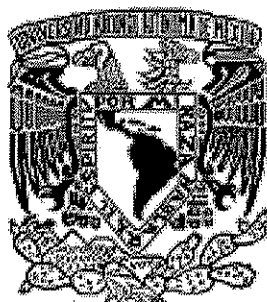


00581 /



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

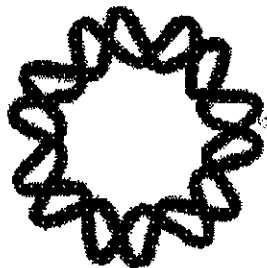
DISEÑO DE UN BIOCATALIZADOR TERMOESTABLE
POR MODIFICACION QUIMICA DE HEMOPROTEINAS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
I.BQ. HUMBERTO GARCIA ARELLANO

TUTOR: DR. RAFAEL VAZQUEZ DUHALT



CUERNAVACA, MOR.

2002

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: HUMBERTO GARCIA
ARELLANO

FECHA: 21-NOVIEMBRE-2002

FIRMA: 

Este trabajo se realizó en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología-UNAM, bajo la asesoría del Dr. Rafael Vázquez Duhalt.

Con amor, a mi esposa Lolita, gracias por tu compañía, amor, comprensión y sobre todo por tu alegría para hacer las cosas.

Con mucho cariño, a mis padres y hermanos, por su apoyo incondicional durante toda mi vida y porque siempre han estado presentes cuando los he necesitado.

Agradecimientos

Al Dr. Rafael Vázquez, por su apoyo y enseñanza durante mi estancia en su laboratorio. Gracias por su paciencia, orientación y sobre todo por la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo.

A los miembros del comité tutorial, Dra Gloria Saab Rincón, Dr. Mario Soberón Chávez y Dra. Amelia Farrés González Saravia. Gracias por su entusiasta participación durante el desarrollo de este proyecto y por contribuir a mi formación doctoral.

A los miembros del jurado, Dr. Eduardo Bárzana, Dr. Tonatiuh Ramírez, Dr. Enrique Morett, Dr. Lorenzo Segovia, Dr. Alfredo Martínez y Dr. Eduardo Horjales. Su revisión y crítica contribuyeron a hacer de éste un mejor trabajo.

Al M. C. Raunel Tinoco y a la Biol. Rosa Román, por su apoyo técnico, pero sobre todo por su enseñanza y amistad durante mi estancia en el laboratorio.

A los *recalcitrantes*, Raunel, Rosa, Brenda, Gaby, Eduardo, Marcela, Juan, Adriana, Gustavo, Nuria, Jorge y Carmen. Gracias por su amistad y compañía.

A mis compañeros y amigos, Lolita, Vanesa, Consuelo, Fernando, Mauricio, Adriana, Gerardo, Isadora, Ricardo, Vanessa, Gaby, Héctor, Sonia, Alma y Markus.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (33611-U) y al Instituto Mexicano del Petróleo (FIES 98-110-VI) por el financiamiento para la realización de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (118124) y a la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM por las becas otorgadas para la realización de los estudios de doctorado.

INDICE

INDICE.....	I
INDICE DE FIGURAS	III
INDICE DE TABLAS	V
RESUMEN.....	VI
SUMMARY.....	VIII
1. JUSTIFICACIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1. Biocatálisis en la industria petrolera.....	4
2.2. Estabilidad de proteínas	12
2.3. Modificación química de proteínas.....	15
2.3.1. <i>Inmovilización de enzimas</i>	15
2.3.2. <i>Entrecruzamiento</i>	17
2.3.3. <i>Cristales catalíticos de enzima entrecruzados (CLEC's)</i>	19
2.3.4. <i>Plásticos biocatalíticos</i>	20
2.3.5. <i>Modificación con polímeros</i>	21
2.4. Polietilén glicol.....	23
2.4.1. <i>Propiedades y aplicaciones</i>	24
2.5. El citocromo c como biocatalizador.....	26
3. HIPÓTESIS.....	34
4. OBJETIVOS.....	35
5. MATERIALES Y MÉTODOS	36
5.1. Reactivos y solventes	36
5.2. Mutación sitio dirigida de gene <i>cyc1</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y sobreexpresión en <i>E. coli</i>	36
5.3. Purificación de los citocromos <i>c</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mutantes.....	38
5.4. Modificación química de hemoproteínas	39
5.4.1. Síntesis de PEG activados	39
5.4.2. <i>Modificación con polietilén glicol (PEG)</i>	40
5.4.3. <i>Copolimerización del citocromo c en Nylon</i>	41
5.5. Determinación de la concentración de proteína	42
5.6. Determinación de los perfiles de actividad en función de la temperatura	43
5.7. Ensayos de estabilidad de las hemoproteínas modificadas con PEG (PM 5000 Da)	43

5.8. Ensayos de actividad contra sustratos hidrofóbicos.....	45
5.9. Determinación de los parámetros cinéticos.....	46
5.10. Análisis de la estructura secundaria y terciaria por dicroísmo circular y espectrometría UV-Visible.....	47
5.11. Desnaturalización térmica de los citocromos modificados	47
5.12. Determinación de los perfiles de actividad en presencia de guanidina.....	48
5.13. Desnaturalización química de los citocromos modificados.....	48
5.14. Análisis de las transiciones de desnaturalización al equilibrio y determinación de los parámetros termodinámicos del desplegamiento.....	49
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	54
6.1. Modificación química de hemoproteínas.....	54
6.1.1. <i>Síntesis del plástico biocatalítico citocromo-Nylon</i>	54
6.1.2. <i>Modificación de la cloroperoxidasa y peroxidasa con polietilén glicol (PEG)</i>	55
6.1.3. <i>Modificación química del citocromo c</i>	58
6.2. Estabilidad del citocromo modificado con PEG ₅₀₀₀	60
6.3. Actividad del citocromo c contra sustratos hidrofóbicos	64
6.4. Efecto del tamaño del polímero en la estabilidad de la proteína modificada.	71
6.5. Efecto de la mutación de los residuos adyacentes al sitio activo en la estabilidad del citocromo c de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> modificado con PEG ₅₀₀₀	75
6.6. Evaluación por dicroísmo circular de la estructura secundaria del citocromo c de corazón de caballo modificado con PEG ₅₀₀₀	80
6.7. Desnaturalización del citocromo en presencia de hidrocioruro de guanidina	84
6.8. Determinación de los parámetros termodinámicos	88
6.9. Evaluación de la estructura del sitio activo del citocromo c.....	89
6.10. Posible mecanismo de estabilización del polietilén glicol	94
7. CONCLUSIONES	96
8. PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES.....	98
9. REFERENCIAS.....	100
10. ANEXO	111

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Contenido de azufre en crudos nacionales 5

Figura 2. Representación esquemática de una molécula de asfalteno 8

Figura 3. Espectro de absorción de una fracción de asfaltenos rica en petroporfirinas, antes y después de un tratamiento enzimático con cloroperoxidasa 10

Figura 4. Entrecruzamiento inter e intra-molecular de proteínas con glutaraldehído..... 19

Figura 5. Estructura general del polietilén glicol 23

Figura 6. Estructura cristalográfica del citocromo c de corazón de caballo..... 27

