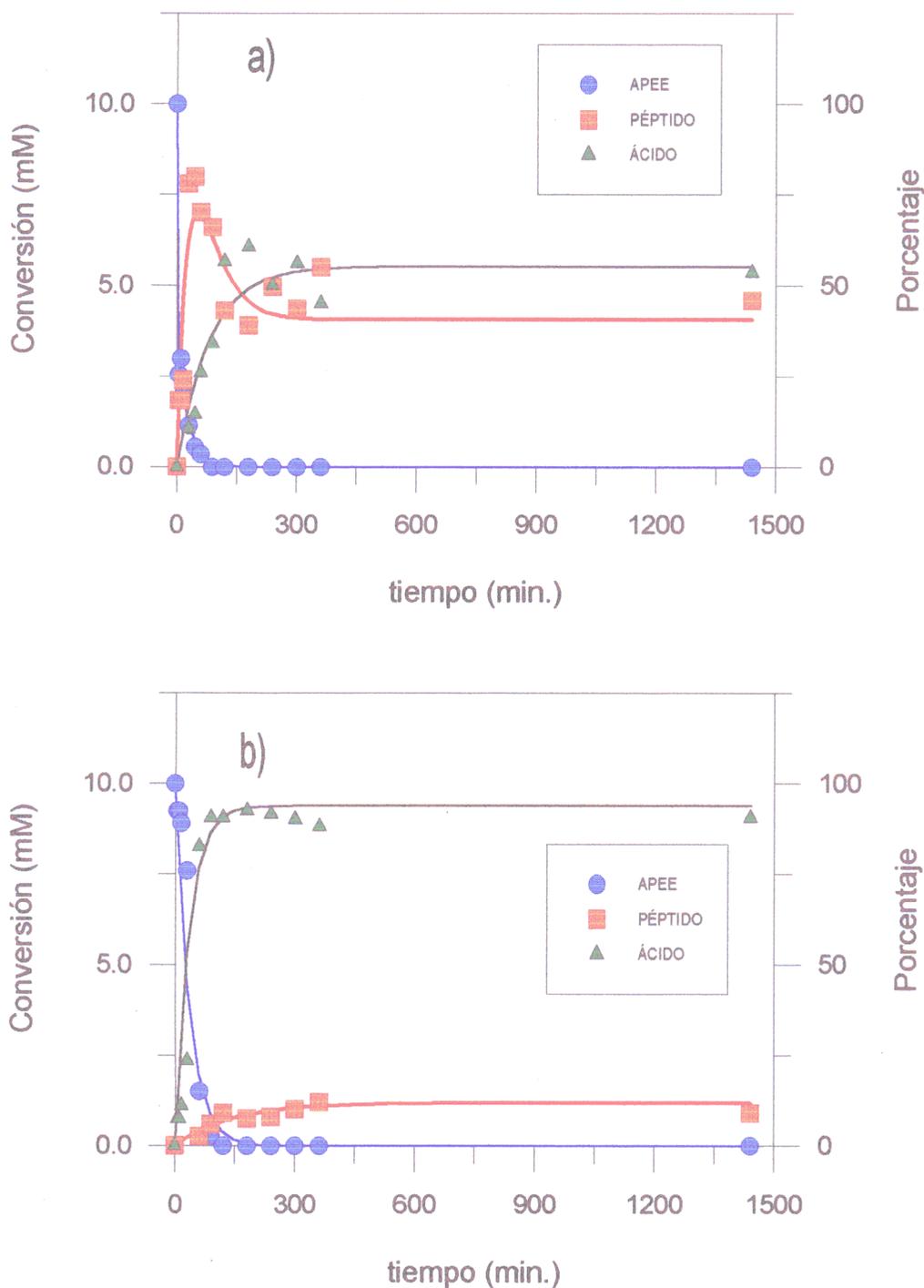


Figura 67,- Influencia del nucleófilo, empleando 1,1,1-tricloroetano/Tris pH=9.0, 0.1 M 99/1, (v/v) como medio y 0.24 mg de enzima/ml (8.85 mg de derivado AGU1-CT/ml). a) Síntesis del dipéptido Ac-L-Phe-L-Leu-NH₂; b) síntesis del dipéptido Ac-L-Phe-L-Ala-NH₂.

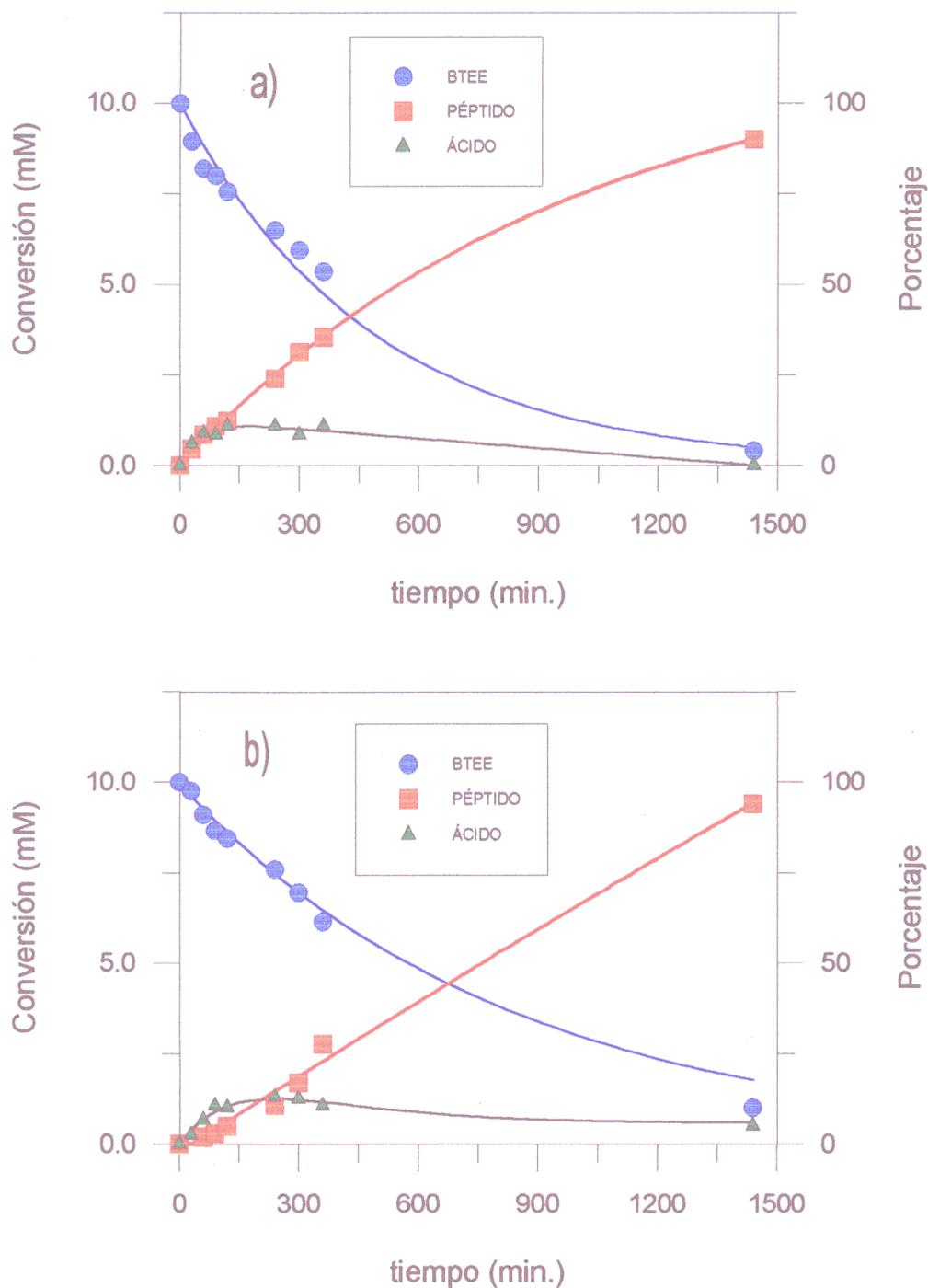


Figura 68,- Influencia del nucleófilo, empleando metilisobutilcetona/Tris pH=9.0, 0.1 M 99/1, (v/v) como medio y 0.24 mg de enzima/ml (8.85 mg de derivado AGU1-CT/ml). a) Síntesis del dipéptido Bz-L-Tyr-L-Leu-NH₂; b) síntesis del dipéptido Bz-L-Tyr-L-Ala-NH₂.

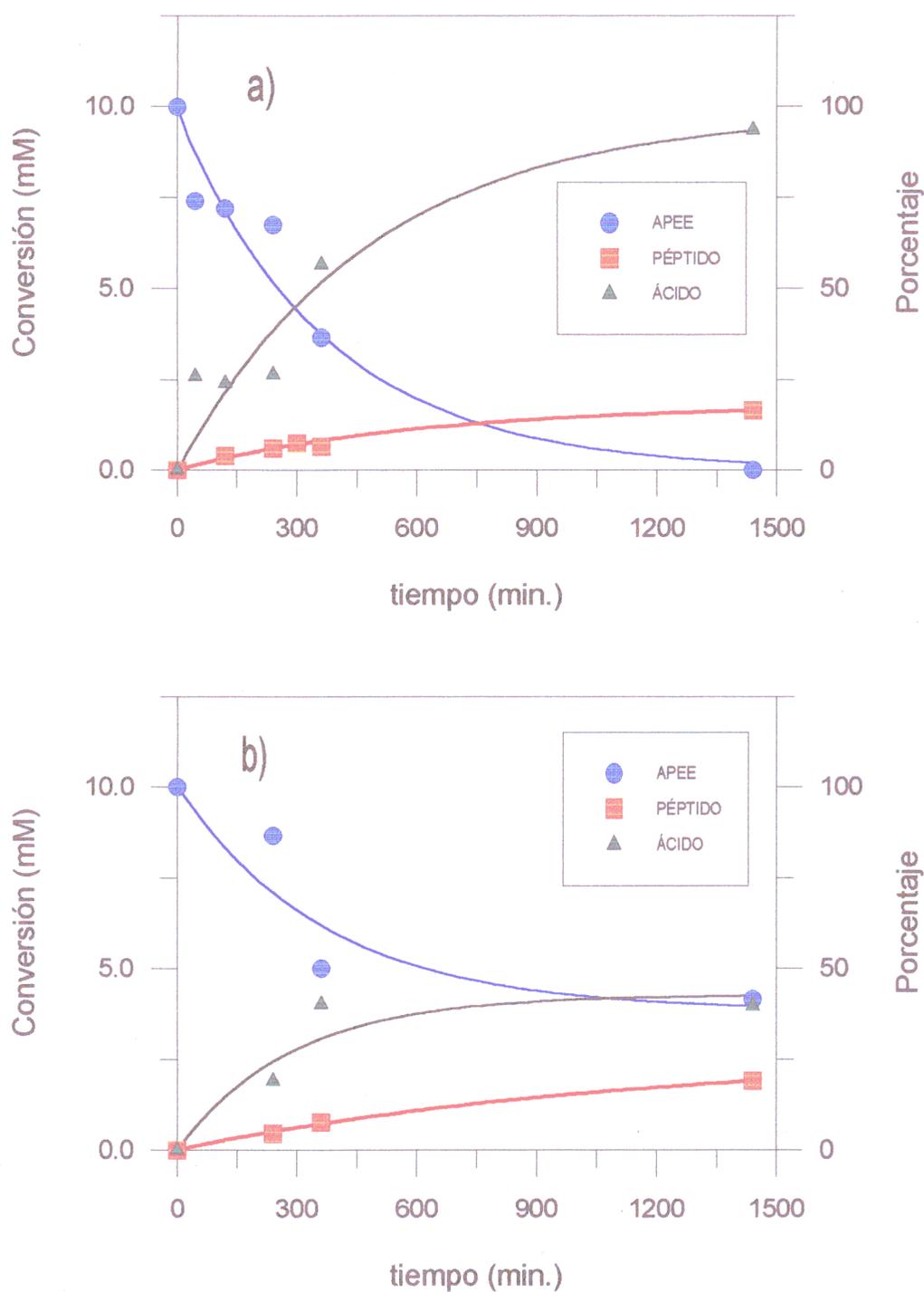


Figura 69,- Influencia del nucleófilo, empleando metilisobutilcetona/Tris pH=9.0, 0.1 M 99/1, (v/v) como medio y 0.24 mg de enzima/ml (8.85 mg de derivado AGU1-CT/ml). a) Síntesis del dipéptido Ac-L-Phe-L-Leu-NH₂; b) síntesis del dipéptido Ac-L-Phe-L-Ala-NH₂.

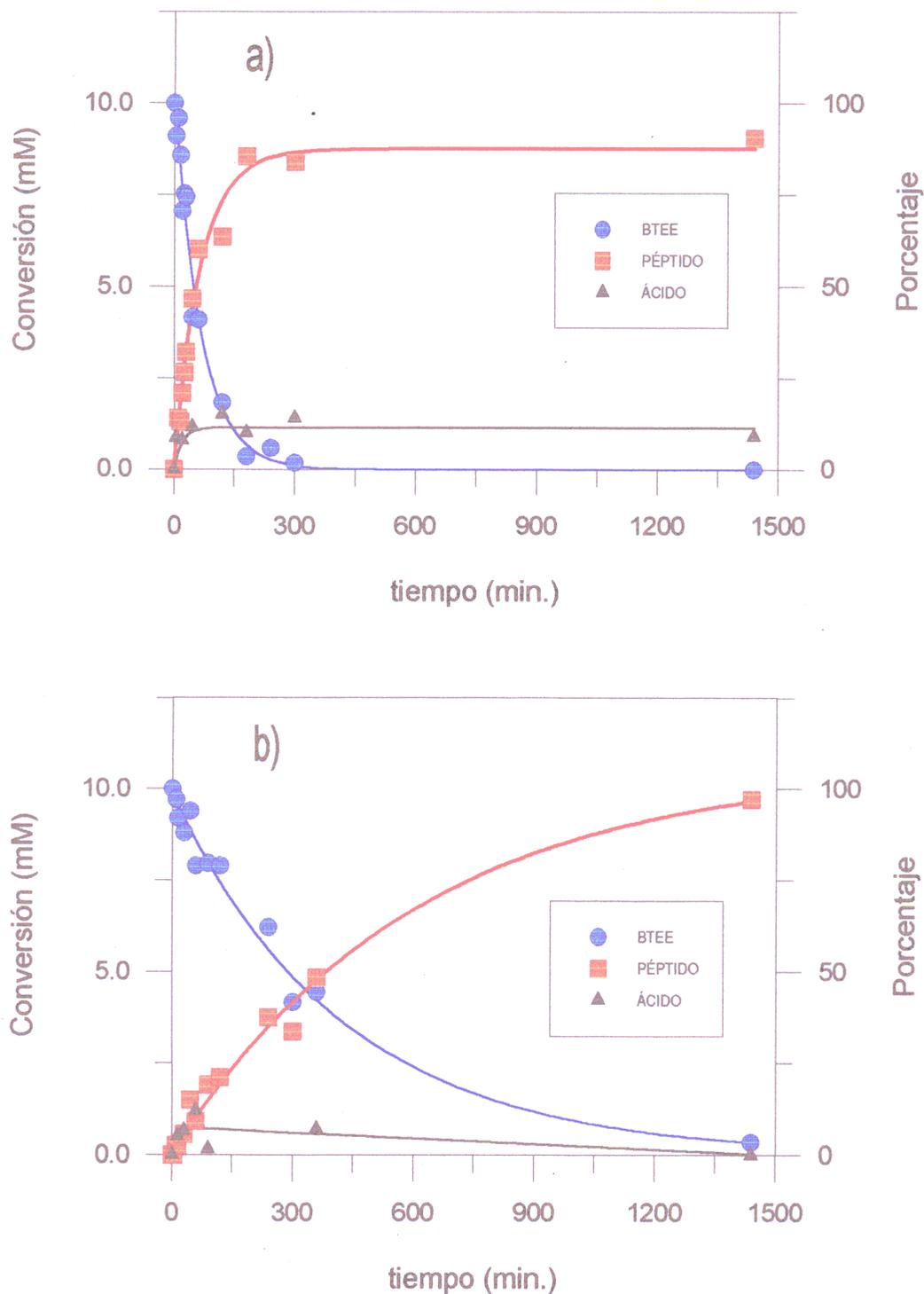


Figura 70,- Influencia del nucleófilo, empleando acetato de etilo/Tris pH=9.0, 0.1 M 99/1, (v/v) como medio y 0.24 mg de enzima/ml (8.85 mg de derivado AGU1-CT/ml). a) Síntesis del dipéptido Bz-L-Tyr-L-Leu-NH₂; b) síntesis del dipéptido Bz-L-Tyr-L-Ala-NH₂.

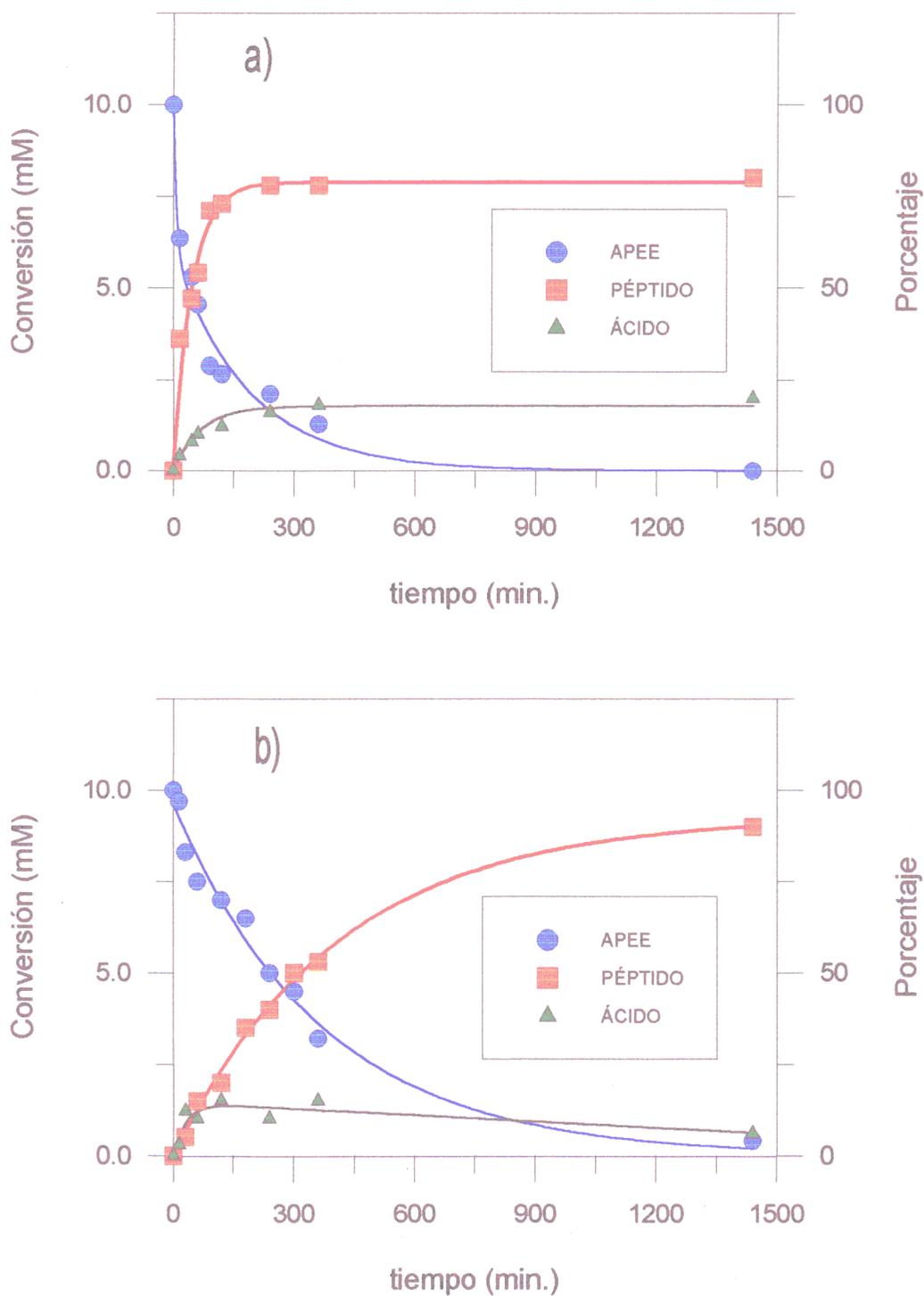


Figura 71,- Influencia del nucleófilo, empleando acetato de etilo/Tris pH=9.0, 0.1 M ζ 9/1, (v/v) como medio y 0.24 mg de enzima/ml (8.85 mg de derivado AGU1-CT/ml). a) Síntesis del dipéptido Ac-L-Phe-L-Leu-NH₂; b) síntesis del dipéptido Ac-L-Phe-L-Ala-NH₂.

Tabla 36.- Influencia de la estructura del donador de acilo y del nucleófilo en síntesis de péptidos, para diferentes disolventes empleando una relación donador de acilo/nucleófilo de 1/4 (M/M), a T=25° C.

Ent	Ácido	Péptido	t (h.)	%Péptido	%Ácido	Pép./Ác.
1 1,1,1-Tricloroetano/Tris pH=9,0, 0.1 M, 99/1, (v/v)						
1a	Bz-L-Tyr-OH	Bz-L-Tyr-L-Leu-NH ₂	5	98	2	46.0
1b	Bz-L-Tyr-OH	Bz-L-Tyr-L-Ala-NH ₂	2	40	60	0.7
1c	Ac-L-Phe-OH	Ac-L-Phe-L-Leu-NH ₂	1 ^a	80	20	4.0
1d	Ac-L-Phe-OH	Ac-L-Phe-L-Ala-NH ₂	6	10	90	0.1
2 Metilisobutilcetona/Tris pH=9,0, 0.1 M 99/1, (v/v)						
2a	Bz-L-Tyr-OH	Bz-L-Tyr-L-Leu-NH ₂	24	90	10	9.0
2b	Bz-L-Tyr-OH	Bz-L-Tyr-L-Ala-NH ₂	24	70	10	7.0
2c	Ac-L-Phe-OH	Ac-L-Phe-L-Leu-NH ₂	24	15	85	0.2
2d	Ac-L-Phe-OH	Ac-L-Phe-L-Ala-NH ₂	24	18	42	0.4
3 Acetato de etilo/Tris pH=9,0, 0.1 M, 99/1, (v/v)						
3a	Bz-L-Tyr-OH	Bz-L-Tyr-L-Leu-NH ₂	5	90	10	9.0
3b	Bz-L-Tyr-OH	Bz-L-Tyr-L-Ala-NH ₂	24	99	1	99.0
3c	Ac-L-Phe-OH	Ac-L-Phe-L-Leu-NH ₂	24	80	20	4.0
3d	Ac-L-Phe-OH	Ac-L-Phe-L-Ala-NH ₂	24	90	6	15.0

^a A tiempos mayores aparece la actividad amidásica

Por otro lado, si comparamos la Fig. 66 y 67, a igualdad de nucleófilo y con el mejor disolvente, vemos también que la Bz-L-Tyr-OEt es mejor donador de acilo que la Ac-L-Phe-OEt, a pesar de que el nitrógeno de este último va acetilado y el del primero benzoilado, teniendo en cuenta que se ha descrito que el impedimento estérico en el nitrógeno dificulta el

proceso de síntesis de péptidos (252). Así pues el -OH fenólico de la tirosina parece ser importante para el reconocimiento del sustrato, pero su efecto no es tan dramático como en el caso de la MIBK.

Por lo tanto, tal y como ocurre con la enzima nativa o modificada químicamente, el Bz-*L*-Tyr-OEt es mejor donador de acilo que la Ac-*L*-Phe-OEt. De ello se deduce que la inmovilización sobre agarosa no altera el patrón de reactividad de la enzima.

Por último debemos decir que el dipéptido Bz-*L*-Tyr-*L*-Ala-NH₂ (**Fig 66b**) es más sensible a la hidrólisis que el Bz-*L*-Tyr-*L*-Leu-NH₂ (**Fig. 66a**), lo cual puede deberse a su menor impedimento estérico y mayor hidrofília que favorecería el que fuera preferentemente reconocido por la enzima inmovilizada sobre la agarosa, soporte eminentemente hidrófilo.

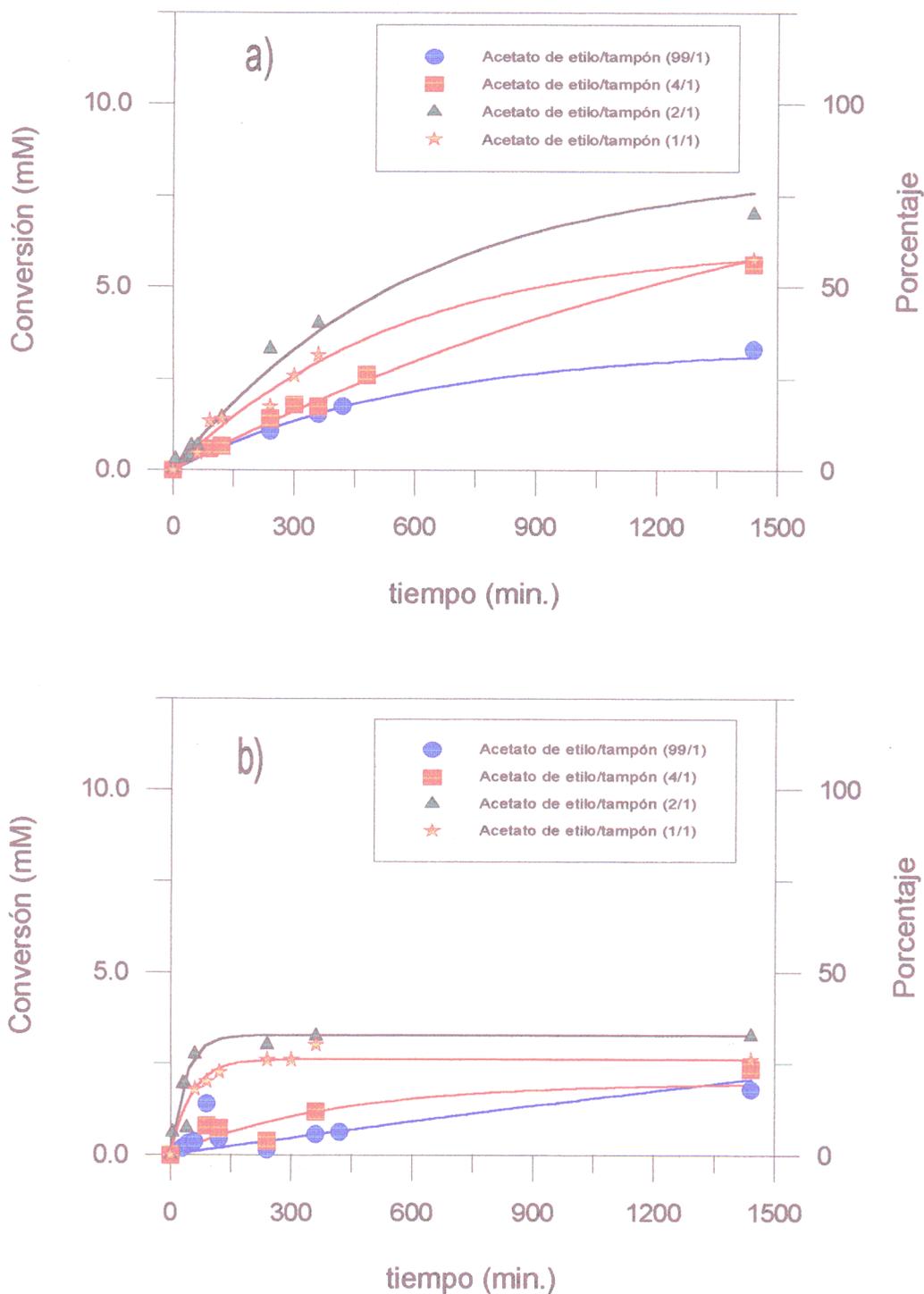
En la **Tabla 36** se resumen los resultados obtenidos al estudiar la influencia de la naturaleza del donador de acilo y del nucleófilo en el proceso de síntesis, trabajando en condiciones de medio orgánico ligeramente hidratado.

De los datos indicados en esta **Tabla 36** puede deducirse que el disolvente óptimo depende del péptido a sintetizar. Así cuando el nucleófilo es lipóide (H-*L*-Leu-NH₂) se recomienda un disolvente de logP > 2 (1,1,1-tricloroetano) (entrada 1a), pero cuanto más hidrófilo es el nucleófilo, menor es la diferencia observada entre uno y otro disolvente; inclusive empleando acetato de etilo (entradas 3) en proporciones elevadas, se obtiene más rendimiento con la *L*-alaninamida que con la *L*-leucinamida, aunque las velocidades de desaparición de éster y de síntesis de péptidos son mayores cuando se utiliza como nucleófilo *L*-leucinamida (**Figuras 70 y 71**).

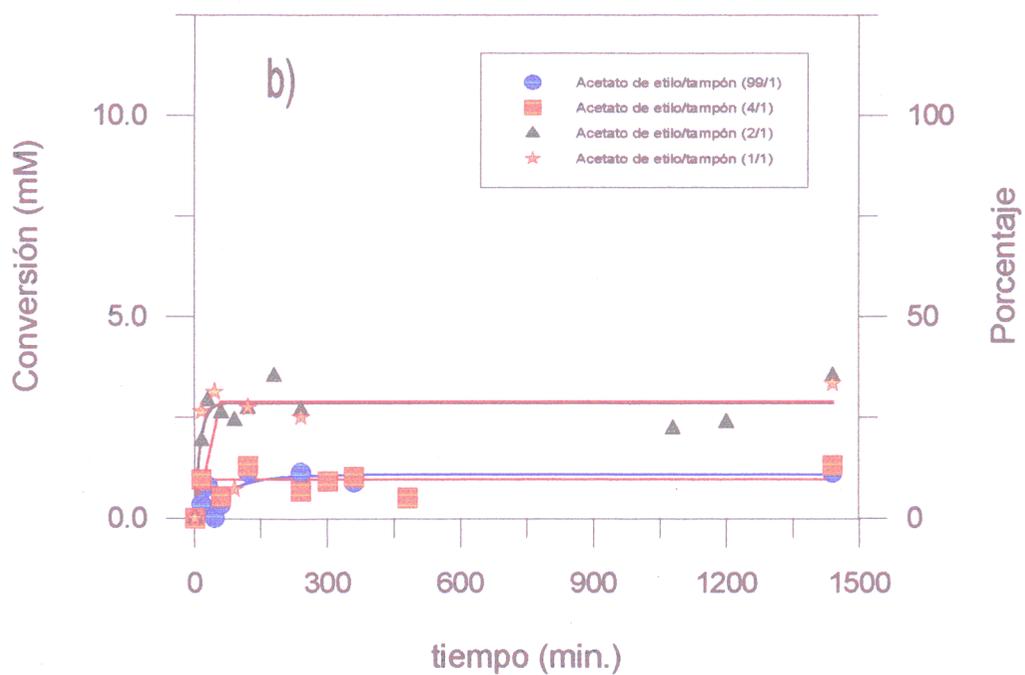
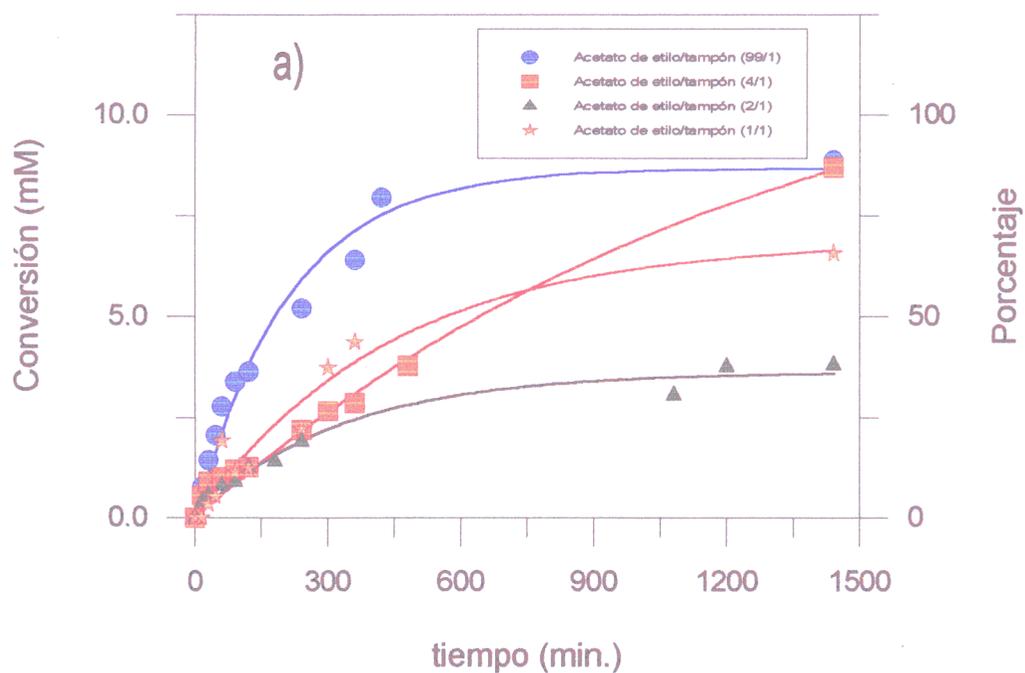
IV.2.3.3.- Influencia del porcentaje de disolvente

En la bibliografía se ha tratado ampliamente el efecto del medio bifásico en la reacción de síntesis de péptidos (159, 164, 181, 268). En esta línea hemos analizado la influencia de la proporción de AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M en la relación péptido/ácido empleando diferentes cantidades de biocatalizador.

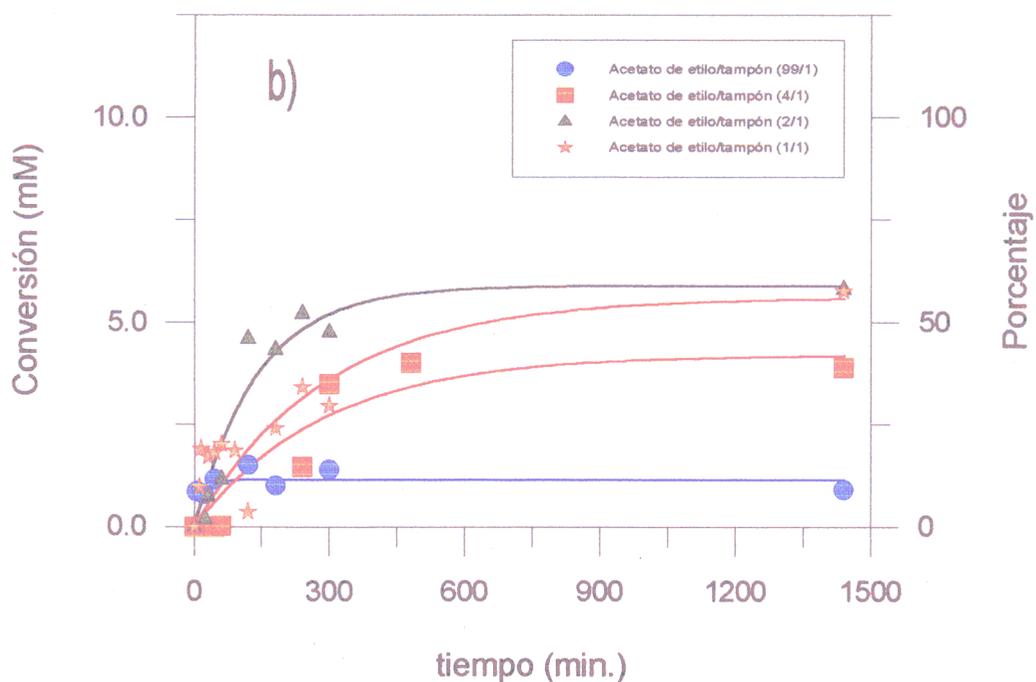
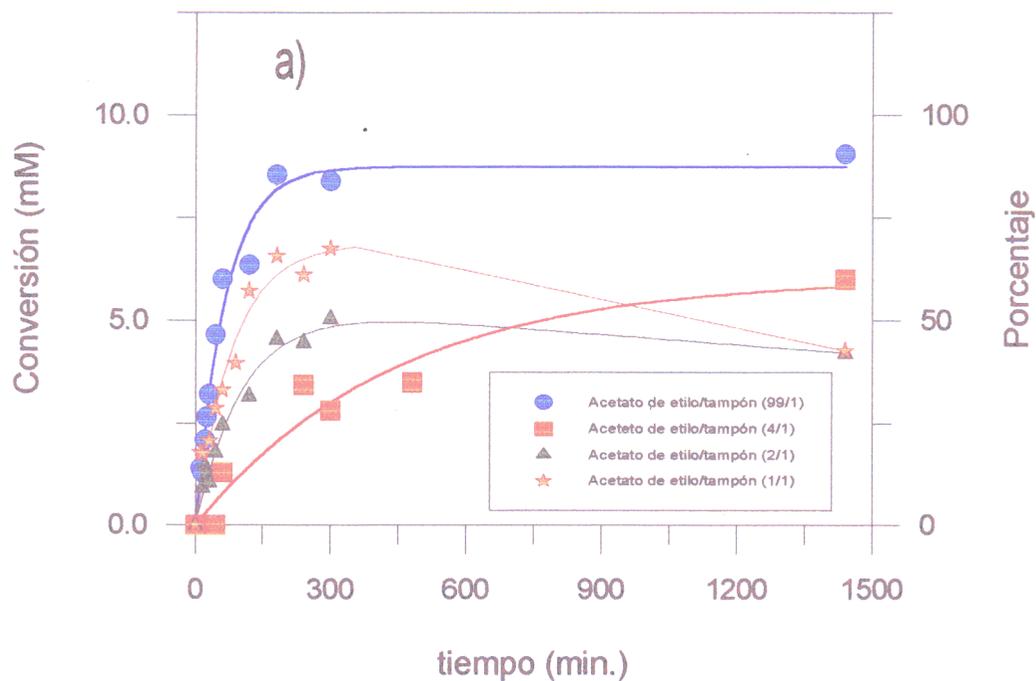
En las **Figuras 72, 73 y 74** se muestran las curvas de progreso obtenidas empleando 3 concentraciones distintas de derivado AGU1-CT (1.6, 3.6, y 8.85 mg de derivado/ml



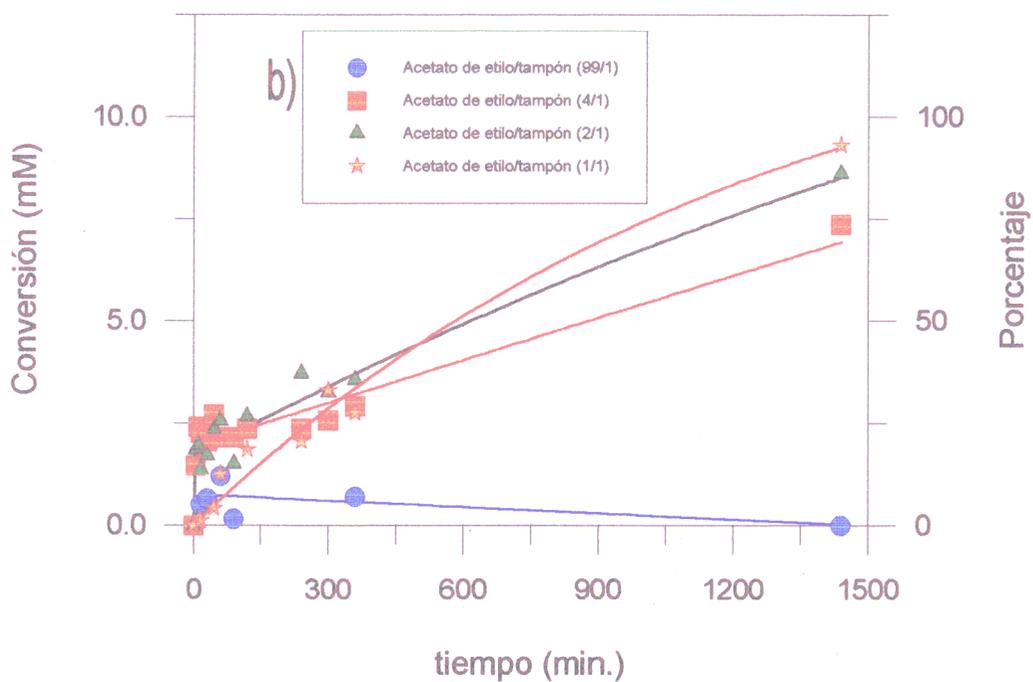
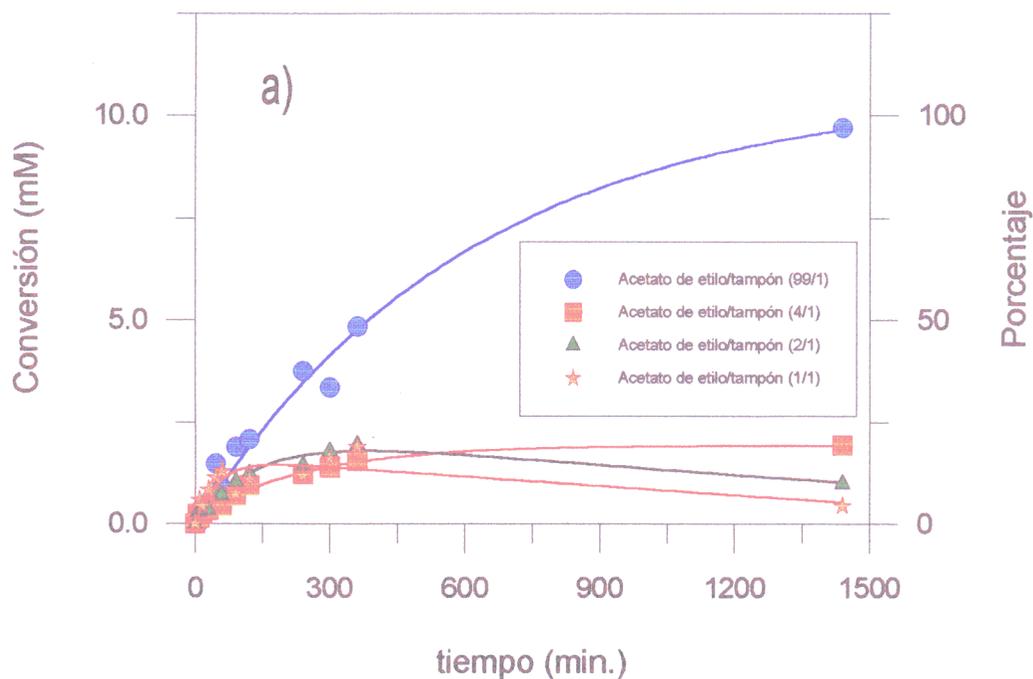
Figuras 72.- Influencia de la proporción de acetato de etilo en la síntesis de Bz-L-Tyr-L-Leu-NH₂, empleando 0.046 mg de enzima/ml (1.6 mg de derivado AGU1-CT/ml) como catalizador. a) Péptido; b) ácido.



Figuras 73.- Influencia de la proporción de acetato de etilo en la síntesis de Bz-*L*-Tyr-*L*-Leu-NH₂, empleando 0.097 mg de enzima/ml (3.4 mg de derivado AGU1-CT/ml) como catalizador. a) Péptido; b) ácido.



Figuras 74.- Influencia de la proporción de acetato de etilo en la síntesis de Bz-L-Tyr-L-Leu-NH₂, empleando 0.24 mg de enzima/ml (8.85 mg de derivado AGU1-CT/ml) como catalizador. a) Péptido; b) ácido.



Figuras 75.- Influencia de la proporción de acetato de etilo en la síntesis de Bz-L-Tyr-L-Ala-NH₂, empleando 0.24 mg de enzima/ml (8.85 mg de derivado AGU1-CT/ml) como catalizador. a) Péptido; b) ácido.

equivalentes a 0.043, 0.097 y 0.24 mg de enzima/ml), mientras que en la **Tabla 37** se resumen los principales parámetros de las mismas.

Tabla 37.- Comparación de la proporción de acetato de etilo en la actividad enzimática del derivado AGU1-CT en la síntesis del péptido Bz-L-Tyr-L-Leu-NH₂ y T=25° C.

Ent.	AcOEt/tampón	tiempo (h.)	% Péptido	% Ácido	Pep./Ac.
1		[Enz]=0.240 mg/ml			
1a	1/1	5*	67	30	2.2
1b	2/1	5*	50	48	1.0
1c	4/1	24	60	40	1.5
1d	99/1	5	90	10	9.0
2		[Enz]=0.097 mg/ml			
2a	1/1	24	65	30	2.2
2b	2/1	24	38	35	1.1
2c	4/1	24	83	15	5.5
2d	99/1	24	85	10	8.5
3		[Enz]=0.046 mg/ml			
3a	1/1	24	65	30	2.2
3b	2/1	24	55	25	2.2
3c	4/1	24	53	20	2.6
3d	99/1	24	30	15	2.0

* A tiempos mayores se observa actividad amidásica

De los datos indicados en la **Tabla 37** deducimos que un aumento en la cantidad de enzima añadida (derivado inmovilizado) reduce, fundamentalmente, el tiempo necesario para

alcanzar la máxima relación péptido/ácido y de igual forma, favorece la acción amidásica. Las mejores relaciones péptido/ácido se consiguen con las concentraciones de enzima más altas, cuando el porcentaje de agua presente en la reacción es mínimo (entradas 1d y 2d). Este resultado parece lógico, debido a la poca cantidad de agua presente en el medio (1%) capaz de competir con el nucleófilo en la deacilación del complejo acil-enzima, para así originar ácido como producto no deseado de la reacción. (159).

Cuando la concentración de enzima es baja (entradas 3), no existe una diferencia apreciable en la relación péptido/ácido al variar el porcentaje de disolvente.

Otro efecto interesante que debe reseñarse, y que se manifiesta más notoriamente cuando las concentraciones de enzima son bajas, es el hecho de que a medida que aumenta el porcentaje de disolvente orgánico, disminuyen las velocidades de síntesis y de hidrólisis (**Figura 72**): después de 24 h. (**Tabla 37**, entrada 3d) sólo se ha consumido un 45% de ester, mientras que en el mismo tiempo, para la misma concentración de enzima y una proporción de 1/1 AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, el ester consumido alcanza el 95%) (entrada 3a). Este hecho está relacionado con una disminución de k_{cat} al descender la cantidad de agua del medio (268), lo cual desactiva la enzima inmovilizada sobre el soporte hidrofílico.

Si empleamos un nucleófilo con carácter más hidrofílico como es la *L*-alaninamida (40 mM) (**Tabla 38**) (**Figura 75**), empleando el derivado AGU1-CT en condiciones similares al estudio realizado con *L*-leucinamida, observamos que los resultados son peores, disminuyendo la actividad de síntesis en todas las proporciones (disolvente/fase acuosa), salvo en 99/1 (v/v), donde se obtienen mejores relaciones péptido/ácido que en el caso de la *L*-leucinamida.

Este hecho debe atribuirse al alto carácter hidrofílico (89% de agua en peso, determinada según Karl-Fischer) del soporte. En estos sistemas con poca adición externa de agua, prácticamente todo el agua presente en el medio se encontrará en las proximidades del derivado, por lo que el reparto del nucleófilo entre las dos fases favorecerá la aproximación de la *L*-alaninamida (más hidrófilo) a las moléculas de enzima, a diferencia de lo que sucede para el nucleófilo H-*L*-Leu-NH₂, el cual es más hidrófobo y por lo tanto permanece en mayor proporción en la fase orgánica, alejado de la enzima.

Tabla 38. - Comparación de la proporción de AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, en la actividad enzimática del derivado AGU1-CT (8.85 mg de derivado/ml equivalentes a 0.24 mg de enzima/ml) en la síntesis del péptido Bz-L-Tyr-L-Ala-NH₂ a 25° C de temperatura.

AcOEt/tampón	tiempo (h.)	% Péptido	% Ácido	Pes./ac.
1/1*	6	19	29	0.6
2/1*	6	20	32	0.6
4/1	6	16	27	0.6
99/1	24	99	1	99.0

* A tiempos mayores se observa actividad amidásica

Si empleamos los derivados AGU2-CT y AGM1-CT, a una concentración de 8.85 mg de derivado/ml, equivalentes a 0.076 mg de enzima/ml en reactor, recordando que éstos presentan mayor actividad específica en la hidrólisis de BTEE (Tabla 34, Sección IV.2.1) observamos que también conducen a una mayor conversión que el derivado AGU1-CT en la síntesis del dipéptido modelo Bz-L-Tyr-L-Leu-NH₂, empleando AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M en proporciones: 97/3, 1/1, (v/v) y tampón Tris saturado con acetato de etilo, como se representa en las Figuras 76 y 77. De igual forma, como ocurría con el derivado AGU1-CT, la velocidad de síntesis aumenta con el porcentaje de medio acuoso (265) (Tabla 39).

La concentración de enzima utilizada en los ensayos realizados con los derivados AGU2-CT y AGM1-CT es relativamente baja (8.85 mg de derivado/ml equivalentes a 0.076 mg de enzima/ml). La misma cantidad de derivado empleada se corresponde, en el caso de AGU1-CT, con una concentración proteica de 0.24 mg de enzima/ml, (Tabla 37, entradas 1). Observando conjuntamente los resultados obtenidos en estas condiciones (Tablas 37 y 39), con los derivados de menor carga enzimática (AGU2-CT y AGM1-CT), se comprueba que el comportamiento del catalizador parece correlacionarse con la cantidad de soporte añadido a la reacción. Así, cuando se trabaja a una concentración de 8,85 mg de derivado/ml, en los tres se obtuvieron porcentajes elevados de dipéptido cuando la cantidad de agua es baja.

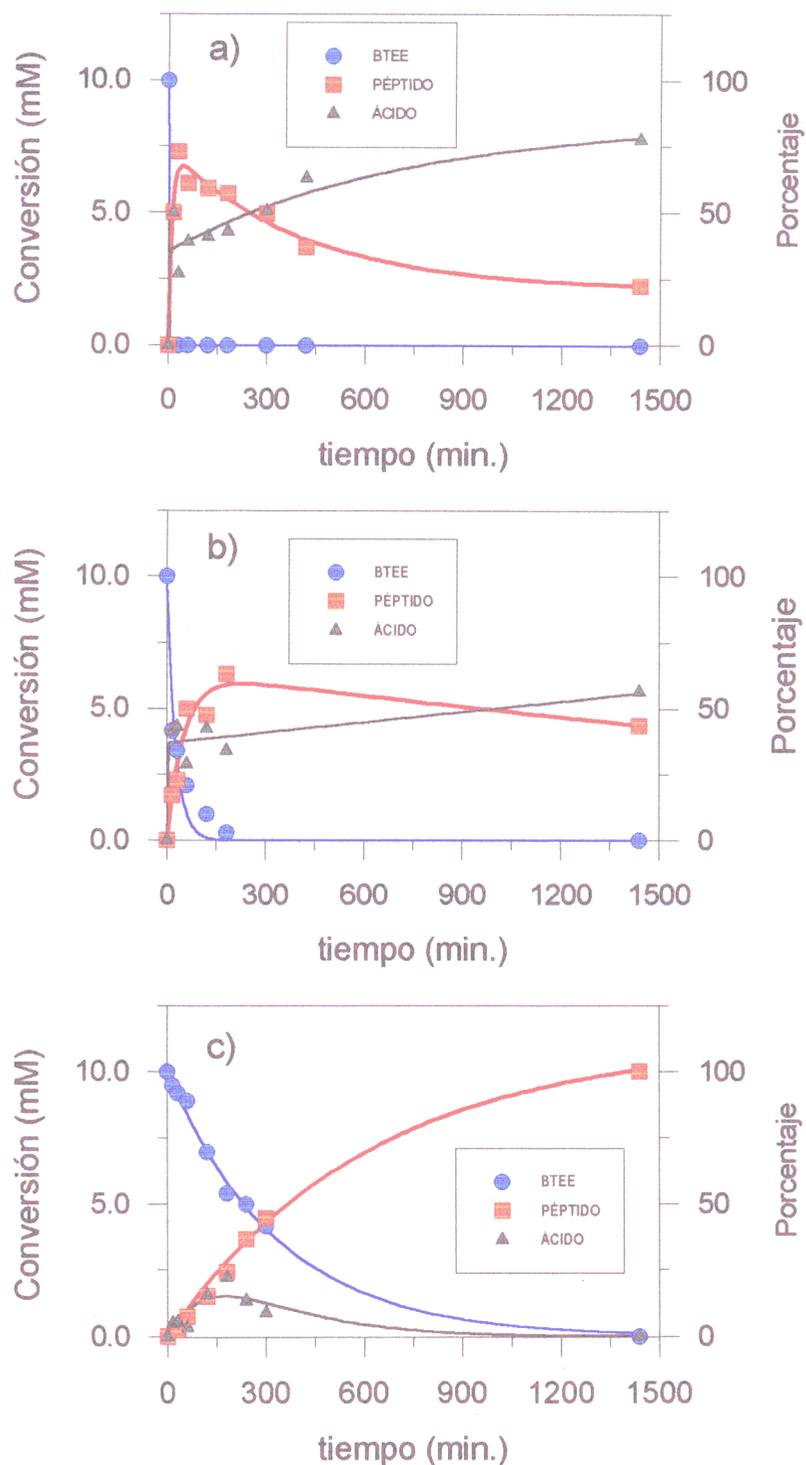


Figura 76.- Síntesis del dipéptido $Bz-L-Tyr-L-Leu-NH_2$, empleando 8.85 mg de derivado AGU2-CT/r1l (0.076 mg de enzima/ml), en un medio AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M. a) Tris pH=9.0, 0.1 M, saturado con acetato de etilo; b) 50/50, (v/v); c) 97/3, (v/v).

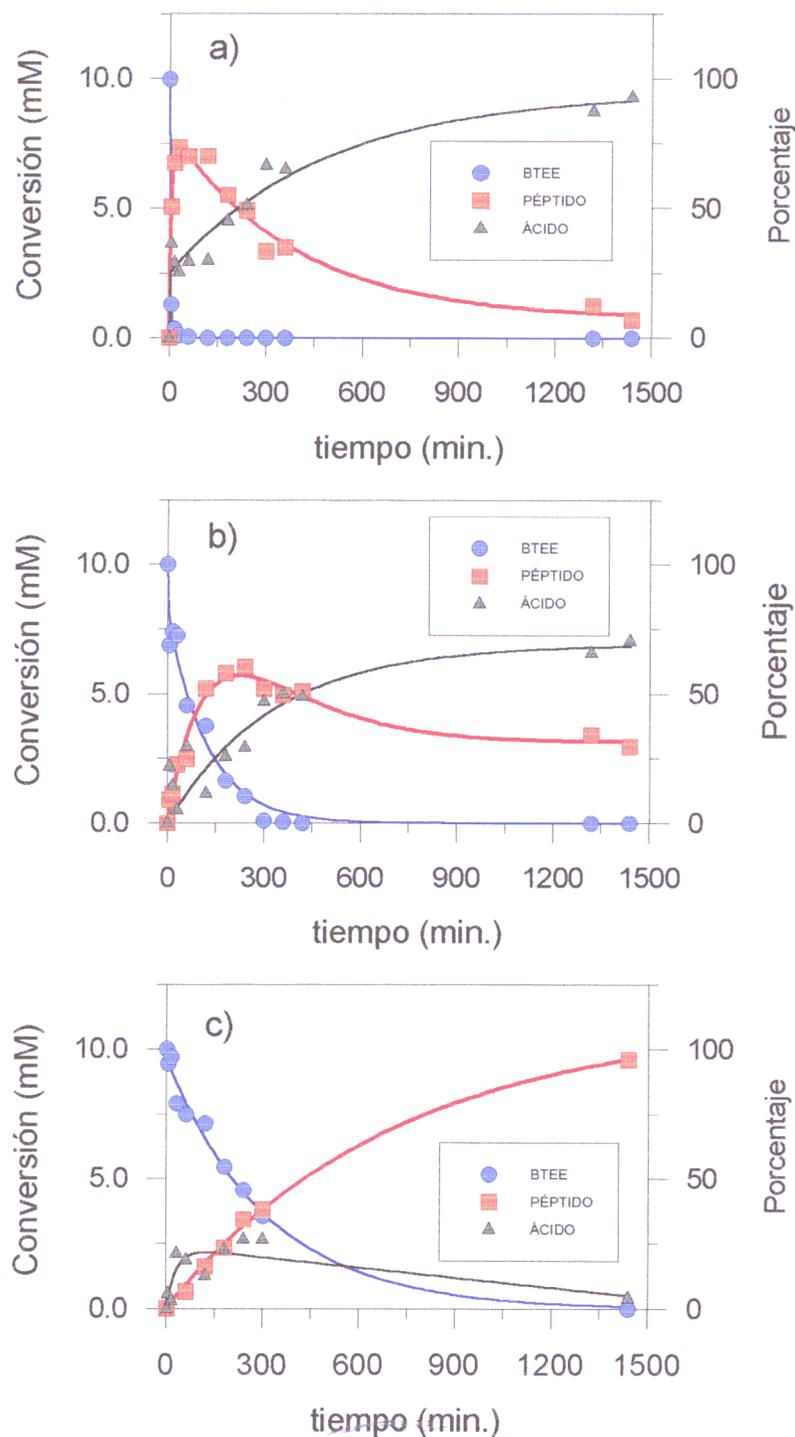


Figura 77.- Síntesis del dipéptido $Bz-L-Tyr-L-Leu-NH_2$, empleando 8.85 mg de derivado AGM1-CT/ml (0.076 mg de enzima/ml), en un medio AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M. a) Tris pH=9.0, 0.1 M, saturado con acetato de etilo; b) 50/50, (v/v); c) 97/3, (v/v).