Figura 7. Espectro UV-Vis del citocromo c de corazón de caballo oxidado..... 29

Figura 8. Posible ciclo catalítico del citocromo c en presencia de peróxido de hidrógeno y un sustrato aromático (AH) 32

Figura 9. Estrategia de mutagénesis del citocromo c de *Saccharomyces cerevisiae*..... 37

Figura 10. Síntesis de polietilén glicol activado con cloruro cianúrico 40

Figura 11. Curva estándar para la estimación de la concentración de Cyt-PEG 43

Figura 12. Ejemplo de un perfil de desnaturalización al equilibrio de citocromo c de corazón de caballo en función de la concentración de GuHCl 53

Figura 13. Perfil de actividades contra temperatura del citocromo c inmovilizado en Nylon..... 55

Figura 14. Perfil de actividades en función de la temperatura de hemoproteínas modificadas con PEG₅₀₀₀ 56

Figura 15. Estabilidad de hemoproteínas modificadas con PEG₅₀₀₀ 57

Figura 16. Estimación del peso molecular del citocromo modificado por espectrometría de masas (ES-MS) 59

Figura 17. Perfil de actividades contra temperatura del citocromo c 61

Figura 18. Estabilidad del citocromo c a 80°C y 15% de acetonitrilo. La actividad se midió incubando a la proteína a la temperatura indicada en ausencia y presencia de cloruro de pinacianol 62

Figura 19. Estabilidad del Cyt-PEG₅₀₀₀ a 80°C. El ensayo se realizó en ausencia de sustrato en 15% de acetonitrilo. Después del tiempo indicado se adicionaron 4 µl de pireno 5 mM en acetonitrilo y 5 µl de H₂O₂ 20 mM para iniciar la reacción 63

Figura 20. Efecto de la adición de mPEG libre en la estabilidad del citocromo no modificado..... 64

Figura 21. Actividad específica sobre cloruro de pinacianol de las preparaciones de citocromo en función de la hidrofobicidad del medio de reacción6 8

Figura 22. Cinéticas de Michaelis-Menten de las preparaciones de citocromo a 30°C y 80°C7 0

Figura 23. Electroforesis (SDS-PAGE) de los citocromos modificados con PEG de diferente peso molecular7 2

Figura 24. Estructura del citocromo c de levadura7 7

Figura 25. Estabilidad de las proteínas mutantes a 70°C8 0

Figura 26. Espectros de dicroísmo circular del Cyt-wt y del Cyt-PEG₅₀₀₀8 2

Figura 27. Perfil de desnaturalización térmica del citocromo c de corazón de caballo seguido por dicroísmo circular a 222 nm8 4

Figura 28. Perfil de actividades del citocromo c en presencia de hidrocloreto de guanidina (GuHCl).....8 6

Figura 29. Curvas de desnaturalización al equilibrio de las preparaciones de citocromo c en función de la concentración de GuHCl.....8 7

Figura 30. Espectros UV-Visible y de dicroísmo circular del Cyt-wt y del Cyt-PEG₅₀₀₀ en la región del Soret (sitio activo)9 0

Figura 31. Estabilidad del sitio activo del citocromo c de corazón de caballo a 80°C.....9 3

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Contenido de azufre en algunos crudos mundiales 5

Tabla 2. Reacciones biocatalíticas catalizadas por el citocromo *c*29

Tabla 3. Oxidación de hidrocarburos polinucleoaromáticos con citocromo *c* no modificado y con citocromo doblemente modificado con polietilén glicol y grupos metilo31

Tabla 4. Actividad específica del citocromo contra sustratos hidrofóbicos65

Tabla 5. Actividad del citocromo en 97.5% de solvente orgánico.....66

Tabla 6. Constantes cinéticas de las preparaciones de citocromo *c* a 30 y 80°C.....71

Tabla 7. Porcentaje de modificación y peso molecular estimado de los citocromos modificados con PEG (PM 350, 750 y 2000 Da).....71

Tabla 8. Actividades específicas y actividad residual después de 7 h a 80°C.....73

Tabla 9. Grado de modificación y actividad específica contra pireno de los citocromos *c* de levadura mutantes78

Tabla 10. Parámetros termodinámicos de la desnaturalización del citocromo *c* de corazón de caballo a 25°C89

RESUMEN

El uso de los crudos pesados como fuente de energía está limitado por su alto contenido de azufre. La combustión de estos crudos produce óxidos de azufre que tienen un fuerte impacto ambiental ya que contribuyen a la formación de lluvia ácida. Actualmente existen tecnologías fisicoquímicas destinadas a la remoción del azufre contenido en las fracciones del petróleo, sin embargo, estas resultan ineficientes en el tratamiento de las fracciones pesadas del crudo. Trabajos anteriores han demostrado la capacidad biocatalítica de diversas hemoproteínas en la oxidación de compuestos polinucleoaromáticos y azufrados derivados del petróleo, pero su aplicación en la desulfurización de los combustibles está limitada, entre otros factores, por las altas temperaturas de operación utilizadas en la industria petrolera y por la hidrofobicidad de los sustratos. Debido a esto, el propósito de este trabajo consistió en obtener por medio de modificaciones químicas, un biocatalizador estable a la temperatura y capaz de oxidar compuestos hidrofóbicos en medios con bajos contenidos de agua.

Se obtuvo un plástico biocatalítico basado en citocromo *c* de corazón de caballo y Nylon. Este biocatalizador demostró actividad contra pireno y cloruro de pinacianol en un amplio rango de temperaturas. La copolimerización con Nylon alteró el perfil de temperaturas de la proteína, aumentando en 10°C su temperatura óptima. Sin embargo, esta modificación química también provocó un drástico decremento en la actividad específica de la proteína.

La modificación del citocromo *c* con PEG (PM 5000 Da) produjo un biocatalizador activo a temperaturas superiores a 100°C. Este biocatalizador logró retener una alta actividad residual cuando se incubó en ausencia de sustrato por 7 h a 80°C. La modificación con PEG produjo un conjugado capaz de oxidar compuestos polinucleoaromáticos y azufrados a 80°C en presencia de peróxido de hidrógeno y con una alta actividad en medios con 97.5% (v/v) de solvente orgánico. La estabilidad y actividad de este biocatalizador fueron dependientes del grado de modificación de la proteína y del tamaño del agente modificante.

Para evaluar el efecto de la presencia del polímero en posiciones cercanas a la cavidad del sitio activo, se hizo la mutagénesis sitio dirigida del citocromo *c* de *Saccharomyces cerevisiae*. Los residuos K27 y K79 fueron reemplazados por alanina o treonina. Nuestros resultados demostraron que la ausencia de polímero en el residuo Lys79 y modificación química de la Lys27 son necesarias para obtener una alta estabilidad del biocatalizador.

Se hizo un análisis estructural del citocromo *c* de corazón de caballo modificado con PEG. Los resultados obtenidos por dicroísmo circular y espectroscopía UV-Visible indicaron que la modificación altera la estructura nativa del citocromo, provocando una desestabilización de su estado nativo. Por otra parte, los ensayos de desnaturalización química del citocromo modificado demostraron la aparición de un estado intermedio durante el desplegamiento. Los espectros UV-Visible del citocromo modificado obtenidos a 80°C mostraron una alta conservación de la banda Soret, sugiriendo una mayor conservación del sitio activo de la proteína. Adicionalmente, la velocidad de desplegamiento del sitio activo fue 4 veces menor en el citocromo modificado en comparación con la proteína no modificada.