Tabla 39.- Comparación de la proporción de AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M en la actividad enzimática de los derivados AGU2-CT y AGM2-CT (0.076 mg de enzima/ml equivalentes a 8.85 mg de derivado/ml), en la síntesis del péptido Bz-L-Tyr-L-Leu-NH₂ a 25°C de temperatura.

Ent.	AcOEt/tampón	t (h.)	% Péptido	% Ácido	V ini. ^b	Pépt/Ác.
1 AGU2-CT						
1a	Tampón sat. ^a	0.5*	73	27	0.640	2.7
1b	1/1	3*	63	34	0.142	1.8
1c	97/3	24	99	1	0.018	99.0
2 AGM1-CT						
2a	Tampón sat. ^a	0.5*	74	26	1.497	2.8
2b	1/1	3*	58	25	0.100	2.3
2c	97/3	24	93	5	0.015	18.6

* A tiempos mayores se observa actividad amidásica

^a El medio empleado en esta ocasión es tampón (Tris/HCl pH=9.0, 0.1 M) saturado con acetato de etilo.

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

Asimismo, se puede observar la aparición de la actividad amidásica en las reacciones relacionadas con mayores porcentajes de agua, a diferencia de lo que ocurría con el derivado AGU1-CT empleando concentraciones próximas a 0.076 mg de enzima/ml (Tabla 37 entradas 2 y 3), donde no existía actividad amidásica a lo largo de toda la reacción.

Por otra parte, también se deben considerar los valores de actividad específica de los derivados; así el derivado AGU1-CT (actividad específica 0.07 mM de BTEE min.⁻¹ mg⁻¹ de enzima, Tabla 34) necesita obviamente una mayor concentración de catalizador en el reactor para producir el mismo efecto que los derivados AGU2-CT (3.3 mM min.⁻¹ mg⁻¹ de enzima) y AGM1-CT (2.8 mM min.⁻¹ mg⁻¹ de enzima, Tabla 34), que son más activos.

Resultados similares a éstos se obtuvieron con los derivados de α -quimotripsina

inmovilizada sobre copolímeros (PE/HEMA) siempre y cuando el porcentaje de injerto sea elevado tal y como se indicó en la **Sección IV.1.5.4**.

La desaparición del éster es casi instantánea cuando el porcentaje de agua en el medio de reacción es igual o superior al 50% para ambos derivados AGU2-CT y AGM1-CT (**Figuras 76 y 77**). El medio con menor proporción de agua conduce a las mejores relaciones péptido/ácido (**Tabla 39**, entradas 1c y 2c), aunque el tiempo empleado para ello sea mayor que en otras proporciones disolvente/fase acuosa, tal y como se comentó para AGU1-CT.

Un hecho de gran relevancia es la disminución de la concentración de ácido en la proporción 97/3, (v/v) AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, debido a la aparición de la reacción de síntesis termodinámicamente controlada, aspecto ya comentado al hablar de los derivados de α -quimotripsina inmovilizada sobre copolímeros, y sobre el que profundizaremos al estudiar la influencia de la concentración de nucleófilo en los procesos de síntesis (**Sección IV.2.4**).

En la **Tabla 39** se comparan los derivados AGU2-CT y AGM1-CT, comprobándose que el derivado unipuntual es el que mejor relación péptido/ácido proporciona (relación péptido/ácido=99), para una proporción 97/3, (v/v) AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M (entrada 1c). Estos resultados están obtenidos con una cantidad de enzima activa relativamente baja (0.076 mg de enzima/ml, que se corresponden con 8.85 mg de derivado/ml). Este hecho podría explicarse por la mayor rigidez que presenta el derivado multipuntual, (232, 265).

Si comparamos el comportamiento de ambos derivados unipuntuales en condiciones experimentales similares, AGU1-CT, (**Tabla 37**, entradas 2d y 3d) y AGU2-CT, (**Tabla 39**, entrada 1c), podemos concluir que el derivado menos cargado con mayor actividad específica esto es, AGU2-CT, nos permite obtener una mayor relación péptido/ácido a las 24 h.

IV.2.3.4.- Influencia de la naturaleza del disolvente.

Se han utilizado cinco disolventes de diferentes valores de $\log P$ (234): 1.1.1-tricloroetano ($\log P = 2.49$), metilisobutilcetona ($\log P = 1.38$), acetato de etilo ($\log P = 0.73$), 1.4-butanodiol ($\log P = -0.92$), y N,N-dimetilformamida ($\log P = -1.01$), a fin de determinar la influencia del carácter hidrófobo/hidrófilo del disolvente en la actividad de los derivados inmovilizados sobre agarosa. En todos los casos se empleó la proporción

disolvente/fase acuosa 99/1 (v/v), por ser la que mejores resultados nos había dado anteriormente. Los resultados aparecen en la **Figura 78**.

Puede observarse (**Figura 78**) que en estas condiciones, empleando 8.85 mg de derivado AGU1-CT/ml, equivalentes a 0.24 mg de enzima/ml, el disolvente más lipóide (1,1,1-tricloroetano) es el que mejores rendimientos nos proporcionó, como ya sucedió con la enzima libre y con los derivados de α -quimotripsina inmovilizada sobre copolímeros de injerto (**Sección IV.1.5.3**).

Por otra parte, no se obtuvo conversión con los disolventes más hidrófilos (N,N-dimetilformamida y 1,4-butanodiol), ya que estos retienen la pequeña cantidad de agua presente en el medio de reacción. Este hecho está de acuerdo con los resultados indicados por Clapés y cols (159): estos autores constatan que en presencia de medios inmiscibles en agua, las máximas conversiones se alcanzan con porcentajes variables (entre 0.1-3%) de fase acuosa, mientras que cuando el disolvente es miscible con agua, se necesitan proporciones de agua mayores al 4%. Otros miembros de nuestro grupo, utilizando derivados de α -quimotripsina inmovilizada sobre agarosa, muy similares a los nuestros, han obtenido buenos rendimientos (50% de péptido en 45 minutos) (209) empleando un 40% de DMF y un 60% de tampón pH=9.0 lo que nos indica que, cuando el disolvente es hidrófilo, se necesita mayor cantidad de agua para obtener rendimientos óptimos.

Por tanto, el disolvente que presenta un valor de $\log P > 2$, proporciona las mayores conversiones tal como se refleja en la bibliografía para otros derivados (233, 269). La escasa conversión obtenida con la metilisobutilcetona ($\log P = 1.38$) en comparación con el acetato de etilo ($\log P = 0.73$), como se comentó en la **Sección IV.2.3.2** debe interpretarse, no en función de consideraciones de hidrofóbia/hidrofilia, sino en función de la reactividad química del disolvente hacia los grupos amino libres de la enzima inmovilizada, que provocará una alteración de la superficie de la enzima transformando los grupos hidrófilos ($-\text{NH}_2$ expuestos) en grupos lipóides, por la formación de bases de Schiff, lo cual origina un cambio conformacional de la enzima, obteniéndose una especie presumiblemente menos activa en el proceso. Esta alteración química por formación de iminas ha sido descrito en la bibliografía (259, 270).

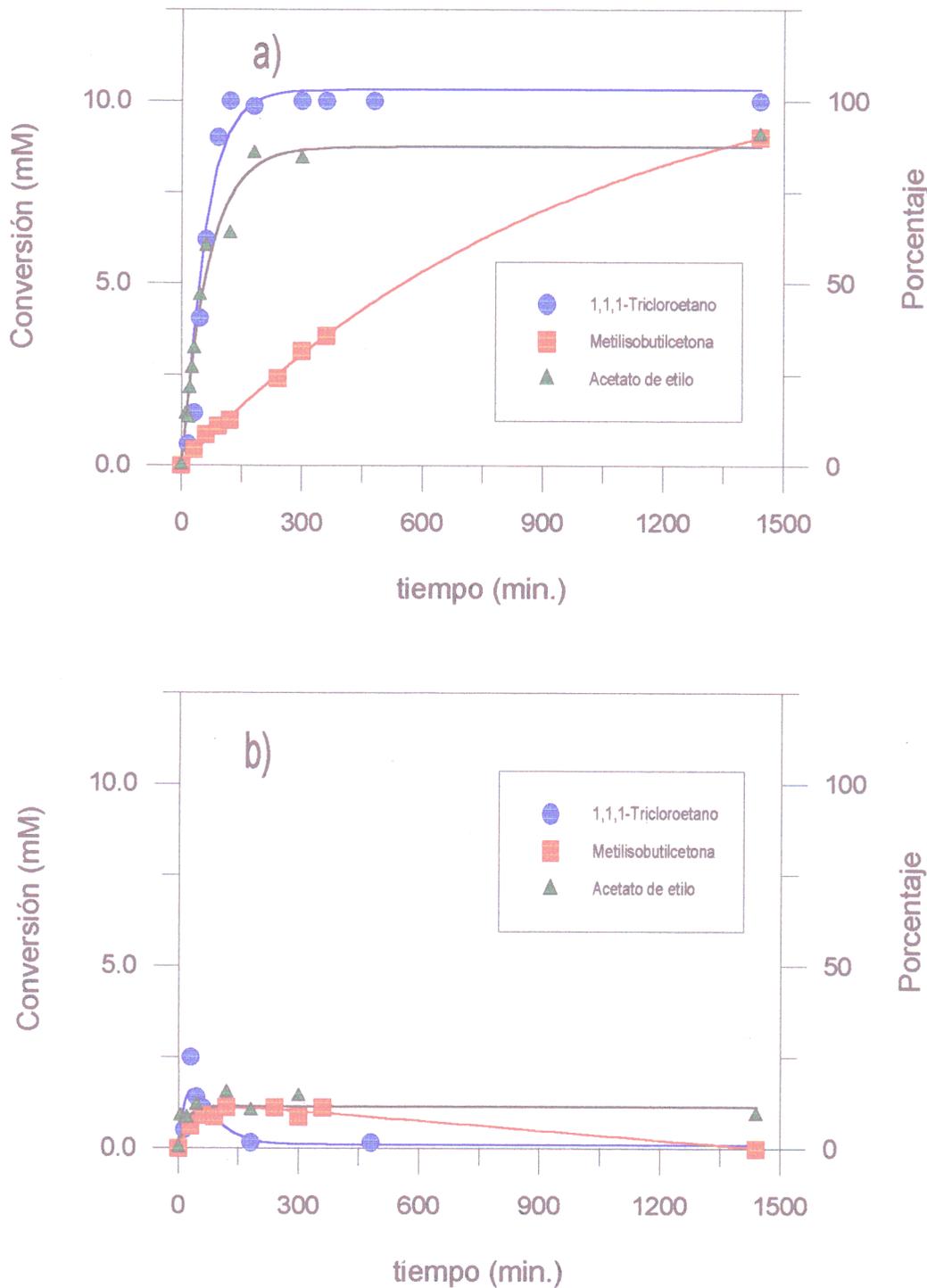


Figura 78.- Influencia de la naturaleza del disolvente en la síntesis del dipéptido $Bz-L-Tyr-L-Leu-NH_2$, empleando 0.24 mg de enzima/ml (8.85 mg del derivado AGU1-CT) en una proporción de medio (99/1, v/v) disolvente/(tampón Tris/HCl pH = 9.0 0.1 M). a) Péptido; b) ácido.

Esto demuestra que además de las propiedades fisicoquímicas de un disolvente, debemos considerar su posible reactividad hacia el derivado enzimático, tal y como se ha puesto de manifiesto en nuestro grupo de trabajo (138a, 271) y ha sido contrastado por otros autores (272, 273).

Resumiendo, podemos decir que cuando se lleva a cabo la reacción de síntesis peptídica empleando derivados inmovilizados sobre agarosa, el mejor medio será aquel que contenga poca agua, un disolvente muy lipóide y una baja o moderada cantidad de enzima activa.

IV.2.3.5.- Influencia de la concentración de donador de acilo.

Los resultados del estudio de la influencia de la concentración del donador de acilo (desde 0 hasta 20 mM) en la velocidad de la reacción de síntesis del péptido Bz-*L*-Tyr-*L*-Leu-NH₂ para ambos derivados AGU2-CT y AGM1-CT aparecen en la **Figura 79** y en la **Tabla 40**. Donde se puede observar como estos derivados presentan un comportamiento diferente, debido presumiblemente a la diferente estructura del biocatalizador, aunque observando detenidamente la escala del eje de velocidades iniciales, parece que no existe gran diferencia entre ambos derivados.

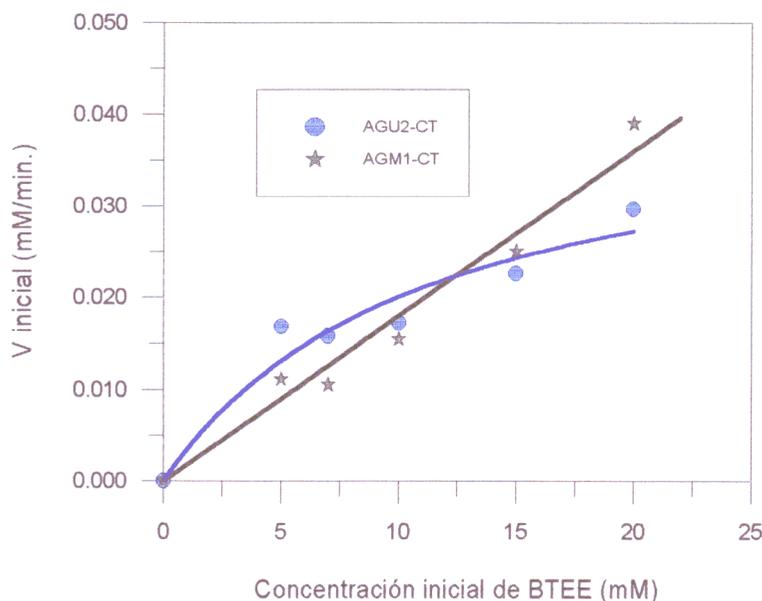


Figura 79.- Variación de la velocidad inicial de síntesis del dipéptido Bz-*L*-Tyr-*L*-Leu-NH₂, en función de la concentración de donador de acilo, *L*-leucinamida 40 mM, AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 97/3, (v/v).

Tabla 40.- Resumen de los parámetros del ajuste en la variación de la concentración de donador de acilo.

Derivado	Pendiente (min. $\times 10^{-3}$)	Ordenada en el origen	R ²
AGU2-CT	0.9 \pm 0.2	0.010 \pm 0.005	0.910
	V _{max} (mM/min.)	K _m	
AGM1-CT	0.04 \pm 0.01	11 \pm 5	0.935

* Con un 99% de confianza la ordenada no es significativa.

En el caso del derivado AGM1-CT los datos nos situarían en el tramo inicial de una curva michaeliana lo que implica un proceso de pseudo primer orden, que se produce, según las clásicas consideraciones de la cinética enzimática, cuando la concentración de sustrato empleada es mucho menor que K_m. Así, debido a que la concentración de donador de acilo empleada no satura en ningún momento al catalizador, el aprovechamiento del mismo es prácticamente óptimo. Pero por otra parte, el derivado AGU2-CT parece que se comporta de forma distinta saturandose pronto, obteniendo bajos valores de V_{max} y K_m aparentes.

IV.2.3.6.-Influencia de la concentración de nucleófilo en la síntesis peptídica

Como ocurrió con los derivados preparados con los soportes (PE/HEMA), se ha realizado un estudio variando la concentración de nucleófilo (H-L-Leu-NH₂) desde 5 mM hasta 50 mM, manteniendo fija la concentración de BTEE en 10 mM, empleando los derivados AGU2-CT y AGM1-CT en un medio AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 97/3, (v/v). Los resultados aparecen representados en las **Figura 80 y 81** y en la **Tabla 41**; mientras que la **Figura 81** recoge una gráfica de la variación de velocidad inicial de la síntesis péptidica frente a la variación de la concentración de nucleófilo, en la **Figura 80** se representan las curvas de progreso en el transcurso de la reacción con los derivados AGU2-CT y AGM1-CT para 5, 10 y 50 mM de L-leucinamida.

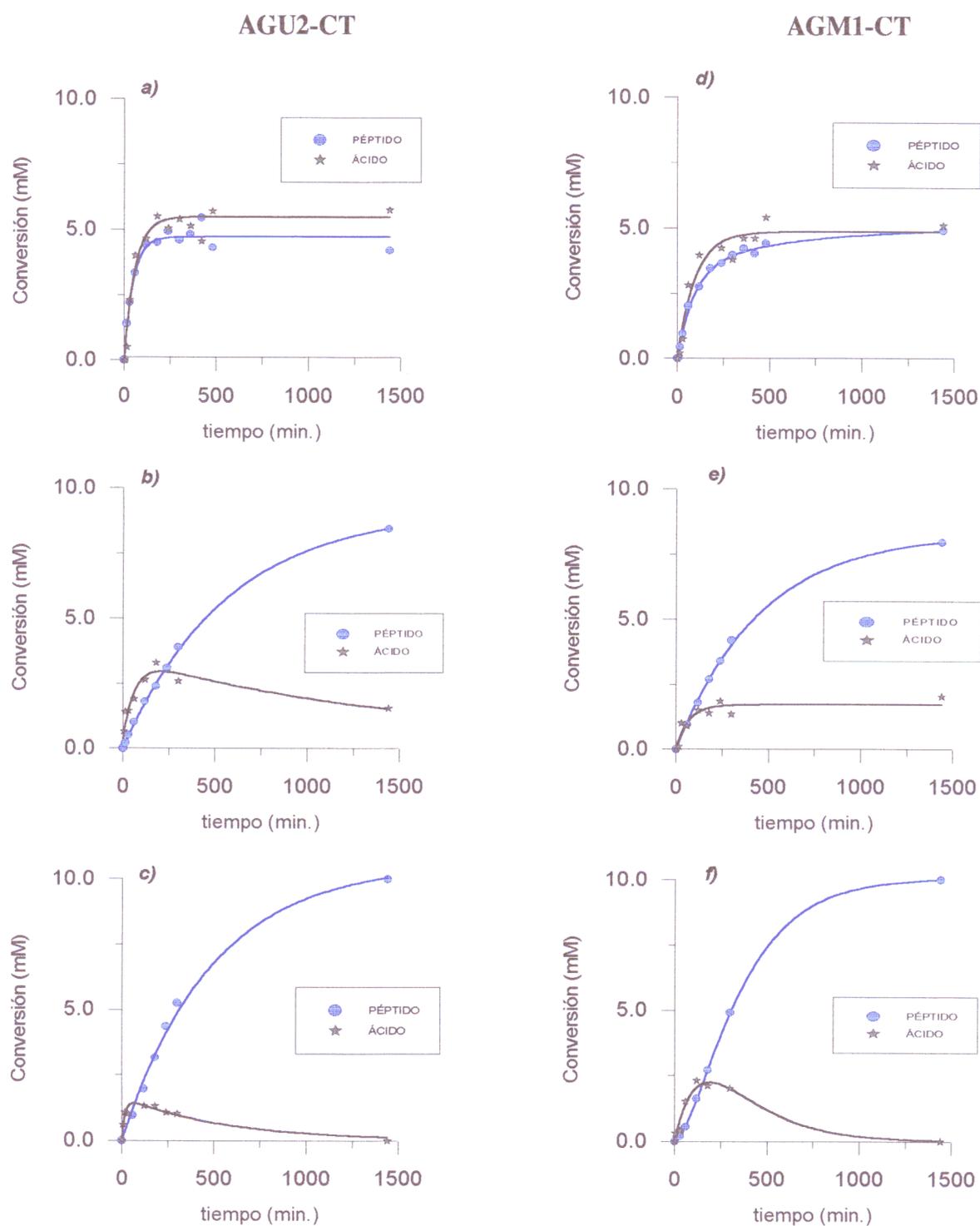


Figura 80.- Síntesis del dipéptido Bz-*L*-Tyr-*L*-Leu-NH₂, empleando 8.85 mg de derivado/ml (0.076 mg de enzima/ml), en un medio AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M 97/3, (v/v) a diferentes concentraciones de nucleófilo. Para el derivado AGU2-CT a) 5 mM; b) 10 mM y c) 50 mM. Para el derivado AGM1-CT d) 5 mM; e) 10 mM; f) 50 mM.

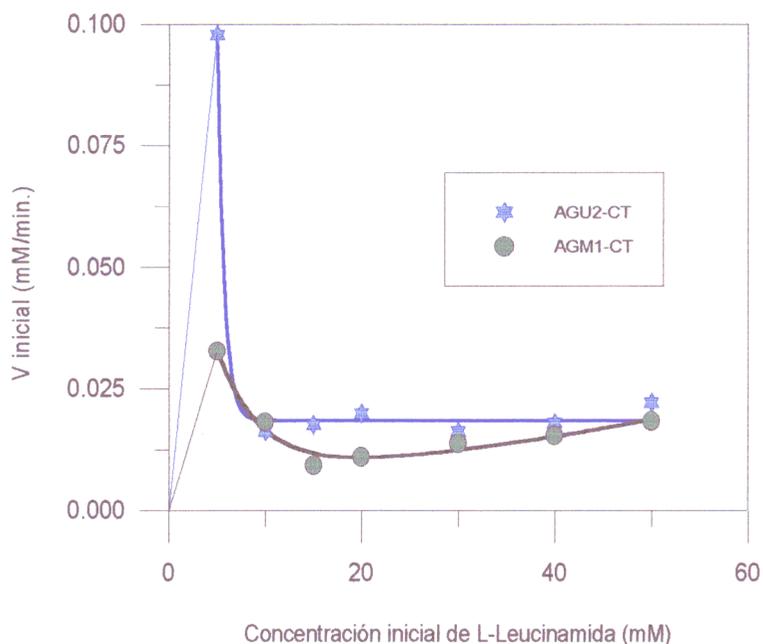


Figura 81.- Variación de la velocidad inicial de síntesis del dipéptido $Bz-L-Tyr-L-Leu-NH_2$, en función de la concentración de nucleófilo (40 mM) empleando los derivados AGU2-CT y AGM1-CT (8.85 mg de derivado/ml equivalentes a 0.24 mg de enzima/ml) y como medio de reacción AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M 97/3, (v/v).

Se pudo comprobar cómo el nucleófilo actúa en todo el intervalo de concentraciones como un inhibidor, según se observa en la **Figura 81**, pues al aumentar la concentración de *L*-leucinamida la velocidad inicial de síntesis disminuye. A diferencia de lo que sucedía con los derivados obtenidos sobre soportes poliméricos en los que el comportamiento del nucleófilo era función de su concentración en la reacción (**Ver Figura 52**).

Esta evidente diferencia que existe entre ambos derivados es debida a la composición de los soportes y a la solubilidad que presenta el nucleófilo ($\log P = -0.21$) (159) en el microentorno de la enzima. Así, los derivados preparados con geles de agarosa (con $\approx 89\%$ de agua en su composición como ya hemos comentado), poseen en sus inmediaciones prácticamente todo el agua presente, por lo que la mayoría del nucleófilo se encontrará en las inmediatas proximidades de la enzima.

Esta saturación del microentorno con $H-L-Leu-NH_2$ dificulta el acceso del donador de acilo al subsitio ρ_2 ("ar") del centro activo, creándose una competencia entre el nucleófilo y el donador de acilo.

Tabla 41.- Influencia de la variación de la concentración de nucleófilo en la síntesis del dipéptido modelo Bz-L-Tyr-L-Leu-NH₂, empleando AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 97/3, (v/v) como medio de reacción a una concentración constante de 10 mM de BTEE, y con 8.85 mg de derivado/ml equivalentes a 0.076 mg de enzima/ml.

Ent.	[H-L-Leu-NH ₂] (mM)	t (h.)	% Péptido	% Ácido	V. Ini. ^a	Pép./Áci.
1 Derivado AGU2-CT						
1a	5	6	48	52	0.098	0.9
1b	10	24	85	15	0.016	5.7
1c	15	24	99	1	0.018	99.0
1d	20	24	96	4	0.020	24.0
1e	30	24	98	2	0.016	49.0
1f	40	24	99	1	0.018	99.0
1g	50	24	99	1	0.022	99.0
2 Derivado AGM1-CT						
2a	5	24	49	51	0.032	1.0
2b	10	24	80	20	0.018	4.0
2c	15	24	91	9	0.009	10.1
2d	20	24	80	20	0.011	4.0
2e	30	24	72	22	0.014	3.3
2f	40	24	96	4	0.015	24
2g	50	24	99	1	0.018	99

^a Velocidad inicial de síntesis de péptido, expresada en mM/min.

Este hecho viene corroborado por la obtención de la máxima velocidad inicial de síntesis peptídica en la mínima concentración de nucleófilo (Tabla 41 entradas 1a y 2a).

Observando el aspecto de las curvas de progreso obtenidas (Fig. 80 c, f), puede

apreciarse la presencia de procesos de síntesis bajo control termodinámico, con los porcentajes más elevados de nucleófilo, como se deduce de la desaparición del ácido formado en dichas condiciones (**Fig. 80 f**).

Realizando un estudio similar al llevado a cabo por Jakubke *y cols* (145) para conocer la afinidad del nucleófilo por el catalizador, se representaron como en el caso de los derivados de α -quimotripsina inmovilizada sobre copolímeros, la relación ácido/péptido en función del logaritmo Neperiano de un cociente de concentraciones de nucleófilo (**Sección IV.1.5.7**), para obtener el parámetro de afinidad nucleófilo-biocatalizador. Pero al igual que sucedía con los derivados inmovilizados sobre copolímeros de injerto los derivados AGU2-CT y AGM1-CT no muestran ningún comportamiento lineal, debido a la presencia de la reacción termodinámica.

IV.2.4.- REACCIONES DE SÍNTESIS DE PÉPTIDOS TERMODINÁMICAMENTE CONTROLADAS

En el apartado anterior se ha justificado la disminución del ácido producido en la reacción en condiciones 97/3, (v/v) medio orgánico fase acuosa, con un exceso de uno de los sustratos (nucleófilo), atendiendo a la posible existencia de una reacción en la que el ácido fuese el sustrato (Síntesis Termodinámicamente Controlada) (Introducción, **Sección I.1.4**). Para corroborar nuestra teoría, se realizaron ensayos con los derivados AGU2-CT y AGM1-CT (8.85 mg de derivado/ml, equivalentes a 0.076 mg/ de enzima/ml), en condiciones en las que el único donador de acilo presente fuese el ácido. Para ello, se empleó como sustrato la N-acetil-*L*-tirosina (Ac-*L*-Tyr-OH), tal y como se reseñó en la Parte Experimental (**Sección III.7.3**). Los resultados quedan reflejados en la **Figura 82** en la cual podemos observar la síntesis de aproximadamente un 50% de dipéptido Ac-*L*-Tyr-*L*-Leu-NH₂ en estas condiciones, tal y como ocurría con los derivados de α -quimotripsina inmovilizada sobre copolímeros (PE/HEMA) de injerto (48% de dipéptido en 240 minutos) (**Sección IV.1.6**).

Como puede verse en la **Fig. 82** existe un periodo de inducción de aproximadamente 500 minutos, en el cual no se produce la aparición apreciable de péptido en ninguno de los dos procesos biocatalizados con el derivado unipuntual ó multipuntual.

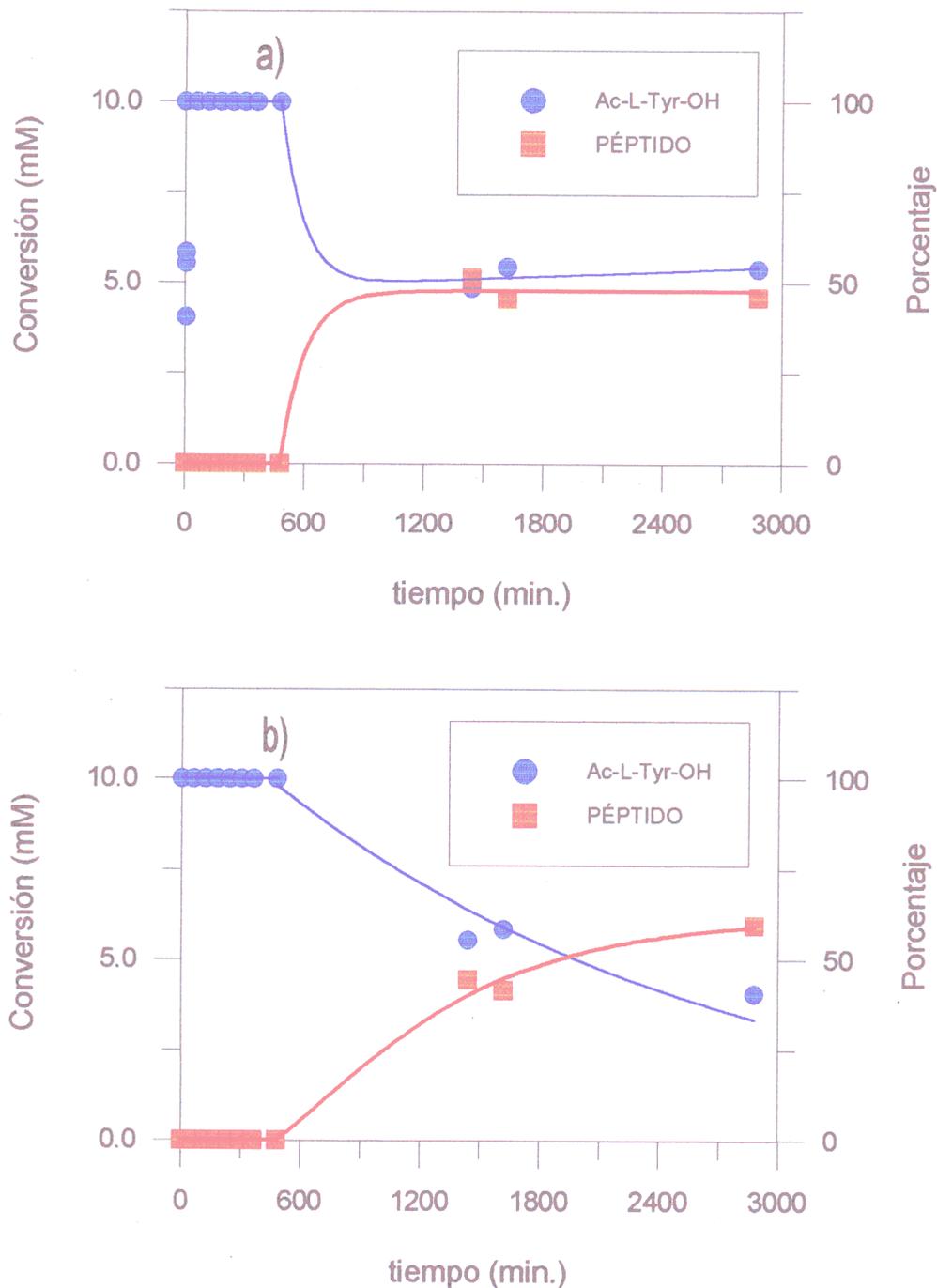


Figura 82.- Síntesis del dipéptido Ac-*L*-Tyr-*L*-Leu-NH₂, bajo control termodinámico, empleando el ácido Ac-*L*-Tyr-OH (10 mM) como donador de acilo y *L*-leucinamida (50 mM) como nucleófilo; medio de la reacción: AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 97/3, (v/v) a) 8.85 mg del derivado AGU2-CT/ml (0.076 mg de enzima); b) 8.85 mg del derivado AGM1-CT/ml (0.076 mg de enzima).

Numerosos ensayos demuestran que la naturaleza del soporte influye en el comportamiento de los derivados enzimáticos en la síntesis termodinámicamente controlada (206, 217, 274). Mientras que empleando los derivados obtenidos sobre los geles de agarosa como soportes se necesita un periodo de inducción muy largo, los derivados inmovilizados obtenidos empleando copolímeros como soportes catalizan la síntesis de péptidos ya desde el principio, llegando a un máximo del 48% en péptido en 4 horas y posteriormente disminuyendo hasta un 20% después de 48 horas, tal y como se indicó en la **Sección IV.1.6**.

Este comportamiento puede atribuirse al diferente carácter de los soportes (hidrófilo para la agarosa e hidrófobo para los copolímeros), y al pH de la fase acuosa (pH=9.0). Este elevado pH hace que el ácido se encuentre fundamentalmente en su forma aniónica, inerte, en la fase acuosa (**Esquema 18**) (**Sección I.4.3.1**). Según esto, la especie más hidrófila e inerte (forma aniónica) está cerca del derivado inmovilizado sobre agarosa (hidrófilo), mientras que una pequeña cantidad de forma sin ionizar y activa en este tipo de síntesis (forma -COOH, más lipóide) se encuentra en el disolvente lejos del derivado. Ello justifica la presencia de un período de inducción en este caso, que corresponde al proceso de difusión de la forma no ionizada hacia el derivado inmovilizado sobre agarosa. A medida que comienza la reacción, el equilibrio de la síntesis termodinámica se desplaza a la derecha (**Esquema 17**) (**Sección I.4.2**) y la reacción progresa.

Este periodo de inducción no se observa en los derivados enzimáticos inmovilizados sobre soportes poliméricos (lipóides) que atraen a la forma sin ionizar (activa) y repelen a la ionizada (inactiva).

Como ya hemos comentado en la (**Sección I.4.3.1**) es fundamental el pH en este tipo de reacciones ya que existe un grupo ácido -COOH (donador de acilo) y un residuo básico -NH₂ (nucleófilo) capaces de ionizarse en función del pH. Así pues, debemos optar por una situación de compromiso: por un lado, si el pH es ácido el donador de acilo estará protonado (forma no iónica, activa), pero el nucleófilo también estará protonado (NH₃⁺, inactivo); en cambio, si el pH es alcalino sucede a la inversa: el nucleófilo se encuentra en forma no ionizada (activa) y el donador de acilo desprotonado (inactivo). Por lo tanto, hay que tener en cuenta los pKs de los sustratos y emplear un pH en el cual la concentración de las formas no iónicas sea máxima, lo que generalmente implica un pH próximo a la neutralidad.

IV.3.- SUSTRATOS NO NATURALES

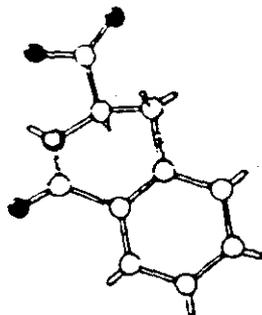
IV.3.1.- INTRODUCCIÓN

Para poder comprender los resultados obtenidos con los sustratos no naturales ensayados, empleando la enzima libre y nuestros derivados inmovilizados, se completará en primer lugar lo expuesto en la Introducción General sobre la selectividad de la α -quimotripsina (Sección I.3.4) con algunos ejemplos que ilustren el tema.

IV.3.1.1.- Sustratos cíclicos derivados de 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina

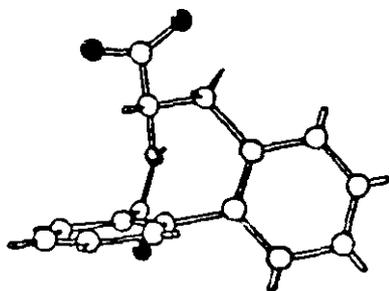
Niemann, Cohen y cols. han estudiado una serie de sustratos cíclicos de α -quimotripsina de especial interés dado que su rigidez estructural permite visualizar mejor el complejo acil-enzima. El 1-oxo-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxilato de metilo fue el primer sustrato de esta serie descrito (Esquema 32, a) (275). La enzima presenta una gran especificidad por los estereoisómeros *D*, puesto que se ha comprobado que para ellos el valor de K_m es 25 veces menor y el de k_{cat} es 200 veces mayor que para la *L*-fenilalanina (105). Más tarde, se vió que la amida cíclica que se une al carbono- α se podía reemplazar por un resto éster sin perjudicar la elevada reactividad del sustrato (276), y se dedujo que este grupo no se situaba en el lugar normal "am" destinado al grupo acilamido. Considerando la teoría de la disposición tetraédrica del lugar de enlace, la conclusión más razonable es que la zona aromática de la isoquinolina debe situarse en el lugar "ar" y el éster metílico se sitúa en el lugar "n", para lo cual los sustratos *D* fuerzan al enlace de la amida cíclica o del éster a situarse en el lugar "h" (276). Esto es mucho más fácil de entender cuando se considera que el lugar "h" no tiene un volumen restringido sino que es un lugar de compresión intramolecular. En los Esquemas 32a y 32b se compara la posible conformación de la isoquinolina con la deducida para el N-formil-*L*-triptófano y se ve que son muy semejantes (18). El anillo de isoquinolina se acomoda muy fácilmente ya, que apunta hacia la parte más alejada de la superficie de la enzima.

a)



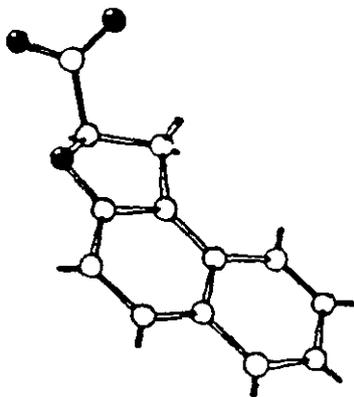
Ácido *D* (-) 1-oxo-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolína-3-carboxílico

c)



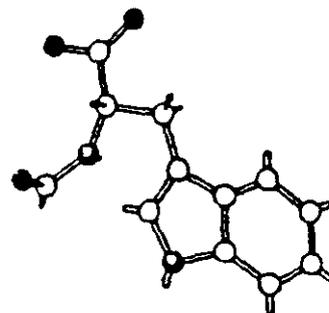
2,2'-bifenilo análogo de benzoyl-*L*-fenilalanina

e)



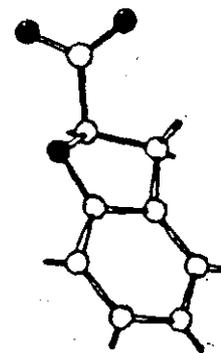
D-1,2-dihidronaftol[2,1-*b*]furano-2-carboxílico

b)



N-formil-*L*-triptófano

d)



Acido *D*-hidrocumarílico

Esquema 32.- Sustratos cíclicos derivados de la 1-oxo-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina.

El **Esquema 32c** muestra un bifenilo con una unión hidrocarbonada, de estereoquímica análoga a la de *L*-fenilalanina. El éster metílico de este compuesto se describió como un buen sustrato para la α -quimotripsina (277), ya que los grupos β -fenilo y carboxilo encajan en el centro activo adoptando una conformación muy similar a la postulada para el triptófano basándose en los datos cristalográficos.

Estos sustratos sugieren que la conformación exacta de los enlaces lábiles amido o éster en relación con la forma que adopta el resto de la molécula en el centro activo determinará la reactividad de un determinado isómero. La teoría de Niemann y Cohen de la estructura tetraédrica del centro activo de la α -quimotripsina en torno al carbono quiral explica la estereoespecificidad por los sustratos *L*. La aparente contradicción que provocaba la *D*-especificidad para el 1-oxo-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxilato de metilo se resuelve cuando se considera la forma general de la molécula del sustrato.

La rigidez de este sustrato hace que la interacción "am" no sea necesaria porque la interacción "ar" mantiene toda la molécula del sustrato en una orientación bastante rígida y definida. La cuestión crucial es saber si el grupo hidrolizable (representado en el **Esquema 32** por el grupo éster apuntando hacia la izquierda) está colocado en la orientación correcta para la catálisis. Puesto que no hay un lugar específico de enlace en el centro activo para los carbonos α y β de la cadena lateral, éstos pueden adoptar tanto la configuración *L* como la *D*, dependiendo de la geometría de los grupos.

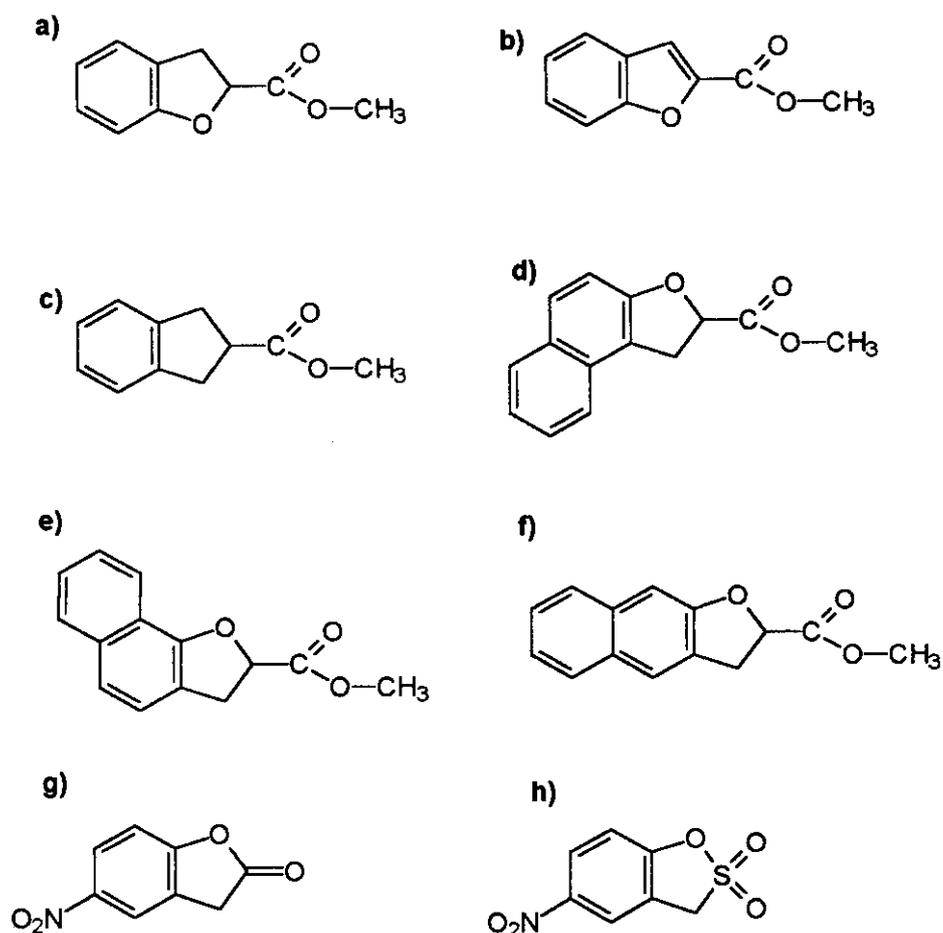
Debido a la existencia de un anillo de tetrahidroisoquinolina esta estructura se debe analizar según la disposición en axial o ecuatorial del grupo éster con respecto al anillo, observando como el isómero *R* en ecuatorial es similar a los sustratos naturales que reconoce la enzima (**Fig. 88 y 89**) (Sección IV.3.2.3).

IV.3.1.2.- Sustratos cíclicos con estructura de hidrocumarilatos

Los derivados del ácido cumarílico son otros sustratos cíclicos modelo (**Esquema 33**) (278). En estos sustratos, el carbono asimétrico forma parte de un anillo pentagonal de cumarina (279). Para este compuesto, existe una serie de conformaciones posibles variando desde una donde el grupo éster está casi ecuatorial, hasta otra en que está casi axial. El

dihidrocumarilato de metilo como sustrato de la α -quimotripsina presenta cierta *D*-estereoespecificidad. Como se muestra en el **Esquema 32d**, el estereoisómero *D* puede adoptar una configuración semejante a la propuesta para el 1-oxo-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxilato de metilo. En esta conformación, el carbono carboxílico se coloca casi en el mismo plano que el anillo hexagonal. Parecería igualmente razonable que el isómero *L* se colocara en una conformación similar, en la cual la molécula completa ha rotado, es decir, el grupo $-\text{CH}_2-$ y el $-\text{O}-$ del anillo pentagonal han variado su posición. Sin embargo, esto significaría que el puente de oxígeno se colocaría en una posición inaccesible para la enzima, mientras que el isómero *D* presenta el anillo y el grupo éster en el mismo plano. Esto podría ser una contribución adicional para la distorsión del anillo asimétrico de cumarina. Además los diferentes ángulos de enlace de los $-\text{O}-$ y $-\text{CH}_2-$ darán una orientación ligeramente diferente al grupo éster dentro del centro activo. Todas estas influencias provocan la observada y ligera *D* especificidad. (Las constantes de enlace son semejantes, pero $(k_{\text{cat}})_D/(k_{\text{cat}})_L = 83$ (280)). Ello explica porqué el cumarilato de metilo (**Esquema 33b**) no es hidrolizado por la α -quimotripsina debido a su rigidez y el Indano-2-carboxilato de metilo (**Esquema 33c**) es un sustrato enzimático muy pobre al carecer del átomo de oxígeno (278).

La información más precisa acerca de estos sustratos cíclicos no naturales procede del estudio de una serie de naftalenos homólogos del dihidrocumarilato, en los cuales se ha fusionado un segundo anillo hexagonal al primer anillo bencénico en cada una de las tres posibles posiciones (**Esquema 33d, 33e, 33f**) (280). El estereoisómero *D* (**Esquema 33d**) representado también en el (**Esquema 32e**) es un buen sustrato y presenta una estereoespecificidad muy elevada. La analogía estructural con el triptófano es evidente (280). Debido a la asimetría de la molécula, los efectos estereoquímicos de las diferentes partes del sustrato sobre las constantes cinéticas de esta serie de compuestos pueden separarse, desarrollado así un estudio muy pormenorizado. En el **Esquema 33e** se representa un sustrato pobre con una estereoespecificidad insignificante, mientras que el sustrato *D,L* (**Esquema 33f**) es inerte a la α -quimotripsina. La posición del puente de oxígeno parece ser un factor muy importante a la hora de determinar la reactividad.



Esquema 33.- Sustratos cíclicos derivados de los hidrocumarilatos

IV.3.1.3.- Sustratos cíclicos derivados de sultona

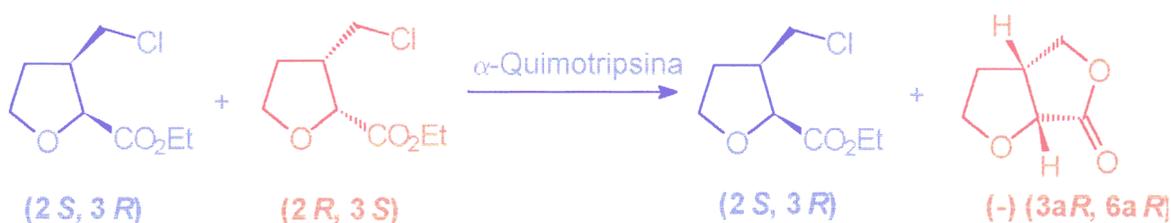
Otro tipo de sustratos rígidos planos son las sultonas y diversas lactonas estudiadas por Kaiser *y cols.* (281, 282) (**Esquema 33g y 33h**). En estas moléculas, el enlace que se va a romper forma parte de un anillo pentagonal que debe ser coplanar con el anillo aromático que va a encajarse en el subsitio "ar". Aunque estos sustratos planos encajan en el modelo cristalográfico de α -quimotripsina de un modo bastante convincente, la forma de las moléculas no es como la propuesta en el **Esquema 32b** y la estereoquímica de la interacción es notablemente diferente a la atribuida a un buen sustrato natural.

IV.3.1.4.- Resolución enantiomérica de compuestos racémicos empleando α -quimotripsina: Aplicaciones

La elevada estereoespecificidad de la α -quimotripsina se ha aprovechado para llevar a cabo la resolución de ésteres o amidas racémicas. Estos resultados han permitido obtener también una información importante a la hora de estudiar la interacción de la enzima con los sustratos no naturales. Existen numerosos ejemplos de este tipo de reacciones, por lo que sólo nos detendremos en las más relevantes (175, 283-289)

IV.3.1.4.1.- Sustratos derivados del tetrahydrofurano

El ejemplo más sencillo lo constituyen los derivados del ácido (*R,S*) tetrahydrofurano-2-carboxílico. Estos sustratos carecen tanto del grupo -CO-NH- (presente en los sustratos convencionales: BTEE) como del anillo aromático. No obstante, se ha comprobado que la α -quimotripsina es capaz de hidrolizar, con altos excesos enantioméricos, el *cis* (2*R*, 3*S*) 3-clorometil-tetrahydrofurano-2-carboxilato de etilo, mientras que el isómero *cis* (2*S*, 3*R*) y los otros dos esteroisómeros *trans* permanecen sin transformarse (283).



Esquema 34.- Reacción de hidrólisis del 3-clorometil-2-tetrahydrofurano-carboxilato de metilo y formación de una lactona bicíclica.

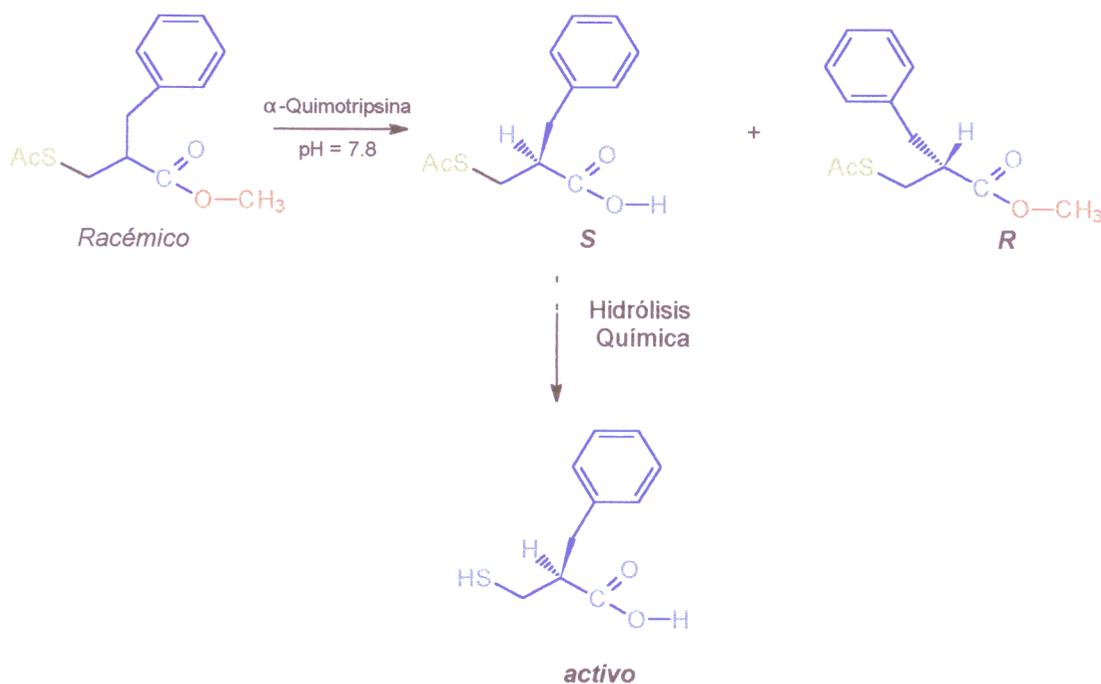
Estos resultados indican que ni el anillo aromático ni el grupo amido parecen ser indispensables para el acto catalítico. Sobre este punto volveremos más adelante, para explicar algunos resultados de la presente Memoria.

IV.3.1.4.2.- Sustratos derivados del ácido 2-bencil-3-mercaptopropiónico

Conociendo la estereoespecificidad de la α -quimotripsina hacia los aminoácidos de la serie *L* (105), se pensó emplearla para la obtención del ácido (*S*) 3-acetiltio-2-bencilpropiónico a partir de una mezcla racémica del correspondiente ester metílico, y obtener en solo tres pasos un inhibidor de la carboxipeptidasa A (CPA) ópticamente activo, mucho más potente que la mezcla racémica (284). La reacción de hidrólisis está descrita empleando tampón fosfato de pH=7.8 durante 12 horas (**Esquema 35**).

De esta manera se puede obtener el isómero *S* en forma de ácido, manteniéndose intacto el éster *R*. La pureza enantiomérica se determinó por RMN empleando $\text{Eu}(\text{hfc})_3$, resultando superior al 98%.

Posteriormente, las actividades inhibitorias (K_i) de ambos isómeros sobre la carboxipeptidasa A fueron determinados y sólo el isómero *S* fue activo, obteniéndose $K_i = 7.8 \times 10^{-9}$ M, mientras que para la mezcla racémica fue $K_i = 1.1 \times 10^{-8}$ M. El isómero *R* puro resultó ser inactivo como inhibidor.



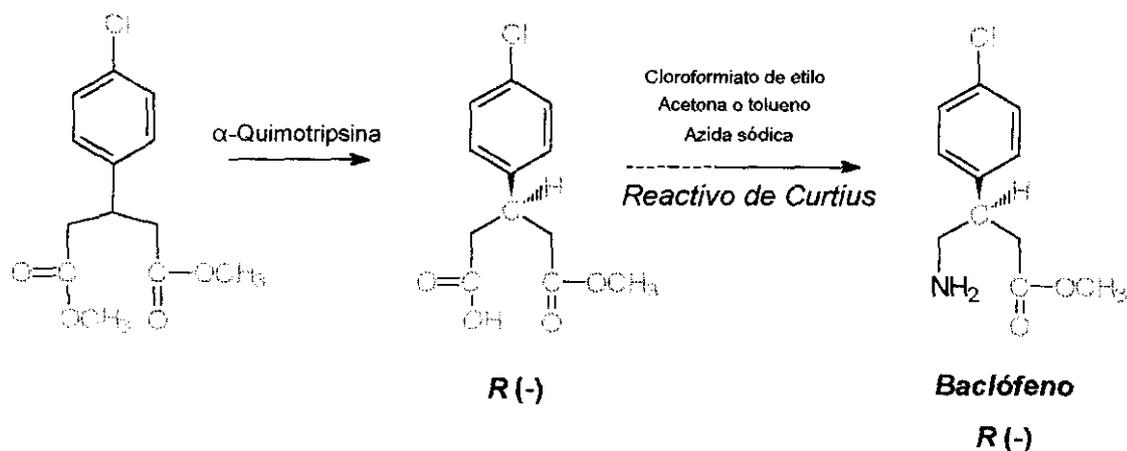
Esquema 35.- Reacción de hidrólisis enzimática del éster (*R,S*) 3-acetiltio-2-bencilpropionato de metilo.