En conclusión, nuestros resultados sugieren que la modificación química con PEG desestabiliza termodinámicamente a la proteína. Al mismo tiempo, el polímero actúa como una barrera cinética durante el desplegamiento del citocromo, favoreciendo la aparición de un intermedio que conserva su sitio activo. Este intermedio puede ser responsable de la actividad encontrada a altas temperaturas.

SUMMARY

During the next years, the crude oil reserves will be exhausted and producers will be forced to exploit their heavy oil reserves. The use of heavy oils as raw material and energy source is limited by their high sulphur content. The combustion of these oils results in the formation of sulphur oxides, which are undesirable because of their contribution to acid rain. Nowadays, the oil industry uses physicochemical technologies to remove sulphur from middle distillate fractions, but this technology is inefficient when heavy oil fractions are treated. Previous work has demonstrated the ability of several heme proteins to selectively oxidize polynuclear aromatic hydrocarbons and organosulphur compounds derived from oil. However, enzymatic desulphurisation is limited by the harsh conditions presented by the oil industry, i.e. high temperatures and the hydrophobicity of the substrates. The aim of this work was to obtain through chemical modification, a thermostable biocatalyst able to oxidize hydrophobic compounds in low water media.

A biocatalytic plastic was obtained by means of the copolymerization of horse heart cytochrome *c* with Nylon polymer. This biocatalyst was active against pinacyanol chloride and pyrene on a wide range of temperature. The copolymerization with Nylon altered the temperature profile of the protein, increasing its optimum temperature by 10°C. However, this chemical modification decreased drastically the activity of the protein.

Horse heart cytochrome *c* was coupled to PEG (MW 5000 Da). The pegylated cytochrome (Cyt-PEG₅₀₀₀) was active beyond the boiling point of water. Stability assays showed a high retention of activity upon heat treatment for 7 h at 80°C in the absence of substrate. The chemically modified protein was able to oxidize polynuclear aromatic hydrocarbons and organosulphur compounds at 80°C in the presence of hydrogen peroxide and was highly active in media containing 97.5% of organic solvents. The activity and stability of Cyt-PEG₅₀₀₀ showed to be dependent on the degree of modification and the size of the polymer.

To evaluate the effect of the presence of the polymer in positions close to the heme pocket site-directed mutagenesis was performed on cytochrome *c* from *Saccharomyces cerevisiae*. The residues Lys27 and Lys79 were replaced by Ala or Thr. Our results demonstrate that the absence of polymer on Lys79 and the chemical modification of Lys27 are necessary in order to achieve higher stabilization of the biocatalyst.

Structural analysis of the Cyt-PEG₅₀₀₀ conjugate by circular dichroism and UV-Visible spectroscopy showed that chemical modification disturbs the secondary structure of the protein, leading to a destabilization of the native state of cytochrome molecule. On the other side, guanidine-induced unfolding of the conjugate showed the appearance of an intermediate state. The UV-Visible spectra of cytochrome samples registered at 80°C showed a complete conservation of the Soret absorption band of Cyt-PEG₅₀₀₀, suggesting a more conserved structure of the active site than the unmodified protein. The unfolding rate at 80°C of the active site of the pegylated cytochrome was four-fold lower than the unmodified protein.

In conclusion, our results suggest that PEG coupling induces a thermodynamic destabilization of the cytochrome molecule. At the same time, the polymer may act as a kinetic barrier that favours the intermediate state formation. This intermediate maintains its structure around the active site and may be the responsible for the activity found at high temperature.

1. JUSTIFICACIÓN

El desarrollo industrial durante el siglo pasado estuvo caracterizado por la alta productividad de bienes y servicios. Este estilo altamente productivo ha sido responsable de un impacto sumamente negativo en el medio ambiente. Si bien es cierto que existen emisiones naturales de una gran cantidad de contaminantes, también es cierto que la industrialización ha contribuido de manera importante a la dispersión de contaminantes y a un consumo desmesurado de energía y materias primas renovables y no renovables. Las industrias de generación de energía, metalúrgica, petroquímica, química y del papel se han identificado como las principales actividades productoras de contaminación y con un consumo elevado de materias primas; adicionalmente, estos sectores consumen cerca del 30% del total energético utilizado por la industria. A partir de la década de los 70's se generó un creciente interés sobre los efectos tóxicos en humanos y en el ambiente ocasionados por la liberación indiscriminada de sustancias químicas. Los efectos tóxicos de pesticidas y bifenilos policlorados han sido bien documentados desde la década de los 60's y en los últimos años muchas otras sustancias como las dioxinas, hidrocarburos polinucleoaromáticos (HPAs) y metales pesados han generado preocupación debido a sus inciertos efectos a corto y largo plazo. Todas estas sustancias son liberadas al ambiente como resultado de aplicaciones humanas directas (p. ej. los pesticidas, fertilizantes y algunos solventes) e indirectamente como en el caso de productos de desecho de diferentes actividades industriales, incineración y combustión. Estos contaminantes tienen la capacidad de dispersarse generando una contaminación ampliamente distribuida.

En los últimos años la sociedad ha tomado conciencia del deterioro ambiental ocasionado por las actividades de producción y se han establecido fuertes regulaciones que tienen como objetivo presionar al sector industrial para que desarrolle nuevos programas destinados a un

mayor cuidado ambiental. La utilización de métodos de producción "limpios" puede evitar o minimizar los problemas de contaminación ambiental, reduciendo el gasto debido al tratamiento de los efluentes. La tendencia actual en el desarrollo industrial involucra el empleo de tecnologías y procesos que reducen el uso de materias primas y de energía, que aprovechan al máximo los recursos renovables, que disminuyen la generación de contaminantes y productos tóxicos de desecho, y finalmente que generan productos reciclables y/o biodegradables. En términos generales, cualquier cambio que tienda a hacer la producción más limpia y eficiente por unidad de producto tendrá un fuerte impacto económico en la industria.

La biotecnología ha afectado positivamente algunas de las actividades productivas, principalmente las industrias farmacéutica, textil, del papel y química. En la mayoría de los casos, la aplicación de la biotecnología ha llevado a un desarrollo industrial más compatible con el ambiente a través del remplazo de los químicos convencionales, altamente contaminantes. Adicionalmente existen métodos de producción biotecnológicos que reducen la emisión de productos de desecho, ayudando a las industrias a utilizar más eficientemente las materias primas. La industria actual está fuertemente basada en el petróleo y sus derivados como fuentes de materia prima y de energía. El uso del petróleo genera una gran contaminación atmosférica y uno de sus impactos más importantes es la generación de la lluvia ácida, la cual se produce por la formación de óxidos de azufre durante la combustión. La biotecnología puede jugar un papel importante en la generación de procesos enzimáticos que permitan la remoción de azufre de los combustibles derivados del petróleo, disminuyendo así su potencial contaminante. La utilización de enzimas en procesos industriales se presenta como una herramienta interesante para lograr procesos eficientes y limpios debido a que su alta selectividad disminuye el uso de materias primas. Adicionalmente, las enzimas pueden ser utilizadas bajo condiciones de reacción moderadas, reduciendo el consumo energético necesario para mantener temperaturas y presiones elevadas, comunes en muchos de los procesos de síntesis orgánica. Las enzimas más utilizadas industrialmente son del tipo

despolimerizante e incluyen proteasas, lipasas, celulasas y amilasas. Actualmente, existen áreas de investigación destinadas a modificar la especificidad de estas enzimas hacia diferentes sustratos, a mejorar las propiedades catalíticas y de resistencia, así como a ampliar las condiciones de reacción óptimas para hacerlas más compatibles con los procesos actuales.