Independientemente de su interés práctico, este proceso puso de manifiesto la elevada quimioselectividad de la α -quimotripsina hacia un grupo éster de estructura relacionada con el ácido 3-fenilpropiónico, en presencia de un enlace lábil como es el grupo tioéster, en condiciones clásicas de síntesis. Ello se debe atribuir a que la α -quimotripsina reconoce preferentemente estructuras "semejantes" a la fenilalanina en lugar de ésteres pequeños tipo acetato.

IV.3.1.4.3.- Sustratos con un centro proquiral. Síntesis de baclófeno.

La síntesis de baclofeno, agonista del GABA cuya actividad esta relacionada con el isómero **R** (-), se ha llevado a cabo satisfactoriamente gracias a la enantioselectividad que presenta la α -quimotripsina, la cual se empleó en la hidrólisis de un diéster con un centro proquiral, como el 3-(4-clorofenil)-glutarato de dimetilo, para dar el monoéster, ópticamente activo.

Se probaron varias enzimas, pero la α -quimotripsina, en medio acuoso, fue la que condujo a los mayores rendimientos, obteniéndose un 85% del monoéster quiral **R** y un $ee > 97\%$ (285).



Esquema 36.- Cuarto paso en la síntesis de baclofeno. Hidrólisis del diéster 3-(4-clorofenil) glutarato de metilo.

IV.3.4.1.4.- Resolución enantiomérica de diferentes aminoácidos racémicos.

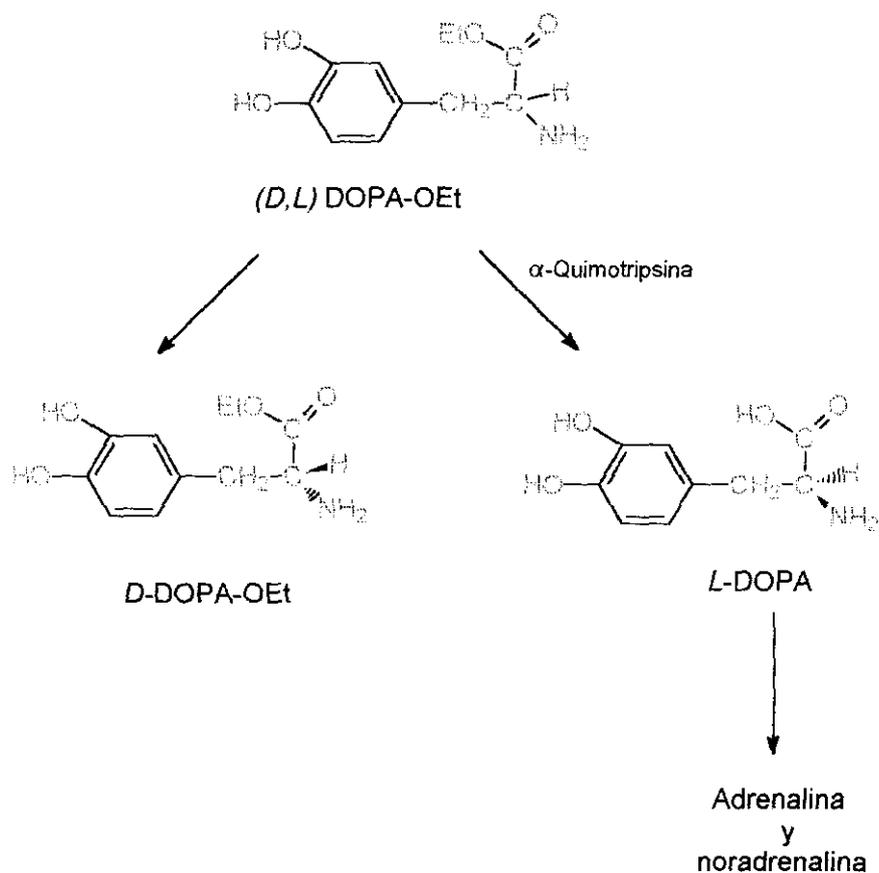
La resolución de mezclas racémicas de aminoácidos ha permitido abaratar los precios de los aminoácidos *D* o *L* enantioméricamente puros. En la **Tabla 42** (175) se resumen los resultados obtenidos en la hidrólisis de mezclas racémicas de varios aminoácidos, empleando α -quimotripsina en acetonitrilo con un 10 % de agua, como catalizador quiral.

Puede apreciarse que los mejores resultados se obtienen con aminoácidos aromáticos, destacando la *L*-DOPA (molécula de gran interés en la terapéutica del Parkinson, (Esquema 37), (175, 286, 287).

Tabla 42 .- Resolución de ésteres etílicos de aminoácidos, empleando α -quimotripsina (5 mg) en acetonitrilo/agua (9/1), volumen total = 20 ml y T= 30 °C.

Aminoácido	Rendimiento	e.e./%	<i>E</i>
Tirosina	48	>99	>646
Fenilalanina ^b	46	87	32
Triptofano	43	92	50
Alanina	9	80	10
Valina ^b	5	--	--
Leucina	5	86	14
Treonina ^b	0	--	--
p-Clorofenilalanina	3	82	10
DOPA	50	>99	>1060
Fenilglicina	9	84	12
Ácido 2-aminobutanóico	10	--	--
Ácido 2-aminopentanóico	7	67	5
Ácido 2-aminohexanóico	7	--	--

^b Ester metílico.

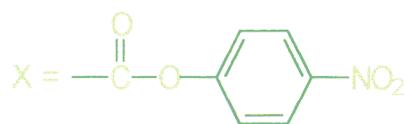
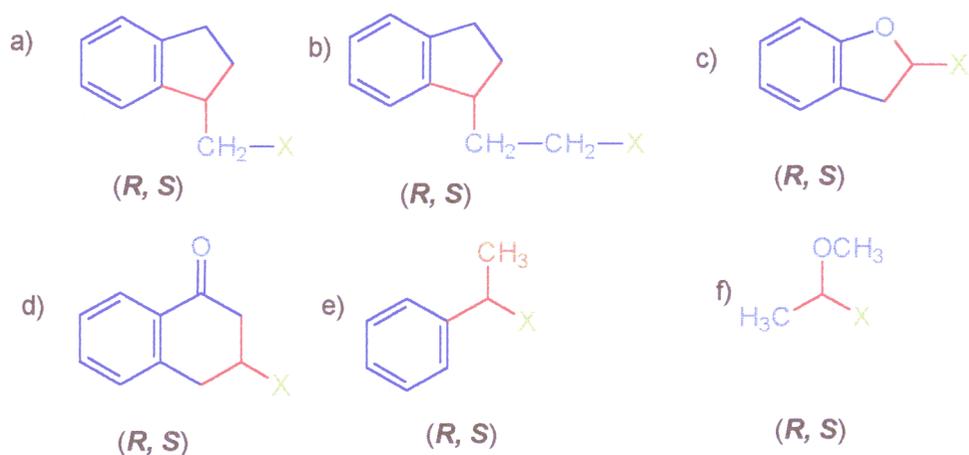


Esquema 37.- Reacción de obtención de *L*-DOPA.

IV.3.4.1.5.- Estudio de las velocidades de deacilación de los dos isómeros de diferentes ésteres de *p*-nitrofenilo con α -quimotripsina

Un ensayo típico de determinación de la estereoselectividad de la α -quimotripsina se ha realizado estudiando la hidrólisis de diferentes ésteres de *p*-nitrofenilo dada la facilidad de seguimiento de reacción en un espectrofotómetro de Ultravioleta-Visible.

En el esquema **Esquema 38** aparecen las estructuras de los diferentes ésteres objeto de estudio:



Esquema 38.- Ésteres de p-nitrofenilo

Tabla 43.- Velocidades de deacilación de diferentes ésteres de p-Nitrofenilo.(288)

Sustrato	Velocidad de deacilación (mM/min.)	V(R)/V(S)
a(R)	1.9×10^{-3}	0.032
a(S)	5.9×10^{-2}	
b(R)	5.2×10^{-3}	0.012
b(S)	4.4×10^{-1}	
c(R)	12	100
c(S)	1.2×10^{-1}	
d(R)	8.4×10^{-2}	2.2
d(S)	3.8×10^{-2}	
e(R)	2.0×10^{-4}	0.08
e(S)	2.4×10^{-3}	
f(R)	1.0×10^{-1}	14
f(S)	7.3×10^{-3}	

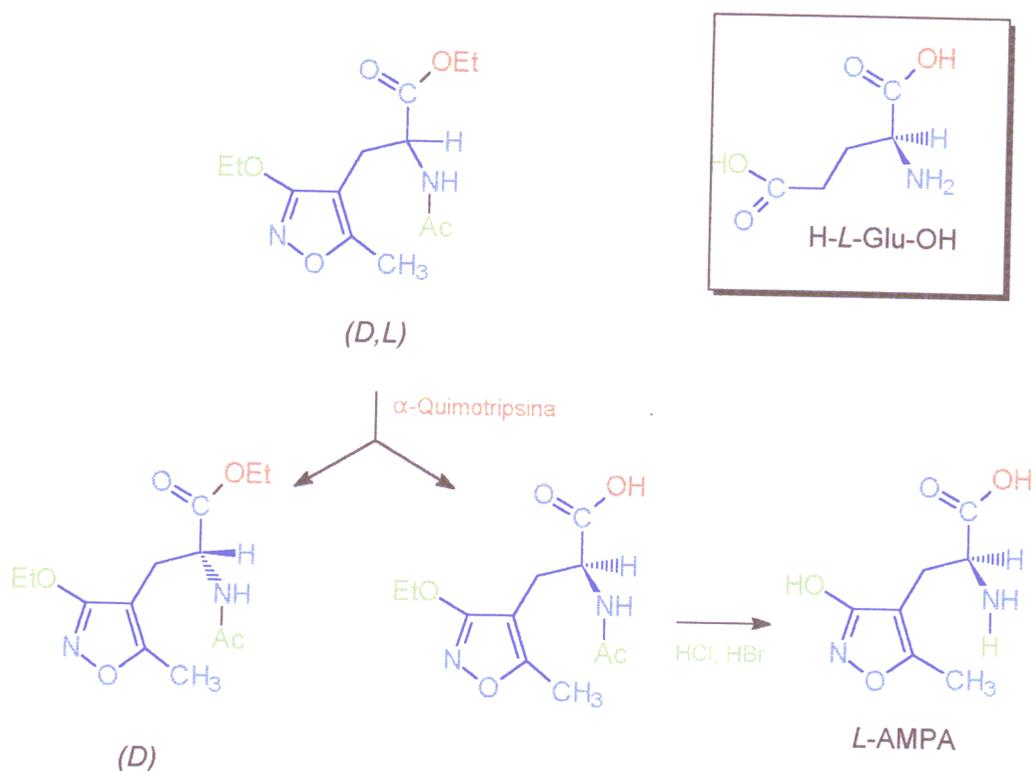
En la **Tabla 43** se observan las diferencias en las velocidades de deacilación de los distintos pares de isómeros, siendo más elevada la velocidad de deacilación para el isómero *S* en el caso de a, b, e, mientras que en los otros tres casos ocurre lo contrario.

Esto indica la importancia de las interacciones con el centro activo, de los sustituyentes del centro estereogénico.

IV.3.4.1.6.- Sustratos relacionados con el H-L-Glu-OH

Se ha sintetizado un análogo del H-L-Glu-OH, el L-AMPA [ácido 2-amino-3-(3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-il) propiónico], diferenciándose del primero por la sustitución del grupo γ -carboxilato por un anillo de isoxazol. Este compuesto es muy útil en procesos de transmisión nerviosa, presentando el isómero *S* (*L*) mayor actividad.

Se han empleado varias enzimas para resolver el paso más complicado de la síntesis del AMPA, como la aminoacilasa y la α -quimotripsina, obteniéndose con ésta última los mejores rendimientos (289).

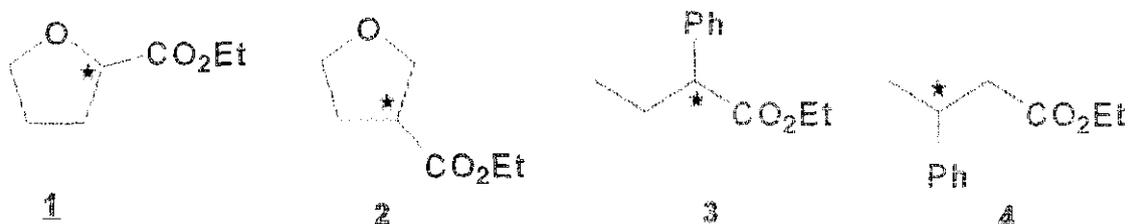


Esquema 39.- Síntesis de AMPA empleando α -quimotripsina.

Ello indica que la α -quimotripsina muestra una considerable estereoselectividad por los ésteres de α -aminoácidos N-acetilados, hidrolizando preferentemente el aminoácido de la serie L con un 99.9 % de e.e.

IV.3.2.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A fin de comprobar si los métodos de inmovilización sobre copolímeros y agarosa descritos en esta Tesis Doctoral alteran la estereoselectividad de la enzima inmovilizada con respecto a la enzima nativa, se procedió a comparar la actividad catalítica de la α -quimotripsina nativa e inmovilizada, tanto sobre agarosa (derivado AGM1-CT) como sobre el copolímero de injerto PE/HEMA (derivado C5-CT), frente a sustratos no naturales. Dado que el paso determinante del reconocimiento molecular por parte de la α -quimotripsina es la formación del complejo acil-enzima, se utilizaron ésteres de diversos ácidos como sustratos, sometiendo a procesos de hidrólisis enzimática (siguiendo la metodología descrita en la Sección III.8.2) los siguientes sustratos:



(11)

Et = etilo,	config. R,	+
	config. S,	-
	(R+S),	±
Ph = bencilo,	(R+S),	±
Ph = hexamilo,	(R+S),	±

capaces de ser reconocidos por la enzima como donadores de acilo.

Por otro lado, tampoco parece indispensable la presencia de un grupo -NH- en el carbono en α respecto del grupo carboxilo, ya que éste se puede sustituir por un grupo -O- como sucede en los diésteres analizados por Norin y cols (110).

Dado que Udding y cols. (283) describen la hidrólisis del *cis*-3-clorometil-tetrahidrofurano-2-carboxilato de etilo catalizada por la α -quimotripsina como un proceso altamente estereoselectivo hacia el isómero (2*R*, 3*S*) (Esquema 34) (Sección IV.3.1.4.1), Se procedió a realizar la hidrólisis de los sustratos más sencillos referidos a este compuesto, (*R,S*)-tetrahidrofurano-2-carboxilato de etilo (1) y (*R,S*)-tetrahidrofurano-3-carboxilato de etilo (2), empleando enzima nativa. Los resultados aparecen en la **Tabla 44**, donde se observa que no existe hidrólisis en ningún caso.

Tabla 44.- Resultados obtenidos en la hidrólisis de (1) y (2), empleando α -quimotripsina libre (0.25 mg/ml) como catalizador, [sustrato]= 50 mM, T= 25 °C.

Compuesto	Nombre	tiempo (h.)	% Acido
1	(<i>R,S</i>) tetrahidrofurano-2-carboxilato de etilo	52	0
2	(<i>R,S</i>) tetrahidrofurano-3-carboxilato de etilo	52	0

La comparación de las estructuras de los compuestos (1) y (2) con la del éster etílico de la *N*-benzoil-*L*-tirosina (BTEE), representada en la **Figura 83**, nos permite comprobar que sólo el isómero (*R*)-(1), posee una disposición espacial semejante del grupo carboxietilo y del -O- del resto de tetrahidrofurano a la del grupo carboxietilo y al -NH- del BTEE. No obstante este sustrato no conduce a reacción. Así pues, un sustrato no natural debe requerir además otros condicionamientos estéricos y electrónicos para ser sustrato de la α -quimotripsina. Estos requerimientos estructurales los podemos deducir de los resultados de Udding y cols. anteriormente mencionados, que indican que el (2*R*, 3*S*) 3-clorometil-tetrahidrofurano-2-carboxilato de etilo es sustrato de la enzima en estado nativo, no sucediendo lo mismo con el estereoisómero (2*S*, 3*R*).

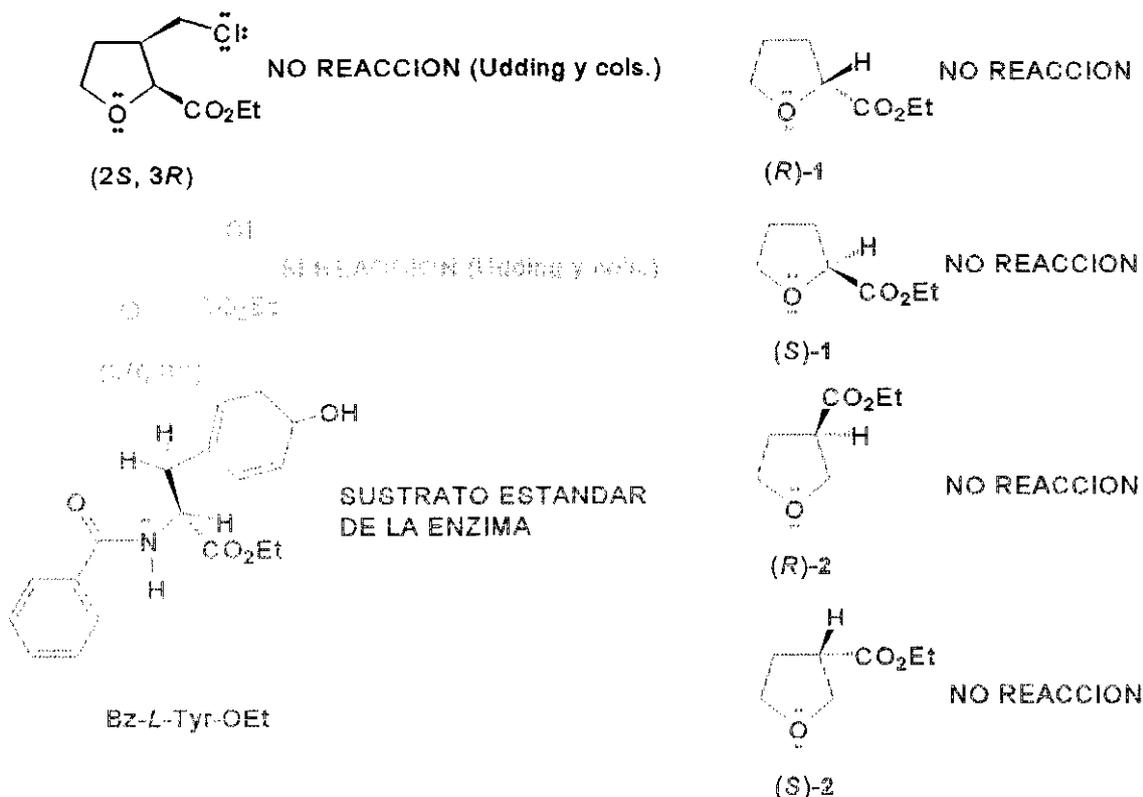


Figura 83. Comparación de la estructura de los sustratos (1) y (2) con el BTEE y los sustratos descritos por Udding *y cols.*

Comparando ambas estructuras con la del BTEE (Fig. 83) observamos como el isómero (2R, 3S) coloca el grupo -COOEt y -O- del anillo de tetrahydrofurano en la misma disposición relativa que ocupan los grupos -COOEt y -NH- en el BTEE. Por otra parte, el cloro, con su alta densidad electrónica, ocupa una posición análoga a la que ocupa el anillo de 4-hidroxifenilo, como se puede observar en los conformeros de mínima energía de estas moléculas, obtenidos mediante Dinámica Molecular (D.M.) empleando el programa de modelización Hyperchem y representados en la Figura 84.

Puede apreciarse en estas figuras que la distancia entre el carbono en *orto* del anillo aromático del 4-hidroxifenilo en el conformero de mínima energía del BTEE y el nitrógeno

es de 4.82 Å (**Fig. 84**), siendo esta distancia casi idéntica a la que existe en el isómero (**2R**, **3S**) del 3-clorometil-tetrahidrofurano-2-carboxilato de etilo entre el oxígeno del anillo heterocíclico y el cloro (4.32 Å). Algo similar sucede en la distancia existente entre el carbono en *orto* del anillo de 4-hidroxifenilo y el carbono del grupo carboxilato del BTEE (3.69 Å), y la que existe entre el cloro y el carboxilato en el citado isómero (3.73 Å).

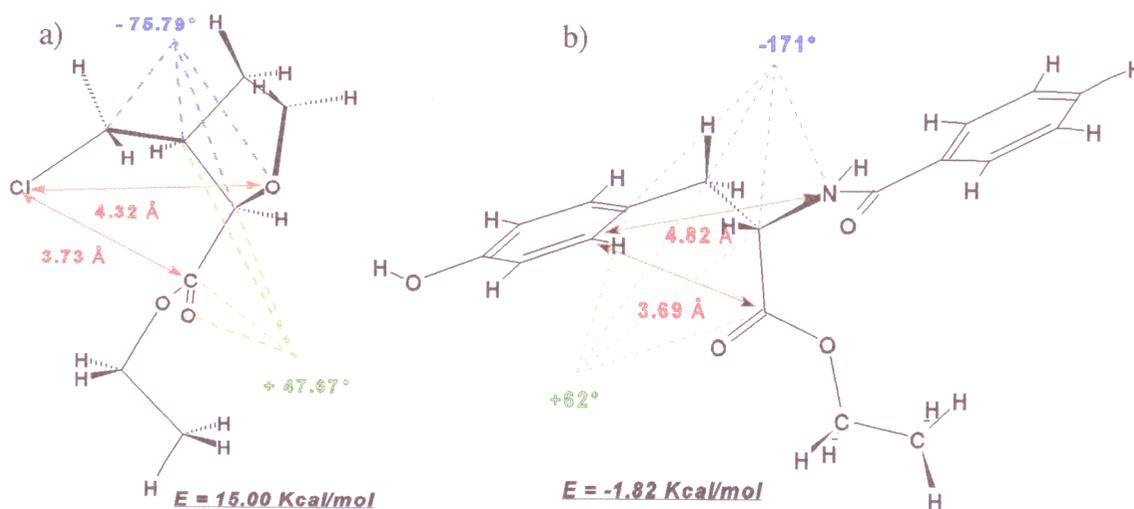


Figura 84. Comparación de la estructura del (**2R**, **3S**) 3-clorometil-tetrahidrofurano-2-carboxilato de etilo (a) y el BTEE (b)

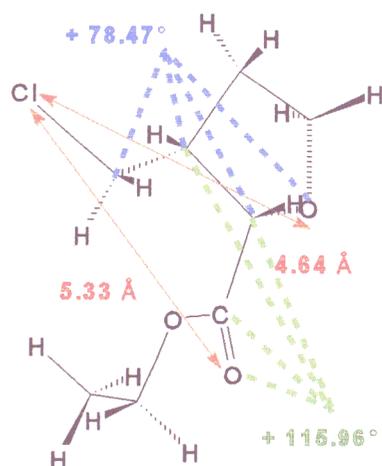
Por otro lado, los principales ángulos diedros de ambas moléculas, representados en la **Figura 84** muestran en ambos compuestos el mismo signo, lo cual nos lleva a postular similitudes geométricas entre el BTEE y el isómero (**2R**, **3S**) del 3-clorometil-tetrahidrofurano-2-carboxilato de etilo al existir giro libre en el BTEE alrededor del enlace $-(RHN)C^*(COOR)-CH_2-Ph(4-OH)$.

Estas analogías geométricas permiten explicar porqué los otros isómeros no condujeron a reacción enzimática a Udding y cols. (283). Ello se debe a que:

- i) El grupo $-COOEt$ no tiene la posición adecuada, configuración (**2S**).
- ii) El cloro no coincide con el grupo 4-hidroxifenilo del BTEE, debido a la configuración (**3R**).

Estos hechos se pueden visualizar en el **Esquema 41**, donde se muestra el confórmero

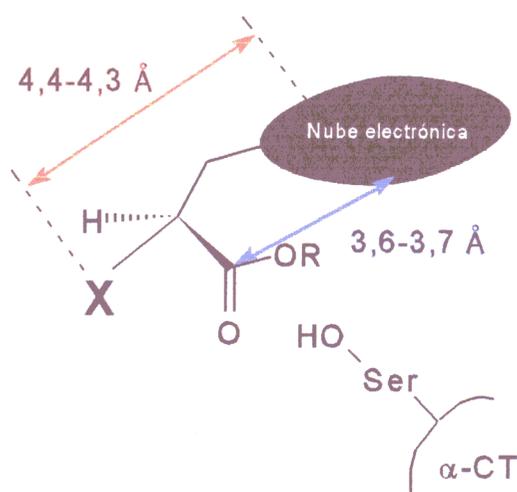
de mínima energía del isómero (2*S*, 3*R*) del 3-clorometil-tetrahidrofurano-2-carboxilato de etilo, el cual no es sustrato de la enzima, y se aprecia que las distancias son diferentes y los ángulos diedros son igualmente distintos.



Esquema 41. Conformeró de mínima energía del (2*S*, 3*R*) del 3-clorometil-tetrahidrofurano-2-carboxilato de etilo.

IV.3.2.2.- Sustratos que presentan un resto fenilo en su molécula

De lo deducido hasta ahora, podemos concluir que los requerimientos estructurales necesarios para que un sustrato no natural sea reconocido por la α -quimotripsina son los que aparecen indicados en la siguiente representación esquemática



Esquema 42.- Requerimientos estructurales de compuestos para ser reconocidos por la α -quimotripsina

A fin de explorar la importancia relativa del heteroátomo (X ó N) y de la presencia del anillo aromático en el reconocimiento del sustrato no natural por la enzima se procedió a realizar la hidrólisis de los ésteres (*R,S*) 2-fenilbutirato de etilo y (*R,S*) 3-fenilbutirato de etilo (**Esquema 40**, **3** y **4**), sin obtener ningún resultado positivo (**Tabla 45**), lo que significa que los sustratos no naturales necesitan algún resto rico en electrones (-NH- u -O-) en el carbono en α respecto al carboxilo para ser reconocidos como tales por la enzima, requisito que no cumplen los compuestos (**3**) y (**4**),

Tabla 45.- Resultados obtenidos en la hidrólisis de los derivados del ácido fenilbutírico, empleando α -quimotripsina libre (0.25 mg/ml).

Compuesto	Nombre	tiempo (h.)	% Acido
3	(<i>R,S</i>) 2-fenilbutirato de etilo	52	0
4	(<i>R,S</i>) 3-fenilbutirato de etilo	52	0

Para comprobar esta suposición, se realizó la hidrólisis de diversos mandelatos de alquilo (**Esquema 40**, compuestos **5** a **9**), mostrándose los resultados en la **Tabla 46**. Estos ésteres pueden considerarse análogos de los aminoácidos por sustitución isostera del -NH₂ por -OH.

Puede observarse que tanto el isómero (*R*) como el (*S*) del mandelato de etilo (compuestos **5** y **6**) son hidrolizados en la misma proporción tanto por la enzima nativa como por los derivados inmovilizados. Por otra parte, de los resultados obtenidos en la hidrólisis del (*R, S*) mandelato de etilo (**7**) con los anteriormente citados, podemos deducir que tanto la α -quimotripsina nativa como ambos derivados inmovilizados carecen de enantioselectividad respecto a este sustrato, pues los dos enantiómeros son hidrolizados a la misma velocidad. Ello implica que ambos isómeros pueden unirse al centro de la α -quimotripsina de dos formas distintas tal y como se muestra en el **Esquema 43**:

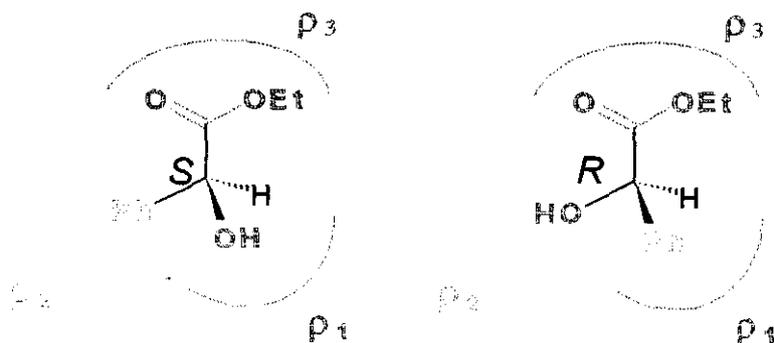
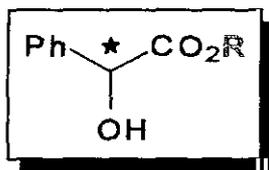
Esquema 43. Reconocimiento del (*R,S*)-mandelato de etilo en el centro activo de la α -quimotripsina.