2. ANTECEDENTES

2.1. Biocatálisis en la industria petrolera

El uso de combustibles fósiles para la generación de energía eléctrica y en la industria petroquímica se incrementará en los próximos años, mientras que las reservas mundiales de crudos ligeros disminuirán. Muchos países productores poseen grandes reservas de crudos pesados que son altamente viscosos y contienen típicamente 120-1500 ppm de metales pesados tales como Níquel y Vanadio, así como cantidades apreciables de azufre que oscilan entre 0.05 y 5% (Bhadra *et al.*, 1987), aunque se han reportado valores cercanos al 14% (Grossman *et al.*, 1999) (Figura 1 y Tabla 1). En términos generales, se ha encontrado que la cantidad de azufre aumenta proporcionalmente con el punto de ebullición de la fracción destilada, dando como resultado que las fracciones del petróleo con alto punto de ebullición contengan un alto contenido de azufre. (Grossman *et al.*, 1999). La presencia de azufre reduce la eficiencia en la combustión de la gasolina, y sus productos de combustión (dióxidos de azufre y sólidos suspendidos) contribuyen de manera importante a la contaminación atmosférica y a la generación de lluvias ácidas (Setti *et al.*, 1992).

Por otra parte, se espera que las agencias oficiales ambientales impongan nuevos estándares ambientales que obligarán a las refinerías a producir combustibles con bajos niveles de azufre. Las nuevas, y cada vez más estrictas, normas ambientales proponen la reducción del contenido de azufre en gasolinas y diesel desde 330 ppm a sólo 30 ppm, es decir una reducción del 90%. (Chemical and Engineering News, 1999).

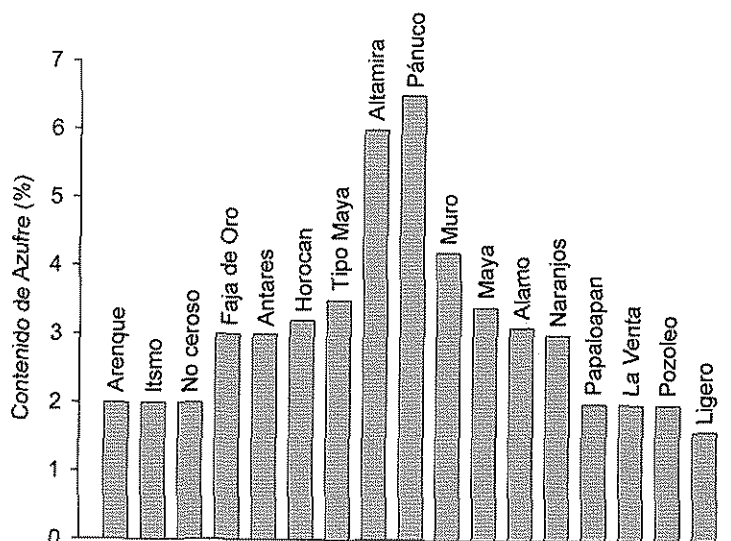


Figura 1. Contenido de azufre en crudos nacionales. Fuente: Instituto Mexicano del Petróleo.

Tabla 1. Contenido de azufre en algunos crudos mundiales.

Fuente	% Azufre
Kuwait	2.6
Middle East	1.5 - 3.0
Venezuela	1.7
Mississippi	1.6
West Texas	0.05 - 5.0
California	1.0
Canadá	0.44
East Texas	0.26
North Africa	0.18
Far East	0.10

Fuente: Monticello and Finnerty (1985).

En las refinerías, el azufre es removido de las fracciones derivadas del petróleo crudo mediante un proceso denominado hidrodesulfuración (HDS). En este proceso, las fracciones del petróleo son sometidas a altas temperaturas (290°C - 500°C) y presiones (150 - 3000 psi) en presencia de catalizadores especiales e hidrógeno (Bhadra *et al.*, 1987). Además de ser un proceso costoso, la HDS sólo es efectiva en la desulfuración de fracciones del petróleo de mediano rango, como las que son destinadas a la formulación de combustibles más ligeros que

el diesel. Dependiendo del producto a ser tratado, el nivel de desulfuración requerido y el tamaño de la unidad, se estima que el costo de la desulfuración de crudos pesados y tierras bituminosas se encuentra entre 10 y 16 dólares por barril (Bhadra *et al.*, 1987). Los compuestos orgánicos azufrados contenidos en las fracciones del petróleo de bajo punto de ebullición, como la gasolina, son principalmente tioles, sulfuros y tiofenos. Estos compuestos son fácilmente removidos por medio de la HDS, sin embargo, las fracciones con puntos de ebullición intermedios, como el diesel y aceites combustibles, contienen benzotiofenos y dibenzotiofenos (DBT's), los cuales son considerablemente más difíciles de remover mediante HDS. Adicionalmente, entre los derivados del DBT más persistentes se encuentran los dibenzotiofenos con sustituciones adyacentes al átomo de azufre. Estos son considerados como recalcitrantes debido a que las sustituciones provocan limitaciones estéricas que evitan el acceso del átomo de azufre al sitio activo del catalizador (Grossman *et al.*, 1999). La resistencia a la remoción que presentan los compuestos derivados del DBT dificulta alcanzar los bajos niveles de azufre establecidos por las regulaciones ambientales.

La desulfuración biológica del petróleo crudo y sus productos es una alternativa atractiva a los métodos termoquímicos tradicionales de altas temperaturas y presiones debido a las condiciones relativamente suaves para las reacciones biológicas que tienden a hacerlas más seguras y energéticamente menos costosas (McFarland *et al.*, 1998). Existen varios estudios para desarrollar tecnologías de desulfuración basados en la acción microbiana, mediante el uso de bacterias aerobias (Monticello and Finnerty, 1985; Kayser *et al.*, 1993) y anaerobias (Kim *et al.*, 1990; Miller, 1992). Dentro de las ventajas que ofrecen los procesos de biodesulfuración destaca el hecho de que se llevan a cabo a temperatura ambiente y no requieren de altas presiones, por lo que los reactores empleados serían relativamente menos costosos. A pesar de esto, el proceso es poco eficiente ya que la reacción de biodesulfuración microbiana se lleva a cabo en la interfase formada por las fases acuosa y orgánica. Este hecho implica el uso de grandes volúmenes de agua que, a su vez, dificulta la posterior separación de las emulsiones

formadas. Idealmente, la reacción de biodesulfuración debería realizarse en medios con ausencia o bajos contenidos de agua.