Tabla 46.- Resultados obtenidos en la hidrólisis de diversos mandelatos de alquilo empleando α -quimotripsina libre (0.25 mg/ml) o inmovilizada (C5-CT, 0.053 mg de enzima/ml; AGM1, 0.076 mg de enzima/ml). Temperatura 25 °C ; [éster]=50 mM.



	R	Config.	Catalizador	% Acido (h.)	V. inicial (mM/min.)
5	Et-	(<i>R</i>)	α -CT	95 (20)	0.109
5	Et-	(<i>R</i>)	C5-CT	99 (40)	0.078
5	Et-	(<i>R</i>)	AGM1-CT	99 (44)	0.117
6	Et-	(<i>S</i>)	α -CT	98 (20)	0.214
6	Et-	(<i>S</i>)	C5-CT	99 (40)	0.141
6	Et-	(<i>S</i>)	AGM1-CT	99 (44)	0.04
7	Et-	(<i>R,S</i>)	α -CT	95 (20)	0.095
7	Et-	(<i>R,S</i>)	C5-CT	99 (40)	0.282
7	Et-	(<i>R,S</i>)	AGM1-CT	99 (44)	0.226
8	Bn-	(<i>R,S</i>)	α -CT	13 (52)	0.003
8	Bn-	(<i>R,S</i>)	C5-CT	0 (44)	0
8	Bn-	(<i>R,S</i>)	AGM1-CT	6 (44)	0.001
9	Isoamilo	(<i>R,S</i>)	α -CT	9 (52)	0.001
9	Isoamilo	(<i>R,S</i>)	C5-CT	0 (44)	0
9	Isoamilo	(<i>R,S</i>)	AGM1-CT	15 (44)	0.001

Por tanto, el centro ρ_1 puede recibir un grupo hidrófilo como el hidroxilo (enantiómero **S**) ó hidrofobo como el fenilo (enantiómero **R**), interaccionando ambos con la His₅₇ colocada en esa posición, por enlaces de hidrógeno en el primer caso o por interacción π - π entre anillos en el segundo. Esta explicación se avala por el hecho de que el aminoácido serina es reconocido como donador de acilo, ocupando el grupo -OH el lugar destinado al anillo aromático (252). Este resultado ya fue anticipado por Norin y cols. (110) mediante calculos teóricos de M.D. No obstante, pensamos que nuestra explicación es más plausible que la postulada por estos autores, para los cuales el verdadero sustrato es el enantiómero (**R**), mientras que el (**S**) es hidrolizado porque el fenilo es desplazado del sitio hidrofóbico (el ρ_2 en la nomenclatura de Hansch) por el resto -OEt. No obstante, al no disponer de programas de cálculo para revisar los datos de Norin y cols. obtenidos por M.M. estudiando la interacción enzima sustrato, no podemos desmentir su explicación de manera categórica.

La inmovilización de la enzima, tanto sobre geles de agarosa como sobre polímeros no altera la enantioselectividad del biocatalizador, como se deduce de la **Tabla 46**. En general, podemos decir que el isómero **S** se hidroliza a mayor velocidad que el isómero **R**, tal y como se deduce de los valores de velocidades iniciales de hidrólisis tanto para α -quimotripsina libre como inmovilizada sobre el copolímero C5. Este hecho es explicable porque la interacción del isomero **S** es análoga a la postulada por Hein y cols (105) para los **L** aminoácidos. Así pues, podemos pensar que el isomero **S** es rápidamente hidrolizado, pasando posteriormente la enzima a actuar sobre el isómero **R**.

Por lo que se refiere al tamaño de la cadena del alcohol que se encuentra esterificando al ácido mandelico podemos afirmar que, tanto para la enzima nativa como para la enzima inmovilizada, a medida que aumenta el tamaño disminuye la conversión (**Tabla 46**), según la ordenación relativa:

- Etilo >>> - isoamilo \approx bencilo

Estos resultados parecen estar en contradicción con la abundante evidencia, tanto experimental como teórica, basada en cálculos de D.M. y M.M., de la interacción de la α -quimotripsina con ésteres de los diversos alcoholes (110), que apuntan hacia el hecho de que

en dicha interacción, el grupo -OR se dirige hacia el exterior del centro activo, en cuyo caso no deberíamos observar ninguna influencia del tamaño de la cadena (266).

Dado que todos los sustratos estudiados son hidrolizados en mayor o menor grado, el tamaño de la cadena y/o su estructura electrónica no deben ser factores limitantes de la interacción de los ésteres con la α -quimotripsina, nativa o inmovilizada sobre el soporte hidrófilo (AGM1-CT). Más bien pensamos que existe un fenómeno controlado por la lipofilia de las cadenas más que por el tamaño de las mismas. Si comparamos los valores de $\log P$ de las cadenas (calculados utilizando las constantes fragmentarias, $\log P = \sum d_{i1} - \sum F$).

$\text{Log}P_{\text{Etilo}}$	=1.55
$\text{Log}P_{\text{Bencilo}}$	=2.41
$\text{Log}P_{\text{Isoamilo}}$	=3.17

podemos decir que los ésteres de cadenas de gran hidrófobicidad conducen a menor conversión, lo cual apunta hacia problemas difusionales del sustrato, en el medio acuoso del microentorno, tanto en el caso de la α -quimotripsina nativa como inmovilizada sobre agarosa.

La baja actividad enzimática observada con los derivados inmovilizados sobre polímeros para $R = \text{isoamilo}$ o bencilo (Tabla 46) puede atribuirse de igual forma a problemas difusionales, y a la interacción del soporte hidrófobo con el éster lipóide dificultándose el acceso al centro activo de la enzima.

Así pues podemos concluir, con los datos expuestos hasta ahora, que los sustratos no naturales necesitan para interaccionar con la enzima grupos ricos en electrones en el carbono en α respecto al grupo éster, los cuales han de interaccionar con los subsitios ρ_1 y ρ_2 , tal y como se representa esquemáticamente en la Figura 85.

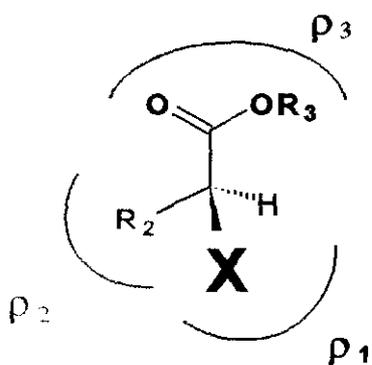


Figura 85. Acoplamiento de los sustratos no naturales en el centro activo de la α -quimotripsina

Asímismo, de los resultados obtenidos con los isómeros (*R*) y (*S*) de los mandelatos de etilo deducimos que tanto el subsitio ρ_1 como ρ_2 pueden reconocer a un fenilo como el sustituyente de mayor volumen, ya que ambos estereoisómeros eran hidrolizados a una velocidad semejante.

IV.3.2.3.- Sustratos con un nitrógeno en el carbono en α con respecto al grupo carboxialquilo

Para profundizar en estos aspectos se procedió a estudiar la hidrólisis de una serie de moléculas que tienen un grupo -NH en el carbono en α con respecto al grupo carboxialquilo, tales como el (*R, S*) 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxilato de etilo (**10**), el (*R,S*) 1-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1H- β -carbolina-3-carboxilato de metilo (**11**), el (*S*) N-(4-clorobutiril)-triptofanato de etilo (**12**), y el (*S*) (3-indolilmetil)-glicinato de etilo (**13**) representados en el **Esquema 40**.

El compuesto (**10**) se encuentra estrechamente relacionado con el 1-oxo-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxilato de etilo (**14**), cuyo isómero *S* presenta un valor de $k_{cat}/k_m = 4.3 \times 10^4$ para el reconocimiento enzimático, mientras que el (*R*) arroja un valor de 10^0 (275). Este resultado implica, además, que la enantiopreferencia del sustrato (**14**) (*S* < *R*) esta cambiada con respecto a los análogos del triptófano (*S* > *R*).

Además, la simple comparación de las estructuras (*R*) (**14**) y del sustrato N-formil-*L*-triptófano mostrada en el **Esquema 32** (Sección IV.3.1.1), nos indica una gran similitud entre ambas estructuras, lo que, nos llevaría a concluir que existe una aparente contradicción en la configuración del estereoisómero reconocido por la α -quimotripsina. No obstante Steinz y cols. (18) demostraron que tal contradicción no existe, ya que el anillo heterocíclico adopta una conformación tal que el grupo (-COOEt) adopta una disposición ecuatorial sólo en el caso del isómero (*R*) (**14**), coincidiendo entonces con la posición del grupo éster con el isómero *S* de la tirosina, fenilalanina o triptófano. Por el contrario, el isómero (*S*) (**14**), presentaría en este caso el grupo éster en posición axial (**Figura 86**), y por lo tanto sería menos reactivo.

De ello deducen los autores que el centro hidrofóbico ρ_2 , que reconoce al anillo aromático, es determinante a la hora de predecir qué enantiómero del sustrato no natural es

reconocido. En los esquemas siguientes se representan los conforméromos de mínima energía de estos dos estereoisómeros, observándose que el estereoisómero (*R*) es el más similar al BTEE (Fig. 88 y 89).

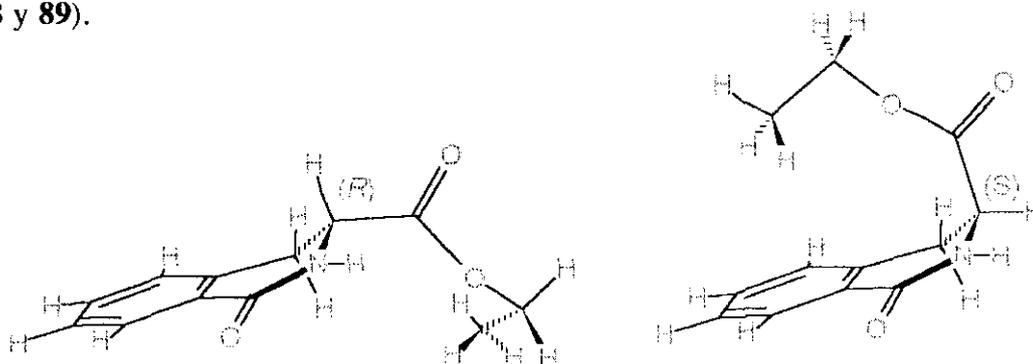


Figura 86.- Conforméromos de mínima energía del (*R*) y (*S*) 1-oxo-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxilato de etilo, *R*(14) y *S*(14).

La α -quimotripsina en estado nativo no muestra enantioespecificidad como se deduce de la Figura 90, donde se observa como se obtienen conversiones superiores al 50%. Por el contrario la inmovilización, ocasiona un gran aumento de enantioselectividad (Fig. 90) hidrolizándose el isómero *R* (ee > 95%) de forma análoga a lo que sucedía para (14). Esto se debe a que la limitada flexibilidad del ciclo de isoquinolina hace que sólo en el caso del isómero *R* el grupo éster coincida con el grupo éster del BTEE, en el centro activo de la enzima inmovilizada la cual debido a su rigidez no reconoce tan fácilmente al isómero *S*.

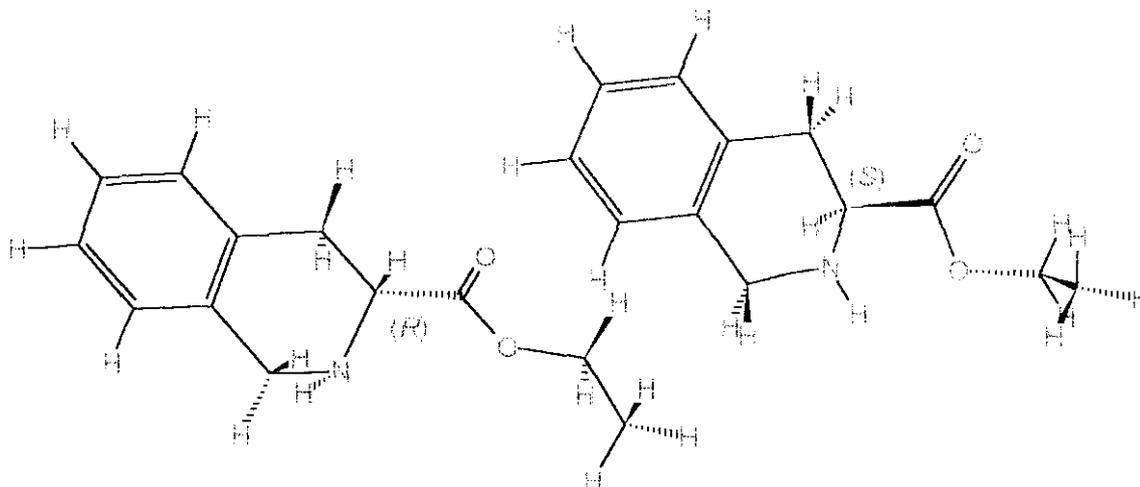
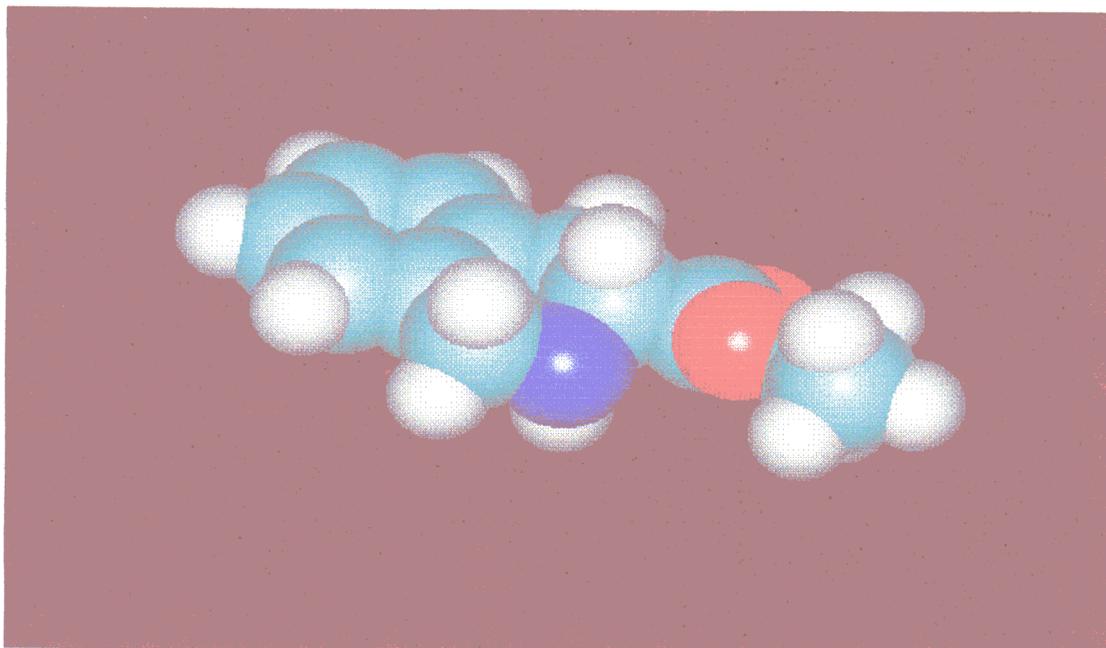


Figura 87. Comparación de los conforméromos de mínima energía del *S* y *R*-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxilato de etilo.

a)



b)

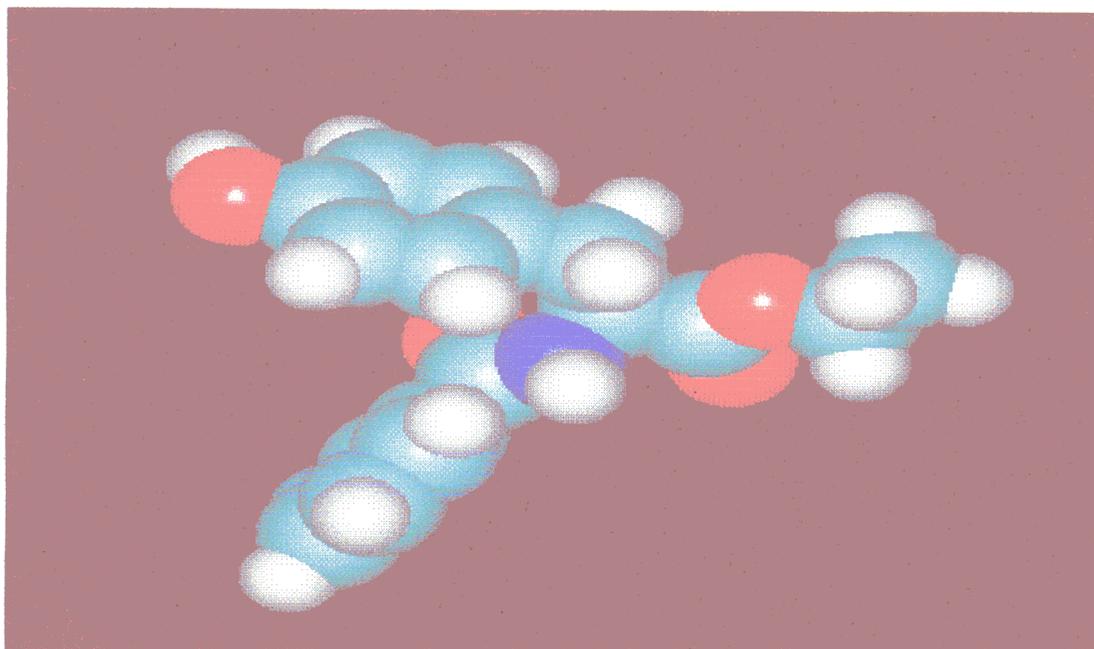


Figura 88. Comparación de los conformeros de mínima energía del (*R*)-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3 carboxilato de etilo (a) y el BTEE (b).

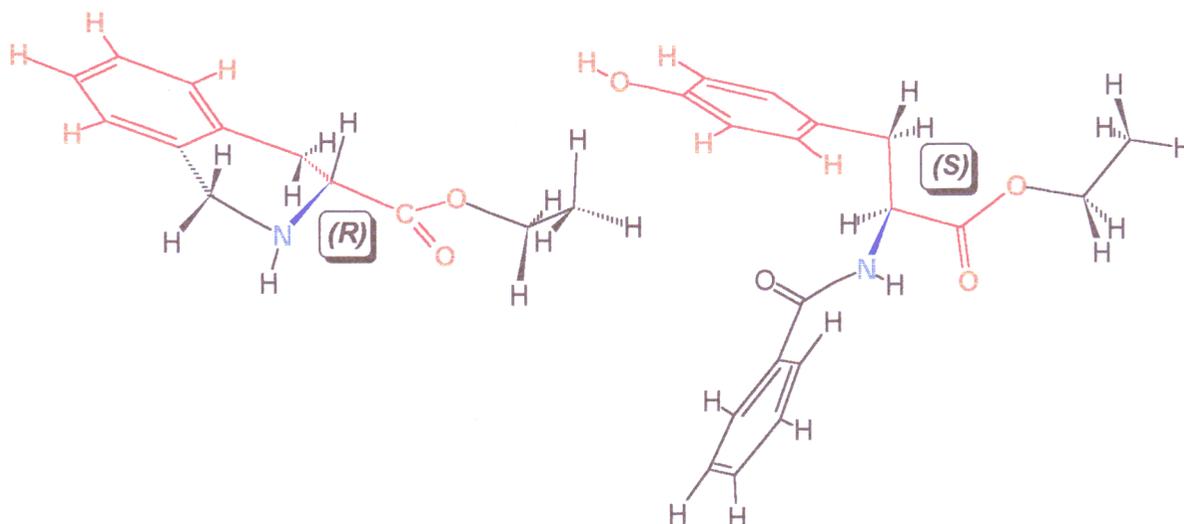


Figura 89. Comparación de los conformeros de mínima energía del (R)-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxilato de etilo y el BTEE.

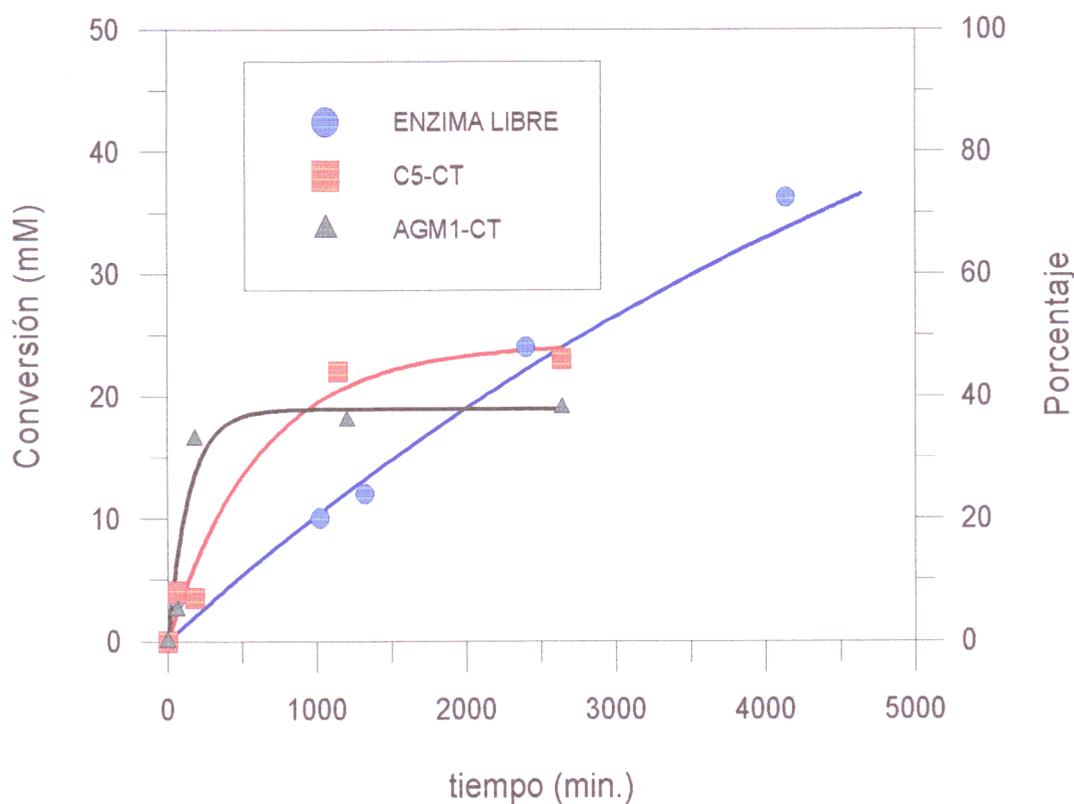


Figura 90.- Curvas de hidrólisis del (R, S) 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3 carboxilato de etilo, (10), empleando enzima libre (0.25 mg de enzima/ml), C5-CT (0.053 mg de enzima/ml) y AGM1-CT (0.076 mg de enzima/ml) como catalizadores.

Tabla 47.- Resultados obtenidos en la hidrólisis del (*R,S*)-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxilato de etilo, (**10**).

Catalizador	tiempo (h.)	% Ácido	V. inicial (mM/min.)
α -CT	44	48	0.011
C5-CT	44	46	0.039
C5-CT	69	78.5	
AGM1-CT	44	38	0.130

El resultado obtenido para la enzima nativa está en la línea de los obtenidos para los mandelatos, donde la ausencia del grupo amido conducía a bajos excesos enantioméricos. Esta afirmación se vería sostenida por los resultados descritos por diversos autores, los cuales señalan la importancia del grupo amida en el proceso de reconocimiento por parte de la α -quimotripsina nativa (102, 108), al comprobar que su presencia aumenta la velocidad de hidrólisis en un factor de 10^2 a 10^4 con respecto al sustrato que posee en su estructura restos -O- ó -CH₂- (106, 109), viéndose de igual manera aumentado el exceso enantiomérico obtenido. Dado que los cálculos de M.D. (110) y los análisis por Rayos X del complejo α -quimotripsina-N-formil-triptofano indican que el -CO de la amida no interacciona con la proteína, mientras que sí existe una interacción entre el resto -NH- con el carbonilo del residuo Ser₂₁₄ de la enzima, pensamos que el papel del grupo amida ha de relacionarse con un pK_a relativamente ácido en el grupo -CO-NH-, el cual favorecería la formación del puente de hidrógeno con el carbonilo de la Ser₂₁₄, mientras que este enlace de hidrógeno se vería dificultado en el caso de una base -CH₂-NH-CH₂, como sucede para el sustrato (**10**). Este hecho conduciría a un reconocimiento del sustrato menos estereoespecífico, como ya hemos comentado. Estos hechos no suceden para los derivados inmovilizados, donde la mayor rigidez enzimática parece conducir a un reconocimiento más selectivo hacia uno de los enantiómeros.

El *Cis* (1, 3) 1-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1H- β -carbolina-3-carboxilato de metilo (**11**) (Tabla 48) también fue ensayado como posible sustrato de la α -quimotripsina, con resultados negativos. La falta de reactividad observada podría explicarse atendiendo a las siguientes

consideraciones:

I) La α -quimotripsina reconocería con preferencia al anillo indólico, ya que el subsitio ρ_2 es fundamental, formando un enlace de hidrógeno entre el -NH- indólico y el hidroxilo del resto de Ser₁₈₉ (33), lo cual haría que el grupo éster no pudiera interactuar con la Ser₁₉₅.

II) La interacción del grupo metoxicarbonilo con la Ser₁₉₅ haría que el anillo no interaccionara con el subsitio hidrofóbico ρ_2 .

Estos hechos aparecen reflejados en el esquema siguiente, que recoge el conformero de mínima energía calculado para el compuesto (11).

III) La presencia de un resto metilo en la posición 1 dificulta la aproximación de la Ser₁₉₅ al grupo ester del sustrato, al igual que sucede en compuestos con sustituyentes en el carbono α , en los que se dificultan o debilitan las interacciones entre el grupo -CONH- y los residuos Ser₂₁₄ y Tyr₁₄₆ de la enzima (Figura 91) (102, 106, 109).

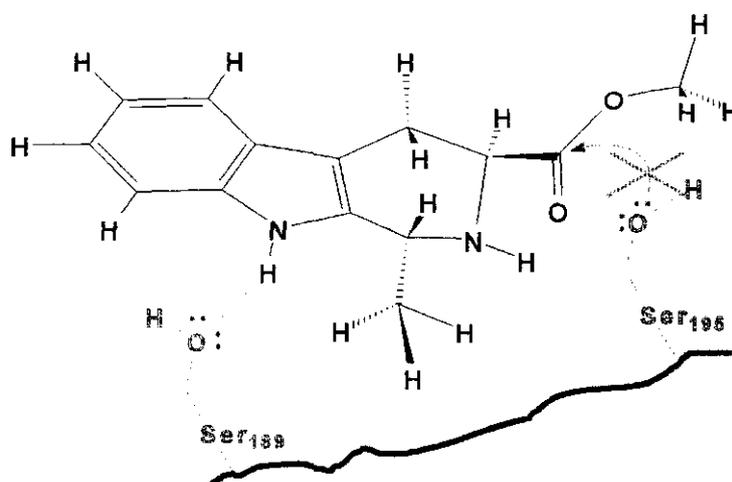


Figura 91. Conformer de mínima energía del *cis* (1, 3) (*S*)-1-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1H- β -carbolina-3-carboxilato de metilo

Dada la extrema rigidez de la molécula, no pueden cumplirse estos requisitos estéricos a la vez, por lo cual no se pueden producir las interacciones enzima-sustrato necesarias y no

se obtiene la hidrólisis deseada.

Seguidamente, se realizaron las mismas reacciones que en los casos anteriores empleando el (*R, S*)-N-(4 clorobutil)-triptofanato de etilo (**Esquema 40, 12**) consiguiendo unos resultados realmente sorprendentes, que aparecen reflejados en el esquema siguiente y en la **Tabla 48**:

Tabla 48.- Resultados obtenidos en la hidrólisis del N, (4-clorobutil)-L-triptofanato de metilo.

Catalizador	t (h.)	% (15)	% (16)	% (17)
α -CT	16	55	5	40
C5-CT	40	70	25	5
AGM1-CT	44	87	--	13

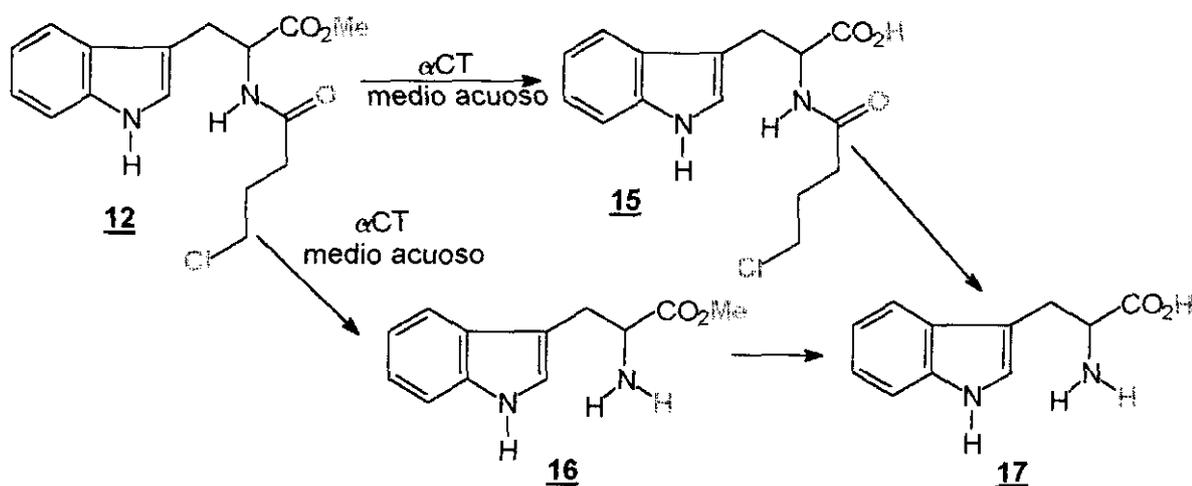


Figura 92. Productos obtenidos en la hidrólisis enzimática del sustrato (12)

Además del producto esperado (**15**), se obtuvieron otros dos (**16**) y (**17**), lo que indica que también ocurre la ruptura del enlace amido, quedando desprotegido el grupo amino, efecto que nunca se ha observado en presencia de un grupo éster, cuando el grupo protector del NH₂ es una cadena alifática como en el caso del acetilo (Ac-L-Trp-OEt) ó bien presenta un anillo

aromático como en el resto benzoilo (BTEE). Pensamos que ello se debe a la presencia del cloro en la cadena del resto acilo, el cual, como ya comentamos anteriormente, es capaz de sustituir al anillo aromático en el subsitio ρ_2 ("ar") como sucedía en el caso del 3-clorometil-tetrahidrofurano-2-carboxilato de etilo. Ello permitiría que este sustrato adoptase varias conformaciones diferentes en el reconocimiento por el centro activo, tal y como se indica a continuación (**Figuras 93 y 94**).

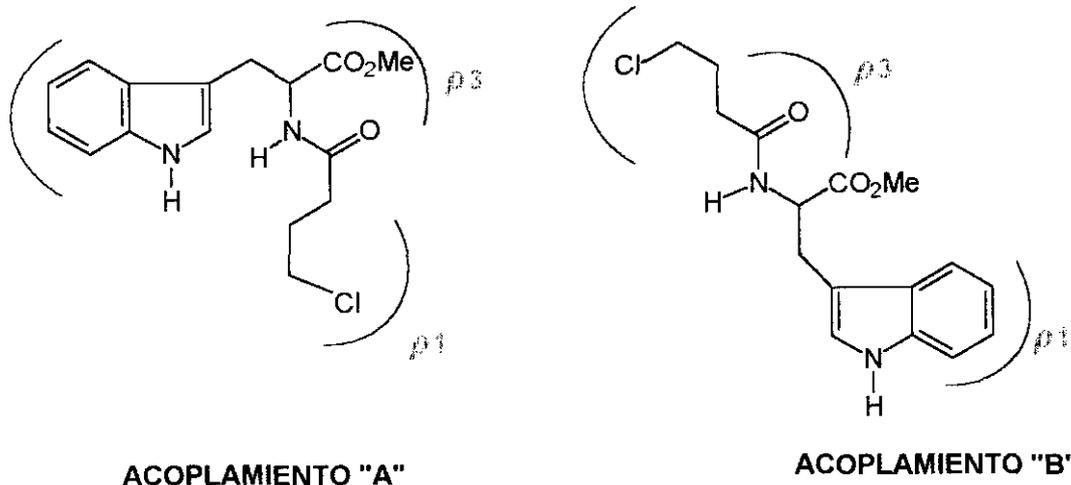
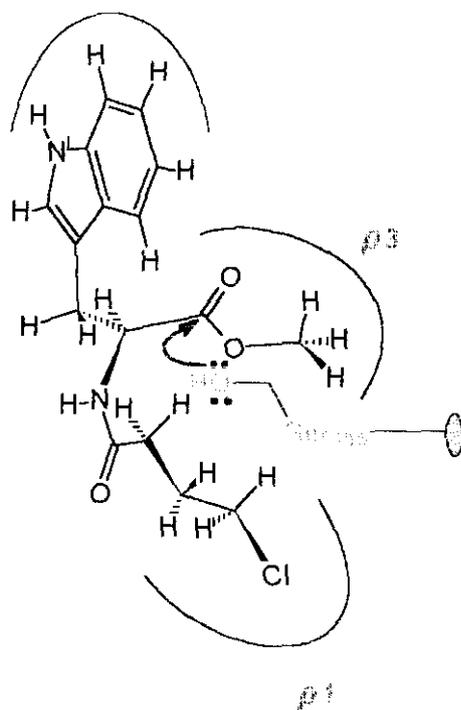


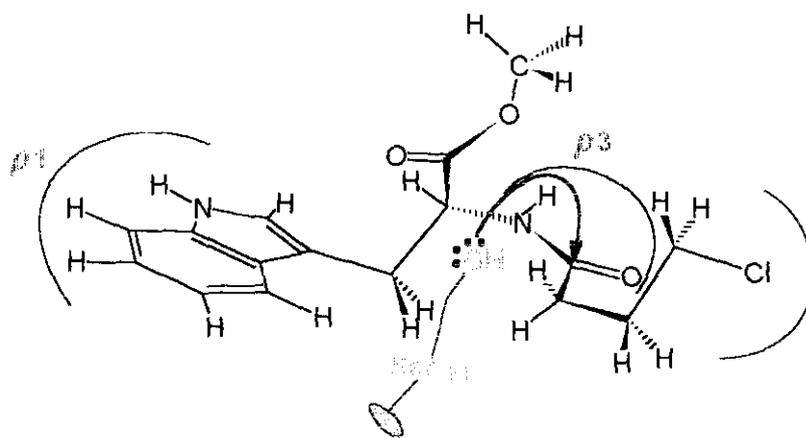
Figura 93. Dos posibles acoplamiento A y B del (*R, S*) N-(4 clorobutil)-triptofanato de etilo en el centro catalítico de la α -quimotripsina.

Esto implica, además, dos posibles interacciones con la Ser₁₉₅ del centro activo, como se esquematiza en la **Figura 93**, por lo que pueden ocurrir las hidrólisis tanto del grupo éster como del grupo amida. Aunque se ha descrito la hidrólisis del acetato de p-nitrofenilo (actuando la enzima como una simple esterasa y no como una proteasa), (67, 288) (Introducción, **Sección IV.3.1.4.5**), este grupo acetilo no hidroliza en el caso del N-acetil-*L*-triptofanato de etilo, sustrato enzimático, donde sólo se puede dar la interacción **A**, ya que el grupo acetilo no es capaz de ocupar el subsitio ρ_2 , ya que el anillo aromático dirige la disposición de la molécula en el centro activo, no dándose el acoplamiento **B**.

Estos resultados son coherentes con los obtenidos con los (*R*) y (*S*) mandelatos de etilo donde ya comentamos que los grupos ricos en electrones fenilo y -OH eran intercambiables entre los centros ρ_1 y ρ_2 , lo cual conduía a bajos excesos enantioméricos en la hidrólisis de estos ésteres.



ACOPLAMIENTO "A"



ACOPLAMIENTO "B"

Figura 94. Interacciones del conformero de mínima energía del N-(4-clorobutiril)-triptofanato de metilo con el centro activo.

Finalmente, se intento hidrolizar el compuesto (13) (Esquema 40), en las mismas condiciones que los anteriores, sin obtener exito alguno, resultado que parece lógico, ya que, este compuesto no es un derivado del triptófano si no de la glicina, cuyos esteres, como han comentado numerosos autores se hidrolizan muy lentamente con la α -quimotripsina (100). Además este compuesto presenta la dificultad añadida frente a la glicina de poseer un anillo aromático, que fija la molécula al centro activo dificultando el acercamiento del grupo ester al hidroxilo de la Ser₁₉₅ y las interacciones del grupo amino con la Ser₂₁₄.

Así pues, la naturaleza electrónica de los sustituyentes juega un papel importante a la hora del reconocimiento del sustrato por los subsitios ρ_1 y ρ_2 , controlando la estereoquímica del proceso. Todo ello nos lleva a concluir que el centro ρ_2 ó "ar" no es tan específico para anillos aromáticos como se pensaba hasta la fecha, ya que puede reconocer a grupos ricos en electrones tales como $-\text{CH}_2\text{-Cl}$ y $-(\text{CO})\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-Cl}$.

Por otro lado, la presencia de un $-\text{NH}-$ no parece ser tan indispensable a la hora del reconocimiento de la molécula por la α -quimotripsina, pudiendo ser sustituido por un $-\text{O}-$ u $-\text{OH}$ que también son reconocidos por el subsitio ρ_1 . Por el contrario, sí parece ser muy importante para el control estereoquímico del proceso de hidrólisis la presencia de un grupo amido $-\text{NH-CO-R}$ ($\text{R} =$ alquilo ó fenilo) , el cual interacciona con los restos Ser₂₁₄ y Met₁₉₂, según describen de Norin y cols (110).

Así pues, creemos que este estudio ha servido para modelizar la interacción α -quimotripsina-sustrato no natural dando un paso significativo respecto a lo realizado hasta la fecha por el grupo de trabajo con derivados de fenilalanina sustituidos en el anillo aromático (290).

V.- CONCLUSIONES

V.- CONCLUSIONES

1) Empleando la "metodología secuencial" se han obtenido derivados inmovilizados de α -quimotripsina sobre copolímeros, superiores en cuanto a:

- a) carga enzimática
- b) actividad retenida
- c) actividad específica

a los descritos hasta ahora en la bibliografía.

2) El grado de injerto y/o el porcentaje de hidrólisis del copolímero alteran drásticamente la micromorfología del soporte, permitiendo así obtener catalizadores con propiedades diferentes.

3) La naturaleza del soporte (hidrófilo/hidrófobo), influye de forma decisiva en las propiedades catalíticas de los derivados inmovilizados, tanto en procesos de síntesis de péptidos como en la hidrólisis de ésteres.

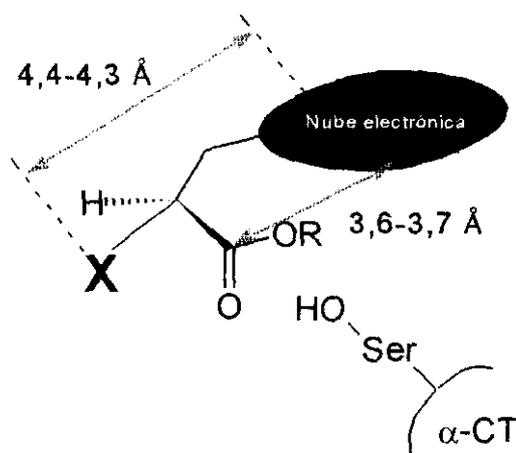
4) Se ha desarrollado una metodología operativa de síntesis de péptidos en que combinando la hidrofobicidad del disolvente con la hidrofilia/hidrofobia de los sustratos y productos podemos extraer el péptido en la fase orgánica y llevar a cabo procesos de síntesis continuos de gran sencillez operativa a nivel preparativo.

5) Utilizando la combinación de la síntesis de péptidos cinética y termodinamicamente controlada, nuestros derivados inmovilizados conducen a una alta relación péptido/ácido.

6) Estos derivados pueden ser reutilizados más de 10 ciclos, en procesos de síntesis de 24 h. cada ciclo, con rendimientos y relaciones péptido/ácido satisfactorios.

7) Se ha optimizado la síntesis de varios dipéptidos variando la naturaleza tanto del nucleófilo como del donador de acilo.

8) Empleando sustratos no naturales hemos determinado una serie de requerimientos estéricos y electrónicos que deben cumplir estos sustratos para ser reconocidos por la α -quimotripsina.



9) La inmovilización de la α -quimotripsina realizada en la presente Tesis Doctoral no altera la enantioselectividad de la misma, como hemos comprobado tanto con sustratos naturales como con sustratos no naturales. Asimismo, la enantioselectividad hacia los sustratos no naturales se incrementa por efecto de la inmovilización al rigidificarse la molécula de enzima.

VI.- BIBLIOGRAFÍA

VI.-BIBLIOGRAFÍA

- 1 (a) C. Walsh, en *Enzymatic Reactions Mechanisms*, Freeman, San Francisco, 1977.
(b) A. Fersht en *Enzyme Structure and Mechanism*, Freeman, New York, 1985.
- 2 (a) H. Yamada, S. Shimizu; *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* **27**, 1988, 622.
(b) C.-H. Wong; *Science* **244**, 1989, 1145.
(c) C. W. Hutchinson; *Trends Biotech.* **8**, 1990, 348.
- 3 A. L. Margolin; *Enz. Microb. Biotech.* **15**, 1993, 266-80.
- 4 E. Fisher; *Ber. Detsch. Chem. Ges.* **24**, 1894, 2683.
- 5 D. Koshland, P. Boyer; *Ann. Rev. Biochem.* **37**, 1968, 374.
- 6 M. Dixon, E.C. Webb en *Enzymes*, Academic Press, New York. 1985.
- 7 (a) T. E. Creighton en *Proteins: Structure and Molecular Properties*, Freeman, San Francisco 1986 cap. 6.
(b) I. H. Segel en *Enzyme Kinetics*, Wiley, New York, 1975.
- 8 (a) K. Mosbach; *Method. Enzymol.* **44**, 1976.
(b) K. Mosbach; *Method. Enzymol.* **135-137**, 1987.
(c) I. Chibata en *Inmobilized Enzymes*, Wiley, New York, 1978.
- 9 (a) W. Gerhartz en *Enzymes in Industry*, VCH, Berlin, 1990.
(b) R. Wu y L. Grossman; *Method. Enzymol.* **153-155**, 1987
(c) D. V. Goeddel; *Method Enzymol.* **185**, 1990.
- 10 G. Carrea; *Trends Biotech.* **2**, 1984, 102.
- 11 (a) E. Antonini, G. Carrea y P. Cremones; *Enz. Microb. Technol.* **3**, 1981, 291.
(b) M. D. Lilly; *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **32**, 1982, 162.
(c) K. Martinek, A. V. Levashov, Y. L. Khmel'nitsky, N. L. Klyachco y I. V. Berezin; *Science* **218**, 1982, 889.
- 12 H. Neurath en *Proteolytic Enzymes*, (Eds. J. Beynon, J. S. Bond), IRL Press. 1989 cap. 1.
- 13 M. Rovey y P. Desnuelle; *Biochem. Biophys. Acta.* **13**, 1953, 300.
- 14 W. J. Dreyer y M. Neurath; *J. Biological Chem.* **217**, 1955, 527.
- 15 B. S. Hartley; *Nature.* **201**, 1964, 1284.

- 16 B. S. Hartley y D. L. Kauffman; *J. Biochem.* **101**, 1966, 229.
- 17 B. Meloun, I. Kluch, V. Kostka, L. Moravek, Z. Prusik, J. Vanecek, B. Keil y F. Sorm; *Biochem. Biophys Acta.* **130**, 1966, 543.
- 18 T. A. Steitz, R. Henderson y D. M. Blow; *J. Mol. Biol.* **46**, 1969, 337.
- 19 D. E. Koshland, Jr., D. H. Strumayer y W. J. Ray; *Brookhaven Symp. Biol.* **15**, 1962, 101.
- 20 F. J. Kézdy, J. Feder y M. L. Bender; *J. Am. Chem. Soc.* **89**, 1967, 1009.
- 21 B. W. Matthews, P. B. Sigler, R. Henderson y D. M. Blow; *Nature* **214**, 1967, 652.
- 22 P. B. Sigler, D. M. Blow, B. W. Matthews y R. Henderson; *J. Mol. Biol.* **35**, 1968, 143.
- 23 J. J. Birktoft, B. W. Matthews y D. M. Blow; *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **36**, 1969, 131.
- 24 J. Kallos y D. Rizok; *J. Mol. Biol.* **7**, 1963, 599.
- 25 D. H. Strumeyer, W. N. White y D. E. Koshland; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **50**, 1963, 931.
- 26 P. B. Sigler, B. A. Jeffery, B. W. Matthews y D. M. Blow; *J. Mol. Biol.* **15**, 1966, 175.
- 27 J. D. Bernal, I. Fankuchen y M. Perutz; *Nature.* **141**, 1938, 523.
- 28 J. Donohue; *Proc. Acad. Sci. U. S.* **39**, 1953, 470.
- 29 G. Nemethy, D. C. Phillips, S. J. Leach, y H. A. Scheraga; *Nature.* **214**, 1967, 363.
- 30 L. Pauling Y B. Corey; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **37**, 1951, 729.
- 31 D. M. Blow; *J. Biochem.* **112**, 1969, 261.
- 32 J. J. Birktoft, D. M. Blow, R. Henderson, y T. A. Steitz; *Phil. Trans. Roy. Soc London.* 1970, B257, 67.
- 33 D. M. Blow en *Enzymes*, 3^a Edic., 1971, cap. 6, p. 185-247.
- 34 B. W. Matthews, P. B. Soler. R. Henderson y D. M. Blow; *Nature.* **214**, 1967, 652.
- 35 P. B. Soler, B. A. Jeffery, B. W. Matthews y D. M. Blow; *J. Mol. Biol.* **15**, 1966, 175.
- 36 D. M. Blow y T. A. Steitz; *Ann Rev. Biochemistry.* **39**, 1970, 63.
- 37 G. L. Rossi y S. A. Bernhard; *J. Mol. Biol.* **49**, 1970, 45.

- 38 H. L. Oppenheimer, B. Labouesse y G. P. Hess; *J. Biol. Chem.* **241**, 1966, 2720.
- 39 J. Kraut, L. C. Sieker, D. F. High y S. T. Freer; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **58**, 1957, 34.
- 40 G. P. Hess, J. McConn, E. Ku, G. McConkey; *Phil. Trans. Roy. Soc. London.* 1970, B257, 89.
- 41 C. Ghelis, J. Labouesse y B. Labouesse; *Biochem. Biophys. Res. Com.* **29**, 1967, 101.
- 42 J. Rupley, W. J. Drever y Neurath; *Biochem. Biophys. Acta.* **18**, 1955, 162.
- 43 H. Parker y R. Lumry, *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 1963, 483.
- 44 J. McConn, G. D. Fasman y G. P. Hess; *J. Mol. Biol.* **39**, 1969, 551.
- 45 A. Himoe, P. C. Parks y G. P. Hess; *J. Biomol. Chem.* **242**, 1967, 919.
- 46 J. R. Garel y B. Labouesse; *J. Mol. Biol.* **47**, 1970, 41.
- 47 S. T. Freer, J. Kraut, J. D. Robertus, H. T. Wright y N. H. Xuong; *Biochemistry.* **9**, 1970, 1997.
- 48 J. Kraut; "*Enzymes*". **3**, 1971, Cap. 5, Ed. Boyer Pd. Academic Press.
- 49 M. L. Bender y K. C. Kemp; *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 1957, 116.
- 50 D. W. Ingles y J. R. Knowles, *J. Biochem.* **108**, 1968, 561.
- 51 R. Henderson; *Ph. D. Comunicación*, Universidad de Cambridge. 1969.
- 52 S. A. Bernhard y Z. H. Tashjian; *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 1965, 1806.
- 53 G. P. Hess en *Enzymes* 3ª Edic. **3**, 1971, 213.
- 54 E. F. Jansen, M. D. Nutting y A. K. Balls. *J. Biol. Chem.* **179**, 1976, 201.
- 55 N. K. Schaffer, S. C. May y W. H. Summeson; *J. Biol. Chem.* **202**, 1953, 67.
- 56 R. Henderson; *J. Mol. Biol.* **54**, 1970, 341.
- 57 H. Weiner, W. N. White, D. G. Hoare y D. E. Koshland Jr. *J. Am. Chem. Soc.* **88**, 1966, 3851.
- 58 D. M. Blow, J. J. Birktoft y B. S. Hartley; *Nature.* **221**, 1969, 337.
- 59 M. W. Hunkapiller, S. H. Smallcombe, D. R. Whitaker y J. H. Ricards; *Biochemistry* **12**, 1973, 4732.
- 60 W. W. Bachovchin, R. Kaiser, J. H. Richards y J. D. Roberts; *P. Natn. Acad. Sci. USA* **78**, 1981, 7323.
- 61 M. A. Porubcan, W. M. Westler, I. B. Ibañez y J. L. Markley; *Biochemistry.* **18**,

- 1979, 4108.
- 62 A. A. Kossiakoff y S. A. Spenger; *Biochemistry*. 1981, 20, 6462.
- 63 W. J. Rutter, S. J. Gardell, S. Rocznik, D. Hilvert, S. Sprang, R. J. Fletterick y C. S. Craik; *Protein Engineering*, Ed. Alan R. Liss, Inc, New York. 1987.
- 64 P. Carter y J. A. Wells; *Nature*, 332, 1988, 564.
- 65 W. B. Lawson y H. J. Schramm; *J. Am. Chem. Soc.* **84**, 1962, 2017.
- 66 F. J. Kézdy, G. E. Clement y M. L. Bender; *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 1964, 3690.
- 67 B. S. Hartley y B. A. Kilby; *J. Biochem.* **50**, 1952, 672.
- 68 F. J. Kézdy y M. L. Bender; *Biochemistry*. **6**, (1), 1962, 1097.
- 69 L. Michaelis y M. L. Menten; *Z. Biochem.* **49**, 1913, 333.
- 70 H. Gutfreund; *Enzymes Physical Principles.*, Ed. Wily and sons, New York 1972.
- 71 F. J. Kézdy y E. T. Kaiser; *Methods in Enzymology* **19**, 1970, 3.
- 72 M. L. Bender, G. R. Schonbaum y B. Zerner; *J. Am. Chem. Soc.* **84**, 1962, 2540.
- 73 G. R. Schonbaum, B. Zerner y M. L. Bender; *J. Biol. Chem.* **236**, 1961, 2930.
- 74 M. Laskowski en *Methods of Enzymology*. Eds. S. P. Colowick, N.O. Kaplan, Academic. Press, Inc., New York, **2**, 1955, 10.
- 75 M. W. Hunkapiller, M. D. Forgac y J. H. Richards; *Biochemistry*. **15**, 1976, 5581.
- 76 A. Kühmann, D. Kukla, P. Schwager, K. Bartels y R. Huber; *J. Mol. Biol.* **77**, 1973, 417.
- 77 D. M. Blow, J. Janin y R. M. Sweet; *Nature* **249**, 1974, 54.
- 78 A. L. Fink y G. A. Petsko; *Adv. Enzymol.* **52**, 1981, 177.
- 79 R. A. Oosterbann, M. Adrichem y J. A. Cohen; *Biochem. Biophys. Acta* **63**, 1962, 204.
- 80 B. S. Hartley y B. A. Kilby; *J. Biochem.* **56**, 1954, 288.
- 81 H. Gutfreund y J. M. Sturtevant; *ibid.* **63**, 1956, 656.
- 82 H. Gutfreund y J. M. Sturtevant; *Proc. Acad. Natl. Sci. U.S.A.* **42**, 1956, 719.
- 83 G. W. Schwert, H. Neurath, S. Kaufman y J. E. Snoke; *J. Biol. Chem.* **172**, 1948, 221.
- 84 G. W. Schwert y T. Takenaka; *Biochem. Biophys. Acta.* **16**, 1955, 570.
- 85 M. L. Bender, G. E. Clement, F. J. Kézdy y H. Heck; *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 1964,

3680.

- 86 H. Lineweaver y D. Burk; *ibid.* **56**, 1934, 658.
- 87 G. S. Eadie; *J. Biol. Chem.* **146**,1942, 85.
- 88 B. Zerner, R. P. M. Bond y M. L. Bender; *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 1964, 3674
- 89 A. Himoe, K. G. Brandt, R. J. Desa y G. P. Hess; *J. Biol. Chem.* **244**, 1969, 3483.
- 90 K. G. Brandt, A. Himoe y G. P. Hess; *ibid.* **242**, 1967, 3973.
- 91 J. F. Wootton y G. P. Hess; *J. Am. Chem. Soc.* **84**, 1962, 440.
- 92 A. Himoe, K. G. Brandt y G. P. Hess; *J. Biol. Chem.* **242**, 1967, 3963.
- 93 S. A. Bernhard, B. F. Lee y Z. H. Tashjian; *J. Mol. Biol.* **18**, 1966, 405.
- 94 E. Charney y S. A. Bernhard; *J. Am. Chem. Soc.* **89**, 1967, 2726.
- 95 J. Lenard, R. Hyman, S. Johnson y G. P. Hess; *Anal. Biochem.* **11**, 1965, 30.
- 96 M. Rovey, M. Poilroux, A. Yoshida, P. Desnuelle; *Biochem. Biophys. Acta* **23**, 1957, 608-20.
- 97 N. C. Davis; *J. Biol. Chem.* **223**, 1956, 935.
- 98 G. E. Hein, J. B. Jones y C. Niemann; *Biochem. Biophys. Acta.* **65**, 1962, 353.
- 99 S. Kaufmann y H. Neurath; *Arch. Biochem.* **21**, 1949, 437.
- 100 J. B. Jones, T. Kunitake, C. Niemann y G. E. Hein; *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 1975, 1777.
- 101 R. Jennings y C. Niemann; *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 1953, 4687.
- 102 G. E. Hein y C. Neimann; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **47**, 1961, 1341.
- 103 S. G. Cohen, A. Milovanovic, R. M. Schlutz y S. Y. Weinstein; *J. Biol. Chem.* **244**, 1969, 2664.
- 104 L. Cunningham; *Comp. Biochem.* **16**, 1965, 85.
- 105 G. E. Hein y C. Neimann; *J. Am. Chem. Soc.* **84**, 1962, 4487.
- 106 R. L. Peterson, K. W. Huebele y C. Niemann; *Biochem* **2**, 1963, 947.
- 107 H. R. Almond, D. T. Manning y C. Niemann; *Biochem.* **1**, 1962, 243.
- 108 S. G. Cohen, J. Crossley, E. Khedouri y R. Zand; *J. Am. Chem. Soc.* **84**, 1962, 4163.
- 109 S. G. Cohen, J. Crossley y E. Khedouri; *Biochem.* **2**, 1963, 820.
- 110 M. Norin, K. Hult, A. Mattson y T. Norin; *Biocatalysis* **7**, 1993, 131-147.