Desde hace algunos años se conoce que las enzimas pueden catalizar reacciones en solventes orgánicos y que usualmente sólo una pequeña capa de hidratación es necesaria para que sean activas en medio orgánico (Klibanov, 1997). En los últimos años la oxidación enzimática se ha revelado como una alternativa interesante a la biodesulfuración. Ohshiro *et al.* reportaron la desulfurización enzimática de DBT utilizando un extracto enzimático de *Rhodococcus erythropolis*. La reacción se llevó a cabo en medio acuoso a 30°C y el producto de la reacción fue caracterizado e identificado como 2-hidroxibifenilo (2-HBF). La reacción de desulfurización del DBT procedió a través de intermediarios y la velocidad de la reacción con el extracto enzimático demostró ser dependiente de NADH⁺ (Ohshiro *et al.*, 1994). Este es el primer reporte que describe la transformación enzimática de DBT a 2-HBF en ausencia de células, sin embargo, el sistema de reacción todavía dista de ser el óptimo. La dependencia del cofactor, así como la presencia de un medio acuoso plantean un problema difícil de resolver. Recientemente se ha reportado la oxidación biocatalítica de compuestos azufrados (en concentraciones de 1.6%) contenidos en diesel utilizando la cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago* en presencia de 0.25 mM de peróxido de hidrógeno a temperatura ambiente (Ayala *et al.*, 1998). Como resultado de este tratamiento los compuestos azufrados fueron selectivamente transformados a sus respectivos sulfóxidos y sulfonas, los cuales fueron posteriormente removidos por destilación. El contenido de azufre en el diesel después del tratamiento biocatalítico fue 0.27% y el perfil de los hidrocarburos totales presentes no se vio alterado. Esto es importante desde el punto de vista de la industria petrolera, ya que permite retener el poder energético del combustible.

Por otra parte, entre el gran número de compuestos orgánicos presentes en el petróleo se encuentra la fracción pentano-insoluble conocida como asfaltenos (Gallegos and Sundararaman, 1985; Filby and VanBerkel, 1987; Reynolds and Biggs, 1988). Esta fracción es

considerada como un sólido amorfo con un alto peso molecular. La estructura de los asfaltenos (Figura 2) dista mucho de estar elucidada, pero existen diferentes evidencias que indican que esta fracción es una mezcla compleja de compuestos aromáticos y alifáticos condensados, heteroátomos (S, O, N) (Speight and Moschopedis, 1981; Pelet *et al.*, 1986) y petroporfirinas asociadas a metales, Fe, Ni y V (Hodgson, 1973; Filby, 1975).

Una evidencia adicional sobre la complejidad de los asfaltenos la constituye la dificultad de estimar confiablemente su peso molecular, el cual puede variar de 200 a 10,000 Da según la técnica utilizada (Vazquez-Duhalt *et al.*, 2002). Dependiendo de la fuente de obtención del crudo, el contenido de asfaltenos puede ser menor al límite de detección o puede ser muy abundante, constituyendo hasta el 50% del total.

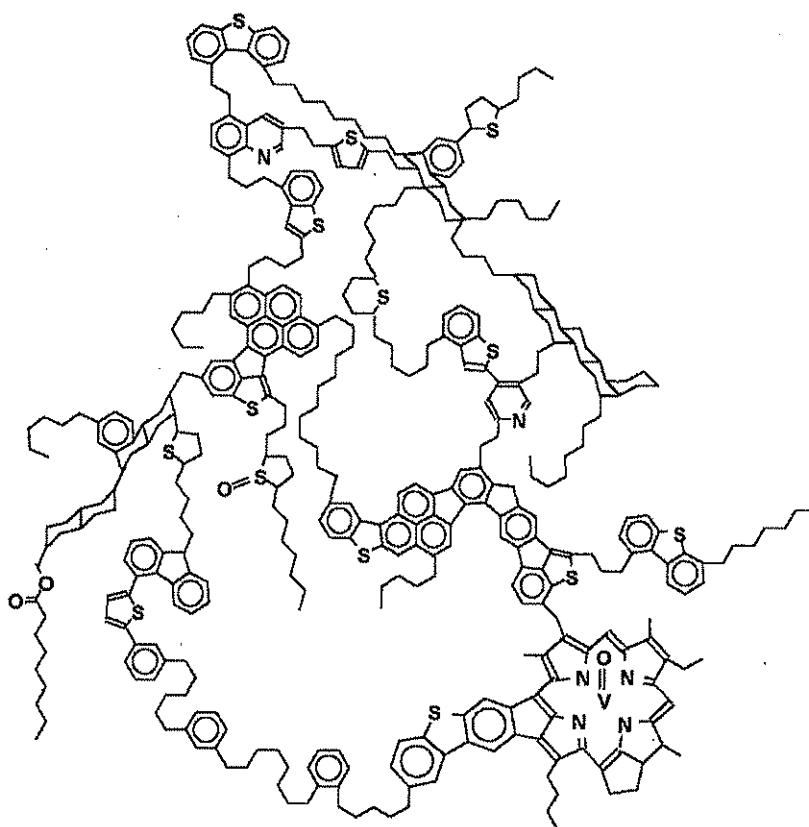


Figura 2. Representación esquemática de una molécula de asfalteno. Fuente: Strausz *et al.*, 1992.

La fracción de asfaltenos es responsable de la alta viscosidad de algunos crudos y de problemas relacionados con la recuperación, separación y tratamiento de crudos pesados y tierras bituminosas. Adicionalmente, durante el craqueo catalítico, proceso mediante el cual se rompen las moléculas de alto peso molecular para la generación de crudos más ligeros, los catalizadores empleados se cubren con una capa inactivante derivada de los asfaltenos llamada coque. La presencia de este compuesto provoca que los catalizadores sólo permanezcan activos por segundos antes de ser inactivados. El catalizador puede ser recuperado y regenerado, lo cual se traduce en una elevación de los costos de operación y mantenimiento. Adicionalmente, el proceso de regeneración es relativamente lento comparado con el tiempo que el catalizador permanece activo bajo las condiciones del proceso (Slade, 1998).

Los asfaltenos constituyen la fracción más recalcitrante del petróleo y existen pocas evidencias experimentales que soporten el biocraqueo (rompimiento enzimático de moléculas de alto peso molecular). Fedorak *et al.* han reportado la modificación enzimática de asfaltenos y petroporfirinas (Fedorak *et al.*, 1993). La cloroperoxidasa en un sistema de solventes orgánicos puede virtualmente eliminar la banda Soret de petroporfirinas en una fracción de bajo peso molecular de los asfaltenos (Figura 3). Esto indicó que las petroporfirinas fueron transformadas y condujo al estudio de oxidación enzimática de metaloporfirinas puras. Los compuestos puros níquel-octaetilporfirina (NiOEP) y vanadil-octaetilporfirina (VOEP) fueron oxidados en 93 y 53% respectivamente. La liberación de los metales, Ni y V, por la CPO se atribuyó a la disrupción de la integridad del sistema tetrapirrólico más que a una simple liberación del metal, como en el caso de la desmetalización con un tratamiento ácido (Fedorak *et al.*, 1993). Sin embargo, puesto que la reacción enzimática depende de la presencia de cloro, los productos del tratamiento podrían ser clorados lo cual limitaría su uso posterior como combustible o materia prima.