- 111 C. Hansch, C. Grieco; C. Silipo y A. Vittoria; *J. Med. Chem.* **20**, 1977, 1420-35.
- 112 M. Bergmann y J. S. Fruton; *J. Biol. Chem.* **124**, 1938, 321.
- 113 H. Neurath y G. W. Schwert; *Chem. Rev.* **46**, 1950, 69.
- 114 H. T. Huang y C. Niemann; *J. Am. Chem. Soc.* **73**, 1951, 1541.
- 115 D. T. Manning y C. Niemann; *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 1958, 1478.
- 116 S. G. Cohen, J. Crossley, E. Khedouri, R. Zand y L. H. Klee; *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 1963, 1686.
- 117 T. A. Steitz y R. Henderson (experimentos no publicados)
- 118 D. W. Ingles y J. R. Knowles; *J. Biochem.* **104**, 1967, 369.
- 119 M. L. Bender, F. J. Kézdy y C. R. Gunter; *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 1964, 3714.
- 120 W. Kullmann *Enzimatic peptide synthesis*. Ed. CRC Press, Inc., 1987, 1-3.
- 121 E. Bricas, C. Fromageot; *Adv. Prot. Chem.* **8**, 1953, 1-5.
- 122 I. Gill, R. López-Fandiño, X. Jorba y E. N. Vulfson; *Enz. Microb. Tech.* **18**, 1996, 162-163.
- 123 R. B. Merrifield; *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 1963, 2149-2153.
- 124 R. J. Simonds (Eds.) *Chemistry of Biomolecules: 1992* 98-113.
- 125 J. U. Klein y V. Cerovsky; *Int. J. Pep. Prot. Res.* **47**, 1996, 348-352.
- 126 J. J. García-Domínguez, J. M. García-Anton, F. Reig, G. Valencia; *Química e Industria* **4**, 1981, 289-93.
- 127 (a) B. W. Matthews, C. S. Craik y H. Neurath; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 1994, 4103-05.
- (b) D. Corey y M. A. Phillips; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 1994, 4106-09.
- 128 P. Clapés, J. L. Torres, P. Adlercreutz; *Bioorg. Med. Chem.* **3**, (3), 1995, 245-255.
- 129 M. L. M. Serralheiro, D. M. F. Prazeres y J. M. Cabral; *Enz. Microb. Tech.* **16**, 1994, 1064-1073.
- 130 I. Gill, E. N. Vulfson; *J. Am. Chem. Soc.* **115**, (8), 1993, 3348-49.
- 131 M. Y. Gololobov, V. M. Stepanov y T. L. Voyushina y P. Irina; *Enz. Microb. Tech.* **16**, 1994, 522-28.
- 132 (a) T. Nagashima, A. Watanabe, H. Kise; *Enz. Microb. Tech.* **14**, 1992, 842-47.

- (b) H. Kise, A. Hayakawa; *Enz. Microb. Tech.* **13**, 1991, 584-88.
- 133 M. Capellas, G. Álvaro, M. D. Benaiges, G. Caminal, J. López-Santín, G. González y P. Clapés; *III Congreso Ibérico de Biotecnología*, Eds. F. Fernández-Polanco, P. A. García Encina y cols. 1996, 213-14.
- 134 A. J. Andersen, F. Widmer y J. T. Johansen en *Peptides*, Eds. D Theodoropoulos, W. D. Gruyter, Berlín, 1986.
- 135 W. Kullmann; *Biochemistry* **79**, 1982, 231.
- 136 K. Oyama, K. I. Kihara y Y. Nonaka; *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, **356**, 1981.
- 137 V. Kasche; *Enz. Microb. Tech.* **8**, 1986, 5.
- 138 L. Riechmann y V. Kasche; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **120**, 1984, 686-691.
- 139 L. Riechmann y V. Kasche; *Biochem. Biophys. Acta.* **830**, 1985, 164-172.
- 140 K. Mosbach en *Methods in Enzymology*, **136**, 1987, 280-284.
- 141 A. L. Fink y M. L. Bender; *Biochemistry*, **8**, 1969, 5109-5118.
- 142 K. Wallenfels y P. Malhorta; *Adv. Carbohydr. Chem.* **16**, 1961, 239-298.
- 143 H.-D. Jakubke; *The Peptides* **9**, 1987, 103
- 144 V. Schellenberger y H.-D. Jakubke; *Biophys. Acta* **869**, 1986, 54.
- 145 V. Schellenberger, M. Schuster y H.-D. Jakubke; *Biocatalysis* **4**, 1990, 105-111.
- 146 V. Kasche, U. Haufler y R. Zöllner; *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **365**, 1984, 1435.
- 147 K. Breddam y M. Ottesen; *Calsberg Res. Commun.* **49**, 1984, 473
- 148 H.-D. Jakubke, P. Kuhl y A. Könnel; *Angew. Chem., Int. Ed. Eng.* **24**, 1985, 85-93.
- 149 G. A. Homandberg, A. Mattis y M. Laskowski; *J. Biochem.* **17**, 1978, 5220-27.
- 150 A. Florsheimer, A. Schwarz, D. Steinke, M. Kittelmann, G. Herrmann, M-R. Kula y C. Wandrey; *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **613**, 1991, 633-37.
- 151 R. Fernandez-Lafuente, C. M. Rosell, R. M. Blanco, J. M. Guisán; *Enzyme Microb. Technol.* **13**, 1991, 898-905.
- 152 R. M. Blanco, G. Alvaro y J. M. Guisán; *Enzyme Microb. Technol.* **13**, 1991, 573-583.

- 153 R. Fernandez-Lafuente, G. Alvaro, R. M. Blanco y J. M. Guisán; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **27**, (3), 1991, 277-290.
- 154 P. Clapés, P. Adlercreutz y B. Mattiason; *Biotechnol. Appl. Biochem.* **12**, 1990, 376-386.
- 155 L. Vidaluc, M. Baboulene, V. Speziale, A. Lattes, P. Monsan; *Tetrahedron.* **39**, (2), 1983, 269-274.
- 156 Y. Kimura, K. Nakanishi y R. Matsuno; *Enz. Microb. Tech.* **12**, 1990, 272-80.
- 157 G. Fasman (Ed.), en *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, Physical and Chemical Data*, CRC Press. Cleveland. **1**, 1975.
- 158 V. Kasche y R. Zöllner; *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **363**, 1982, 531.
- 159 P. Clapés, P. Adlercreutz y B. Mattiasson; *J. Biotech.* **15**, 1990, 323-38.
- 160 K. Nilsson y K. Mosbach; *Biotechnol. Bioeng.* **26**, 1984, 1146.
- 161 K. Nilsson, I. Skúladóttir y B. Mattiasson; *Biotech. Appl. Biochem.* **16**, 1992, 182-187.
- 162 V. Tôugu, H. Meos, M. Haga, A. Aaviksaar y H.-D. Jakubke; *FEBS.* **329**, (1, 2), 1993, 40-42.
- 163 D. Ullmann, F. Bordusa, K. Salchert y H.-D. Jakubke; *Tetrahedr. Asymm.* **7**, (7), 1996, 2047-54.
- 164 (a) S. Kamat, E. J. Beckman y J. Russell; *Enz. Microb. Technol.* **14**, 1992, 265-271.
(b) C. R. Wescott y A. M. Klibanov; *Biochem. Biophys. Acta* **1206**, 1994, 1-9.
- 165 P. Cremonesi, G. Carrea, L. Ferrara y E. Antonini; *Eur. J. Biochem.* **44**, 1974, 401.
- 166 R. Z. Kazandjan, J. S. Dordick y A. M. Klibanov; *Biotech. Bioeng.* **28**, 1986, 417.
- 167 K. Martinek, A. N. Semenov y I. V. Berezin; *Biochim. Biophys. Acta* **658**, 1981, 76.
- 168 J. Woodward (Ed.), *Immobilized Cells and Ezymes; A Practical Approach* IRL, Press Oxford, 1985.
- 169 K. Morihara y T. Oka; *J. Biochem.* **163**, 1977, 531.
- 170 K. Morihara, Y. Ueno y K. Sakina; *J. Biochem.* **240**, 1986, 803.
- 171 (a) P. Adlercreutz; *Biochim. Biophys. Acta* **1163**, 1993, 144-48.
(b) P. Lozano, D. Combes y J. L. Iborra; *J. Biotech.* **35**, 1994, 9-18.
- 172 T. Kijima, S. Yamamoto y H. Kise; *Enz. Microb. Tech.* **18**, 1996, 2-6.

- 173 P. Clapés y G. Valencia y P. Adlercreutz; *Enz. Microb. Tech.* **14**, 1992, 575-80.
- 174 V. Dorovska-Taran, C. Veeger y A. J. W. G. Visser; *Eur. J. Biochem.* **218**, 1993, 1013-1019
- 175 Y. Tomiuchi, K. Oshima y H. Kise; *Bull. Chem. Soc. Jpn* **65**, 1992, 2599-2603
- 176 D. B. Volkin, A. Stabli, R. Langer y A. M. Klivanov; *Biotech. Bioeng.* **37**, 1991, 3192-6.
- 177 P. A. Burke, R. G. Griffin y A. M. Klivanov; *Biotech. Bioeng.* **42**, 1993, 87-94.
- 178 P. Clapés y P. Adlercreutz; *Biochem. Biophys. Acta.* **1118**, 1991, 70-76.
- 179 H. Gaertner y A. Puigserver; *Eur. J. Biochem.* **181**, 1989, 207-13.
- 180 A. L. Margolin, D-F Tai y A. M. Klivanov; *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 1987, 7885-7.
- 181 P. A. Fitzpatrick y A. M. Klivanov; *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 1991, 3166-71.
- 182 M. Arroyo, J. M. Moreno y J. V. Sinisterra; *J. Mol. Catal. A: Chem.* **97**, 1995, 195-201.
- 183 G. E. Schulz y R. H. Schirmer en *Principles of Protein Structure*, Springer-Verlag, New York, 1979.
- 184 (a) C. Laane, J. Tamper y M. D. Lilly; *Biocatalysis in Organic Media*, Elsevier, Amsterdam, 1987.
- (b) J. Tramper y M. H. Vermue; *Biocatalysis in Non-Conventional Media*, Elsevier Amsterdam, 1992.
- 185 A. Zacks, A. M. Klivanov; *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 1986, 2767-2768.
- 186 A. Zacks y A. M. Klivanov; *J. Biol. Chem.* **263**, 1988, 3194-3201.
- 187 A. Margolin y A. M. Klivanov; *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 1987, 3802-3804.
- 188 M. Therisod y A. M. Klivanov; *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 1986, 5638-5640
- 189 J. S. Dordick; *Enz. Microb. Technol.* **11**, 1989, 194
- 190 R. Z. Kazandjian y A. M. Klivanov; *J. Am. Chem. Soc.* **107**, 1985, 5448-50.
- 191 P. J. Halling; *Enz. Microb. Technol.* **16**, 1994, 178-206.
- 192 P. J. Halling; *Biochim. Biophys. Acta* **1040**, 1990, 225-28.
- 193 L. Kvittingen, B. Sjursnes, T. Anthosen y P. J. Halling; *Tetrahedron* **48**, 1992, 2793-2802.
- 194 M. Norin, J. Boutelje, E. Holmberg y K. Hult; *Appl. Microbiol. Biotech.* **28**, 1988,

- 527-530.
- 195 N. W. Ross y H. Schneider; *Enz. Microbiol. Technol.* **13**, 1991, 370-77.
- 196 T. Yamane, T. Ichiryu, M. Nagata, A. Veno y S. Shimizu; *Biotechnol. Bioeng.* **36**, 1990, 1063-1069
- 197 J. M. Sánchez-Montero, V. Hamon, D. Thomas y M. D. Legoy; *Biochim. Biophys. Acta* **1078**, 1990, 345-50.
- 198 T. Tanaka, E. Ono, M. Ishihara, S. Yamanaka y K. Takinami; *Agric. Biol. Chem.* **45**, 1981, 2387-9
- 199 H. Kitaguchi, A. M. Klivanov; *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 1989, 9272-73.
- 200 M. Reslow, P. Adlercreutz y B. Mattiasson; *Biocatalysis* **6**, 1992, 307-18.
- 201 M. Reslow, P. Adlercreutz y B. Mattiasson; *Eur. J. Biochem.* **172**, 1988, 573-8.
- 202 T. Kawamoto, K. Sonomoto y A. Tanaka; *Biocatalysis* **1**, 1987, 137-45.
- 203 P. Adlercreutz; *Eur. J. Biochem.* **199**, 1991, 609-14.
- 204 R. H. Valivety, P. J. Halling, A. D. Peilow y A. R. Macrae; *Biochim. Biophys. Acta* **1122**, 1992, 143-46.
- 205 R. H. Valivety, P. J. Halling, A. D. Peilow y A. R. Macrae; *Eur. J. Biochem.* **222**, 1994, 461-466.
- 206 D. K. Oladepo, P. J. Halling y V. F. Larsen; *Biocatalysis* **8**, 1994, 283-287.
- 207 V. Kasche, U. Haufler, D. Markowsky, S. Melnyk y A. Zeich; *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **501**, 1987, 97.
- 208 H. Amneus, D. Gabel, L. Näslund y V. Kasche; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **90**, 1979, 1313.
- 209 D. Salvador, J. V. Sinisterra y J. M. Guisán; *J. Mol. Catal.* **62**, 1990, 93-105.
- 210 R. Fernández-Lafuente, C. M. Rosell, V. Rodríguez, C. Santana, G. Soler, A. Bastida y J. M. Guisán; *Enz. Microb. Technol.* **15**, 1993, 546-50.
- 211 S. P. Kumble y C. S. Radamoss; *Biocatal. Biotransf.* **12**, 1995, 281-91.
- 212 M. Alves da Silva, C. G. Beddows, M. H. Gil, J. T. Gutrie, A. J. Guiomar, S. Kotov y A. P. Piedade; *Radiat. Phys. Chem.* **35**, 1990, 98-101.
- 213 J. Bo y X. Ming; *Eur. J. Polym.* **28**, 1992, 827-30.
- 214 K. Nilson, I. Skúladóttir y B. Mattiasson; *Biotech. Appl. Biochem.* **16**, 1992, 182-87.

- 215 M. Otamiri, P. Adlercreutz, B. Mattiasson; *Biotechnol Appl. Biochem.* **13**, 1991, 54-64.
- 216 H. Noritomi, A. Watanabe y H. Kise; *J. Polymer.* **21**, 1989, 147-53.
- 217 K. Mosbach en *Methods in Enzymology*, **137**, 1989.
- 218 (a) J. M. S. Rocha, M. H. Gil y F. A. P. Garcia; *Biocatalysis* **9**, 1994, 157-167.
(b) M. Alves da Silva, H. D. Burrows, S. J. Formosinho, M. H. Gil, A. R. Lourenço, F. J. A. Paula, y A. P. Piedade; *Materials Lett.* **11**, (3,4), 1991, 96-100.
- 219 (a) M. Alves da Silva, M. H. Gil, A. P. Piedade, J. S. Redinha, A. M. Oliveira Brett y J. M. C. Costa; *J. of Polymer Sci. Part A: Polymer Chem.* **29**, 1991, 269-274.
(b) M. Alves da Silva, M. H. Gil y E. Lapa; *J. Appl. Polymer Sci.* **34**, 1987, 871-880.
- 220 T. Omata, T. Lida, A. Tanaka y S. Fukui; *Eur. J. Appl. Microbiol.* **8**, 1979, 143-55.
- 221 S. Fukui y A. Tanaka; *Adv. Biochem. Eng.* **29**, 1984, 1-33.
- 222 H. Maeda, H. Suzuki y A. Yamauchi; *Biotech. Bioeng.* **15**, 1973, 607.
- 223 Y. Tanaka; *ibid.* **24**, 1982, 857.
- 224 F. Yoshii, T. Fujimura y I. Kaetsu; *ibid.* **23**, 1981, 833.
- 225 T. Sato y T. Tosa en *Industrial Application of Immobilized Biocatalysts*, (Eds.) A. Tanaka, T. Tosa, T. Kobayashi, 1993, pp. 3-13
- 226 W. G. Bardsley; *SIMFIT V. 4.0*. A computer program for simulation, curve fitting, statistical analysis and graph plotting using life sciences models. University of Manchester, 1994.
- 227 *Hiperchem TM. V3.0 for windows*. Molecular modeling system. Hipeercube. Inc. and Autodesk, Inc. 1993.
- 228 (a) A. G. Gornall, C. S. Bardawill y M. M. David; *J. Biol. Chem.* **177**, 1949, 751.
(b) H. W. Robinson, C. G. Hogden; *J. Biol. Chem.* **135**, 1940, 707.
- 229 B. F. Erlanger, F. Edel y A. J. Cooper; *Arch. Biochem. Biophys.* **115**, 1986, 206.
- 230 J. M. Guisán, A. Bástida, C. Cuesta, R. Fernández-Lefuente y C. M. Rosell; *Biotechnol. Bioeng.* **38**, 1991, 1144.
- 231 R. M. Blanco, J. M. Guisán y P. Halling; *Biotechnol. Lett.* **11**, 1989, 811.
- 232 R. M. Blanco, J. M. Guisán; *Enz. Micr. Tech.* **11**, 1989, 360-66.
- 233 R. M. Blanco, J. M. Guisán y P. Halling; *Biotechnol. Bioeng.* **40**, 1992, 1092.

- 234 C. Hansch y A. Leo en *Substituent constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology*, (Eds.) Wiley and Sons Inc. 1979.
- 235 V. Kasche en *Proteolytic Enzymes*, (Eds. J. Beynon, J. S. Bond), IRL Press. 1989 cap. 7, p. 128.
- 236 R. Weast (Eds.) *Handbook of Chemistry and Physics*, 1976.
- 237 O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr y R. J. J. Randall, *Biol. Chem.* **193**, 1951, 265.
- 238 (a) A. R. Alcántara, J. V. Sinisterra, C. Torres, J. M. Guisán, M. H. Gil y A. Williams; Congreso Internacional *Biocatalysis in Non-Conventional Media*, (Eds.) J. Tramper 1992.
- (b) A. R. Alcántara, J. V. Sinisterra, C. Torres, P. Romanelli, M. y A. Williams; Congreso Internacional de *Stability and Stabilization of Enzymes*, (Eds.) W. J. J. Van den Tweel, A. Harder y R. M. Buitelaar, Nereland, 1993, 167-174.
- 239 M. Arroyo (Tesis Doctoral) en *Síntesis de ácidos 2-arilpropiónicos homoquirales mediante la esterificación enantioselectiva catalizada por lipasas inmovilizadas*, Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Farmacia, 1995, pp. 77-78.
- 240 W. Kauzman; *Adv. Protein, Chem.* **14**, 1959, 1-63.
- 241 C. Tandford; *Adv. Protein, Chem.* **23**, 1968, 121-82.
- 242 Y. L. Khmelnsky, A. V. Levashov, N. L. Klyanchko y K. Martinek; *Enz. Microb. Technol.* **10**, 1988, 710-724.
- 243 J. P. Henley y A. Sadana; *Enz. Microbiol. Technol.* **7**, 1985, 50.
- 244 (a) V. Y. Levitsky, N. S. Melik-Nubarov, V. A. Siksnis, V. Y. Grinberg, T. V. Burova, A. Levashov y V. V. Mozhaev; *Eur. J. Biochem.* **219**, 1994, 219-30.
- (b) V. Y. Levitsky, A. A. Panova y V. V. Mozhaev; *Eur. J. Biochem.* **219**, 1994, 231-36.
- 245 T. Diego, P. Lozano y J. L. Iborra; *III Congreso Ibérico de Biotecnología*, (Eds.) F. Fernández- Polanco et al. Valladolid, 1996, pp. 573-74.
- 246 M. J. Hernáiz, M. Rúa, B. Celda, P. Medina, J. V. Sinisterra y J. M. Sánchez-Montero; *Appl. Biochem. Biotech.* **44**, 1994, 213-29.
- 247 J. M. Guisán, R. M. Blanco, A. Bastida, R. Fernandez-Lafuente, C. Cuesta, P. J.

- Halling; *Ann N. Y. Acad. Sci.* **672**, 1992, 158-166
- 248 M. Arroyo, J. M. Moreno y J. V. Sinisterra; *J. Mol. Catal.* **83**, 1993, 261-71.
- 249 (a) M. J. Cabezas (Tesis Doctoral) en *Síntesis de análogos de aminoácidos y estudio de la alteración del centro activo de la α -quimotripsina modificada*, Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Farmacia, 1993.
(b) V. Cerovsky y H.-D. Jakubke; *Enz. Microb. Technol.* **16**, 1994, 596-601.
(c) G. Ljunger, P. Adlercreutz y B. Mattiasson; *Biocatalysis* **7**, 1993, 279-88.
- 250 Novo enzymes preliminary product information sheet B 347-GB, 400, Junio 1986.
Novo Industri A/S, Novo Alle DK-2880 (Bagsvaerd, Dinamarca)
- 251 P. Clapés, P. Adlercreutz y B. Mattiasson; *Biotechnol. Appl. Biochem.* **12**, 1990, 376-386.
- 252 (a) V. Schellenberger, U. Schellenberger, Y. V. Mitin y H.-D. Jakubke; *Eur. J. Biochem.* **187**, 1990, 163-167.
(b) B. West y C.-H. Wong; *Chem. Soc. Chem. Commun.* 1986, 417-18.
(c) V. Schellenberger, K. Braune y H.-D. Jakubke; *Eur. J. Biochem.* **199**, 1991, 623-636.
- 253 H. F. Gaertner, T. Watanabe, J. V. Sinisterra y A. J. Puigserver; *J. Org. Chem.* **56**, 1991, 3149-53.
- 254 V. Kasche, U. Haufler, L. Riechmann *Methods in Enzymology*, **136**, 1987, 280-92.
- 255 V. V. Mozhaev, Y. L. Khmelnsky, M. V. Sergeera, A. B. Belova, N. L. Klyachko, A. V. Levashov y K. Martinek; *Eur. J. Biochem.* **184**, 1989, 597-602
- 256 R. M. Blanco, P. J. Halling, A. Bastida, C. Cuesta, J. M. Guisán; *Biotechnol. Bioeng.* **39**, (1), 1992, 75-84.
- 257 Y. L. Khmelnsky, F. K. Dien, A. N. Semenov, K. Martinek; *Tetrahed.* **40**, (21), 1984, 4425-32.
- 258 E. R. P. Van, E. O. Kamenskaya, Y. L. Khmelnsky; *Eur. J. Biochem.* **202**, 1991, 379-84.
- 259 (a) V. P. Tochilin, A. V. Maksimenko, V. M. Smirnov, I. V. Berezin, A. M. Klivanov, K. Martinek; *Biochem. Biophys. Acta.* **567**, 1979, 1-11.
(b) K. Moriya, K. Tanizawa, Y. Kanacka; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **162**,

- 1989, 408-14.
- (c) S. S. Wong y C. J. L. Wong; *Enz. Microb. Technol.* **14**, 1992, 866.
- 260 C. Laane, S. Boeren, K. Vos, C. Veeger; *Biotechnol. Bioeng.* **30**, 1987, 81-87.
- 261 A. M. Klibanov; *Annal. Biochem.* **93**, 1979, 1-25.
- 262 M. T. Martín, J. V. Sinisterra, A. Heras; *J. Mol. Catal.* **80**, 1993, 127-36.
- 263 (a) G. Soler, R. M. Blanco, R. Fernández-Lafuente, C. M. Rosell y J. M. Guisán; *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **750**, 1995, 349-56.
- (b) R. M. Blanco, G. Soler, A. Bastida y J. M. Guisán; *III Congreso Ibérico de Biotecnología*, Eds. F. Fernández-Polanco, P. A. García Encina y cols. Valladolid 1996, 563-64.
- 264 (a) K. Dabulis, A. M. Klibanov; *Biotech. Bioeng.* **41**, 1993, 566-71
- (b) P. Sabuquillo, G. Soler, R. M. Blanco, y J. M. Guisán; *III Congreso Ibérico de Biotecnología*, Eds. F. Fernández-Polanco, P. A. García Encina y cols. Valladolid 1996, 557-58.
- 265 R. M. Blanco, J. L. L. Rakels, J. M. Guisán y P. J. Halling; *Biochim. Biophys. Acta.* **1156**, 1992, 67-70.
- 266 A. Dominguez, N. Cabezas, J. M. Sánchez-Montero y J. V. Sinisterra; *Tetrahed.* **51**, (6), 1995, 1827-1844.
- 267 H. Kise y Hayakaw; *Enz. Microb. Technol.* **13**, 1991, 584.
- 268 M. Reslow, P. Adlercreutz y B. Mattiasson; *Appl. Microbiol. Biotech.* **26**, 1987, 1-8.
- 269 P. J. Halling; *Biotech. Bioeng.* **35**, 1990, 691-701.
- 270 (a) V. P. Torchilin, A. V. Maksimenko, V. M. Smirnov, I. V. Berezin, A. M. Klibanov y K. Martinek; *Biochem Biophys Acta.* **567**, 1979, 1-11.
- (b) M. H. Remy, C. Bourdillon y D. Thomas; *Biochim. Biophys. Acta.* **829**, 1985, 69-75.
- 271 J. M. Moreno, J. V. Sinisterra y A. Ballesteros; *J. Mol Catal.* **62**, 1990, 341-351.
- 272 M. Y. Gololobov, T. L. Voyushina y P. Adlercreutz; *Biocatalysis in Non-Conventional Media*, (Eds.) J. Tramper Elsevier Science. 1992, p. 434-442.
- 273 L. Gubicza; *Biocatalysis in Non-Conventional Media*, (Eds.) J. Tramper Elsevier Science 1992, p. 497-504.

- 274 (a) H. H. Weetall; *Appl. Biochem, Biotech.* **41**, 1993, 157-88.
(b) E. Whetje, P. Adlercreutz, B. Mattiasson; *Biotech. Bioeng.* **41**, 1993, 171-78.
- 275 G. E. Hein, R. B. McGriff y C. Niemann; *J. Am. Chem. Soc.* **82**, 1960, 1830.
- 276 S. G. Cohen y R. M. Schultz; *J. Biol. Chem.* **243**, 1968, 2607.
- 277 29.- B. Belleau y R. Chevalier; *J. Am. Chem. Soc.* **90**, 1968, 6864.
- 278 W. B. Lawson; *J. Biol. Chem.* **242**, 1967, 3397.
- 279 A. D. Mighell y R. A. Jacobson; *Acta Cryst.* **17**, 1964, 654.
- 280 Y. Hayashi y W. B. Lawson; *J. Biol. Chem.* **244**, 1969, 4158.
- 281 J. H. Heideman y E. T. Kaiser; *J. Am. Chem. Soc.* **90**, 1968, 1860.
- 282 P. Tobias, J. H. Heideman, K. W. Lo, E. T. Kaiser y F. J. Kézdy; *J. Am. Chem. Soc.* **91**, 1969, 202.
- 283 J. H. Udding, J. Fraanje, H. Hiemstra y W. N. Speckamp; *Tetrah. Asym.* **4**, (3), 1993 425-432.
- 284 D. H. Kim, Y. J. Kim; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **3**, (12), 1993, 2681-84.
- 285 R. Chenevert y M. Desjardins; *Can. J. Chem.* **72**, 1994, 2312.
- 286 K. Oshima, Y. Tomiuchi y H. Kise; *J. Jpn. Oil Chem. Soc.* **41**, (11), 1992, 1141-43.
- 287 G. Ahmed y E. Vulfson; *Biotech. Lett.* **16**, (4), 1994, 367-372.
- 288 K. Tanizawa, H. Yamada, K. Itho y Y. Kanoaka; *Chem. Pharm. Bull.* **39**, (10), 1991, 2748-49.
- 289 B. Nielsen, H. Fisher, B. Ebert; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **3**, (1), 1993, 107-14.
- 290 (a) M. J. Cabezas, C. Del Campo, E. Llama, J. V. Sinisterra y H. Gaertner. *J. Mol. Catal.* **71**, 1992, 261-78.
(b) J. F. Bello, E. F. Llama, C. del Campo, M. J. Cabezas, J. V. Sinisterra, M. S. Arias; *J. Mol. Catal.* **78**, 1993, 91-110.