El tratamiento enzimático de los asfaltenos puede ser una alternativa interesante para la remoción de metales evitando con ésto el envenenamiento de los catalizadores empleados durante el craqueo catalítico.

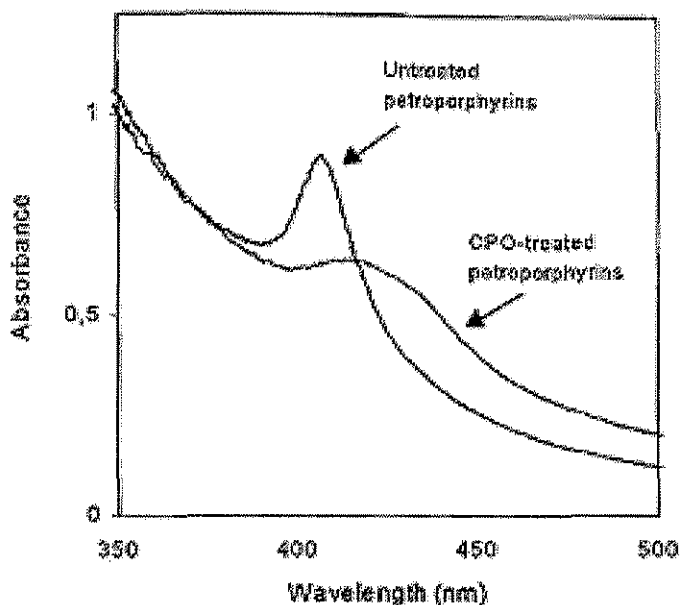


Figura 3. Espectro de absorción de una fracción de asfaltenos rica en petroporfirinas, antes y después de un tratamiento enzimático con cloroperoxidasa. Fuente: Fedorak *et al.*, 1993.

Por otra parte, los hidrocarburos polinucleoarómicos (HPAs) son compuestos contaminantes generados por la combustión incompleta del material orgánico contenido en el petróleo crudo. La importancia de la contaminación con HPAs radica en que se ha considerado que poseen cierta actividad carcinogénica y mutagénica (International Agency for Research on Cancer, 1983). Se han reportado diversas hemoproteínas no enzimáticas que son capaces de catalizar la modificación de los HPAs en presencia de peróxido de hidrógeno, entre ellas el citocromo P450 (Harford-Cross *et al.*, 2000), el citocromo *c* (Torres *et al.*, 1995) y la hemoglobina (Ortiz-Leon *et al.*, 1995; Torres and Vazquez-Duhalt, 2000), así como algunas enzimas como la lignina peroxidasa (Hammel *et al.*, 1986; Vazquez-Duhalt *et al.*, 1994) y

manganeso peroxidasa (Bogan *et al.*, 1996). Los productos de oxidación obtenidos después de la reacción enzimática con las hemoproteínas son principalmente las quinonas correspondientes y compuestos hidroxilados, los cuales son no mutagénicos o presentan una toxicidad reducida (Durant *et al.*, 1996) y adicionalmente, al ser compuestos más oxidados, su biodisponibilidad se ve aumentada haciéndolos más fáciles de biodegradar (Stucki and Alexander, 1987; Vazquez-Duhalt, 1998). Sin embargo, un factor importante que limita la oxidación enzimática de los HPAs es su hidrofobicidad. La alta hidrofobicidad resulta en limitaciones en la transferencia de masa ya que el sustrato se ve particionado más favorablemente hacia el solvente orgánico que hacia el sitio activo de la enzima. Este problema se ha tratado de resolver a través de la modificación química de proteínas. La lignino peroxidasa del hongo *Phanerochaete chrysosporium* ha sido modificada con grupos bencilo, naftilo y antracilo mediante una alquilación reductiva. La modificación incrementó la velocidad de oxidación y la eficiencia catalítica de la lignino peroxidasa contra algunos compuestos pirrólicos y aminas aromáticas (Vazquez-Duhalt *et al.*, 1995). La mayoría de los productos obtenidos fueron dímeros o polímeros y en algunos casos se detectó la presencia de átomos de oxígeno. Sin embargo, no se encontró evidencia del rompimiento de enlaces C-C y en términos generales las reacciones catalizadas por la lignino peroxidasa produjeron compuestos de alto peso molecular que contuvieron átomos de N. La formación de estos compuestos no presenta ventajas notables en vista de una posible aplicación durante la refinación del petróleo (Vazquez-Duhalt *et al.*, 1995). Por otra parte, la doble modificación química del citocromo con polietilén glicol en los grupos amino y metil-ésteres en los grupos carboxilo, produjo un biocatalizador altamente hidrofóbico que fue capaz de oxidar 17 de los 20 compuestos aromáticos probados, mientras que la proteína no modificada sólo fue capaz de oxidar 8 compuestos (Tinoco and Vazquez-Duhalt, 1998). Este trabajo demostró que la modificación química de enzimas puede ser una alternativa viable para el desarrollo de biocatalizadores utilizados con propósitos ambientales.

En las refinerías, muchas de las líneas de transporte de las fracciones del petróleo deben mantenerse por arriba de 80°C, temperatura a la cual los compuestos cerosos se separan fácilmente (McFarland *et al.*, 1998) y se reduce la viscosidad del fluido, lo cual facilita el bombeo y transporte de los combustibles. Actualmente no existen biocatalizadores destinados a la remoción de azufre del DBT y sus derivados que sean activos a esta temperatura. La implementación de procesos biotecnológicos en la industria petrolera deberá tener en cuenta que un proceso biocatalítico ideal tendrá que ser compatible desde el punto de vista tecnológico y económico con los procesos de refinería actuales. Se deberán diseñar, por tanto, procesos biocatalíticos que promuevan una mayor estabilidad del biocatalizador, mayores velocidades de reacción, menores limitaciones en transferencia de masa, menores limitaciones al uso de concentraciones elevadas de solventes y temperaturas relativamente altas, así como una amplia especificidad de sustratos, sin dañar o reducir el contenido energético de los combustibles.

2.2. Estabilidad de proteínas

Una de las principales limitaciones en el uso de las enzimas al nivel industrial es la relativamente baja estabilidad de estos catalizadores bajo las condiciones del proceso, que puede involucrar presiones, temperaturas y pH extremos, así como la presencia de agentes desnaturizantes como solventes y otros químicos. El incremento en la estabilidad de las enzimas facilita la utilización de temperaturas elevadas en la reacción enzimática, lo cual, a su vez, permite menores riesgos de contaminación microbiana, mayores velocidades de reacción, mayor solubilidad de sustratos, menor viscosidad del medio de reacción y menores limitaciones en la transferencia de masa (Wong and Wong, 1992).

El término "estabilidad" en una proteína se puede analizar termodinámica o cinéticamente. La estabilidad termodinámica se aplica, generalmente, para proteínas que se desnaturizan y

repliegan rápidamente, de manera reversible y cooperativamente. En el caso de proteínas pequeñas con un solo dominio estructural, generalmente se considera que poseen sólo dos estados macroscópicos estables, el nativo y el desplegado. La reacción de desnaturalización puede ser descrita como una transición en equilibrio entre dos poblaciones de proteínas con conformaciones nativas o desplegadas.



En donde K_d representa la constante de equilibrio del desplegamiento.

En estos casos, la estabilidad de la proteína se estima mediante la diferencia en energías libres de Gibbs (ΔG_{ND}°) entre los estados nativo y desplegado y los únicos factores que afectan la estabilidad son las energías libres relativas de los estados nativo (G_N°) y desplegado (G_D°).

$$\Delta G_{ND}^\circ = G_D^\circ - G_N^\circ = -RT \ln K_d$$

Mientras más positivo sea el valor de ΔG_{ND}° más estable será la proteína a la desnaturalización. La ΔG_{ND}° para proteínas globulares está usualmente entre 5 a 15 kcal/mol (Dill, 1990).

Por otra parte, la estabilidad cinética se refiere a la velocidad con que se despliega una proteína bajo condiciones desnaturalizantes. Una proteína cinéticamente estable se desplegará más lentamente que una proteína cinéticamente menos estable. Este tipo de análisis se aplica normalmente para proteínas cuyo desplegamiento es lento o que se inactivan irreversiblemente (debido a fenómenos de agregación, proteólisis, degradación química, etc.).



En donde k_i representa la constante de inactivación de un proceso irreversible.

En una proteína cinéticamente estable existe una barrera energética mayor para alcanzar el estado de transición, por lo cual, la estabilidad cinética estará definida por la energía de activación del proceso (ΔG°_{EA}), o bien, por la diferencia en energías libres entre el estado nativo (G°_N) y el estado de transición (G°_{ET}).

$$-\Delta G^\circ_{EA} = G^\circ_{ET} - G^\circ_N = RT \ln[k_B T / k_i h]$$

En donde k_B es la constante de Boltzman (J/K), h es la constante de Plank (J/min), R es la constante de los gases (J/mol.K), T es la temperatura (K) y k_i es la constante de inactivación de la proteína (Longo and Combes, 1999). Para proteínas cuyas inactivaciones se ajustan a un modelo de primer orden, k_i puede ser estimada a partir de la relación $A = A_0 e^{-k_i t}$, en donde A_0 y A son las actividades iniciales y finales a un tiempo t (min) (Longo and Combes, 1999).

Varios reportes han establecido de manera general las diferentes interacciones no covalentes responsables de mantener la conformación plegada de la proteína. En solución acuosa, las interacciones de van der Waals ocurren entre los residuos de la proteína y entre estos residuos y el agua que los rodea. Usualmente se considera que la energía de estas interacciones es de magnitud similar, por lo que su contribución global a la estabilidad de la proteína es muy baja (Privalov, 1992). Las interacciones entre grupos polares (puentes de hidrógeno) siguen el mismo comportamiento, los puentes de hidrógeno se pueden formar entre los grupos polares de la proteína y entre estos grupos con el agua, siendo su contribución global a la estabilidad muy cercana a cero (Privalov, 1992). Por otra parte, en las proteínas no existen muchas interacciones entre grupos cargados (puentes salinos) por lo que se asume que tienen un papel secundario en la estabilización de la conformación nativa de la proteína (Hollecker and Creighton, 1982) aunque pueden ser importantes durante el plegamiento de la misma. Por el contrario, las interacciones hidrofóbicas han sido consideradas como uno de los

principales factores involucrados en la integridad de las proteínas (Privalov, 1992). Los residuos hidrofóbicos usualmente se encuentran en el interior de las proteínas para inducir un fuerte empaquetamiento, mientras que en proteínas multiméricas, o en aquellas que se encuentran asociadas a otros componentes, usualmente se encuentran zonas hidrofóbicas en la superficie que forma la interfase entre ambos componentes, induciendo acoplamientos puntuales.

Diferentes áreas de investigación se han enfocado a la modificación del balance de estas interacciones con el objeto de obtener enzimas más estables. Estas áreas involucran técnicas de evolución dirigida, mutagénesis sitio dirigida, búsqueda de enzimas termoestables a partir de microorganismos termófilos e hipertermófilos y la modificación química de proteínas.

2.3. Modificación química de proteínas

El uso potencial de las enzimas como catalizadores industriales está bien establecido y han encontrado amplia aplicación en productos comerciales tales como detergentes, cosméticos, textiles y alimentos. El incremento en el número de aplicaciones potenciales de los biocatalizadores ha abierto una importante área de estudio dirigida a la búsqueda y desarrollo de métodos para mejorar sus características de actividad, especificidad y estabilidad. Entre los métodos existentes para alterar las propiedades catalíticas, la modificación covalente de proteínas se ha distinguido como una de las herramientas más poderosas, complementando, además, a la mutagénesis sitio dirigida y a la evolución dirigida en la construcción de nuevos y mejores biocatalizadores (DeSantis and Jones, 1999).

2.3.1. Inmovilización de enzimas

El uso de enzimas inmovilizadas en procesos industriales, así como en dispositivos analíticos (p. ej. biosensores), ha presentado un incremento notable en los últimos años. El

término *enzimas inmovilizadas* se ha utilizado para designar a proteínas que se encuentran confinadas o localizadas en una región definida del espacio con retención de su actividad catalítica y que puede ser usadas repetidamente y de manera continua (Katchalski-Katzir, 1993). Existen diferentes tipos de inmovilización de enzimas a un soporte, los cuales resultan en a) enzimas entrecruzadas, enzimas modificadas covalentemente en donde la matriz de proteína funciona al mismo tiempo como catalizador y soporte, b) conjugados de enzima-soporte, en los cuales la enzima está adsorbida o unida covalentemente al soporte, c) preparaciones donde la enzima está atrapada en geles, fibras o microcápsulas y d) sistemas en los cuales la enzima se encuentra en solución pero permanece en un espacio delimitado por membranas de ultrafiltración o un dispositivo de fibras huecas (Katchalski-Katzir, 1993). La inmovilización por adsorción es, quizá, el método más simple y menos drástico para la obtención de conjugados de proteína-soporte.

La inmovilización de enzimas presenta ventajas como la estabilización de la proteína, reutilización del biocatalizador, formación controlada del producto, facilidad de separación del producto y biocatalizador y, finalmente, la posibilidad de operación en modos continuo o en lote. Pieters *et al.* han inmovilizado con éxito la glucosa oxidasa y la glucoamilasa en soportes magnéticos (Pieters and Bardeletti, 1992). Estas enzimas fueron coinmovilizadas a través de sus moléculas de carbohidratos en magnetita entrecruzada con glutaraldehído. La inmovilización a través de las moléculas de carbohidrato evitó la unión a través del sitio activo, permitiendo una alta actividad residual después de la inmovilización. La coinmovilización de las dos enzimas aumentó los valores de K_M y V_{max} y el biocatalizador pudo ser fácilmente separado del medio de reacción altamente viscoso mediante la aplicación de un campo magnético (Pieters and Bardeletti, 1992). La α -amilasa ha sido inmovilizada covalentemente en microesferas poliméricas de metacrilato activadas con carbodiimida o cloruro de tionilo (Aksoy *et al.*, 1998). La temperatura óptima de la enzima inmovilizada por ambos métodos se vio desplazada a temperaturas mayores y la inmovilización resultó en un incremento en la

estabilidad de la enzima durante el almacenamiento, mientras que la enzima libre fue completamente inactivada bajo las mismas condiciones. No se observaron cambios significativos en la V_{max} , sin embargo, la K_M se vió aumentada 12 veces después de la inmovilización. El aumento en la K_M se debió posiblemente a limitaciones difusionales del sustrato o a una interacción entre el sustrato y el soporte (Aksoy *et al.*, 1998). Se ha hipotetizado que la estabilización de enzimas inmovilizadas es mayor si la inmovilización ocurre en zonas específicas de la proteína que se han identificado como zonas de inicio del desplegamiento; por el contrario, la estabilización será mínima si la inmovilización de la proteína se da a través de sitios que están lejos de esta zona (Mansfeld *et al.*, 1999). Para probar esta hipótesis se introdujeron dos cisteínas en una proteasa de *B. stearothermophilus* cuya zona iniciadora del desplegamiento se había identificado previamente. Las proteínas mutantes fueron inmovilizadas de manera específica a través de las cisteínas en sefarosa activada, dando como resultado incrementos de 9 y 12 veces en la vida media a 75°C en comparación a las enzimas mutantes en solución, mientras que la estabilización fue más grande (33 veces) para la doble mutante inmovilizada. Por el contrario, las mutantes donde se introdujeron cisteínas en diferentes zonas de esta proteasa sólo mostraron incrementos de 2.5 veces en su vida media. La estabilización obtenida demostró ser fuertemente dependiente de la posición donde ocurre la inmovilización (Mansfeld *et al.*, 1999).

2.3.2. Entrecruzamiento

La modificación química de proteínas por medio del entrecruzamiento ha resultado un método efectivo para incrementar la estabilidad térmica de las enzimas (Kazan *et al.*, 1997). Se ha encontrado que el entrecruzamiento inter- e intra-molecular con agentes mono- y bifuncionales puede reforzar la estructura terciaria de la proteína, reduciendo de esta manera su velocidad de inactivación. El entrecruzamiento químico de proteínas y enzimas se realiza a

través del acoplamiento de reactivos bifuncionales a aminoácidos cuyas cadenas laterales son nucleofílicas, (Wong and Wong, 1992). Los agentes entrecruzantes de longitud cero inducen el acoplamiento directo de dos grupos sin la introducción de agentes externos que funcionen como espaciadores. Estos agentes funcionan activando una de las cadenas laterales del aminoácido para dar lugar a un intermediario activo, que a su vez, reacciona con una segunda cadena lateral. Por el contrario, los agentes homobifuncionales y heterobifuncionales incorporan un espaciador, que puede contener características especiales, entre los dos grupos entrecruzados (Wong and Wong, 1992). El grado de entrecruzamiento puede ser controlado variando la concentración de proteína o agente entrecruzante, el tiempo de reacción o la velocidad de adición de reactivo. Sin embargo, el entrecruzamiento excesivo puede llevar a agregación y precipitación de la proteína, distorsión de la estructura de la proteína y, finalmente a la pérdida total de la actividad (Govardhan, 1999). El glutaraldehído es un reactivo homobifuncional que ha resultado un agente entrecruzante muy eficiente y muy utilizado (Figura 4). Su uso como entrecruzante fue inicialmente reportado por Qiocho y colaboradores (Qiocho and Richards, 1964), quienes lo utilizaron para estabilizar a la carboxipeptidasa-A con la finalidad de obtener su estructura cristalográfica por difracción de rayos X. Por otra parte, los efectos combinados de la glicosilación y el entrecruzamiento han sido aplicados a la penicilino G-acilasa. Esta enzima fue modificada con dialdehídos de dextranas y la enzima entrecruzada exhibió un incremento de nueve veces en su vida media de inactivación a 55°C sin alterar significativamente su valor de V_{max} (Kazan *et al.*, 1997). El incremento en la estabilidad de este biocatalizador fue atribuido al reforzamiento de las interacciones no covalentes y al incremento en el número de interacciones favorables entre los grupos -OH de la dextrana y las moléculas hidrofílicas de la enzima (Kazan *et al.*, 1997). El entrecruzamiento de la tripsina bovina con glutaraldehído y aldehídos de sacarosa resultó en un incremento de 31°C en su temperatura óptima y de 22°C en su temperatura media de desnaturalización, con lo cual fue convertida de una enzima mesofílica a una enzima termofílica (Venkatesh and Sundaram, 1998). El

incremento en la estabilidad fue atribuido al efecto sinérgico de la modificación en diferentes puntos de la molécula, ocasionados por el entrecruzamiento y por la introducción de varios puentes de hidrógeno formados entre los hidroxilos de la sacarosa y de la proteína (Venkatesh and Sundaram, 1998).

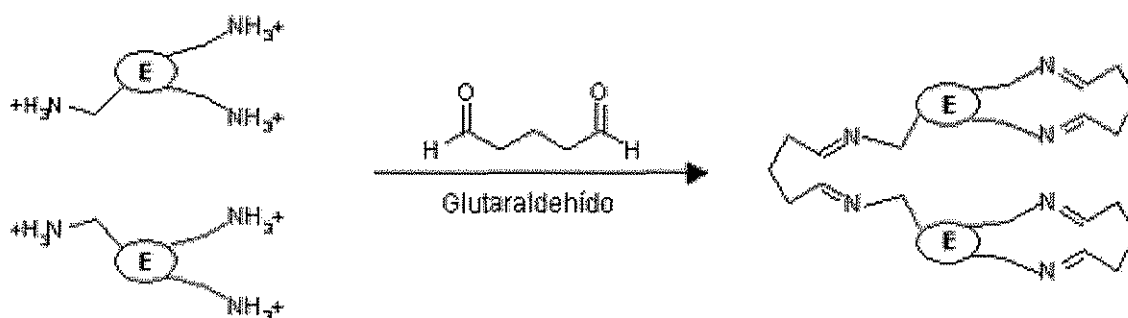


Figura 4. Entrecruzamiento inter e intra-molecular de proteínas con glutaraldehído.
Fuente: DeSantis and Jones (1999).

2.3.3. Cristales catalíticos de enzima entrecruzados (CLEC's)

La observación de la alta estabilidad y actividad de las enzimas entrecruzadas condujo al desarrollo de cristales de enzima entrecruzados (CLEC's). El proceso de producción de CLEC's consiste de dos pasos fundamentales; primero, se requiere la cristalización de la enzima y, segundo, se lleva a cabo el entrecruzamiento de los cristales, cuidando que se conserven una alta actividad y la red cristalina de la proteína. Los CLEC's obtenidos por este procedimiento son catalizadores muy activos y altamente porosos, característica que permite el transporte de sustratos y productos hacia dentro y fuera del cristal (Govardhan, 1999). Diversos trabajos se han enfocado a la obtención de cristales de enzima entrecruzados. La generación de CLEC's insolubles de termolisina produjo un biocatalizador más estable y con altos niveles de actividad enzimática (St. Clair and Navia, 1992), mientras que los CLEC's de la subtilisina resultaron en biocatalizadores con alta estabilidad en solventes orgánicos y en solución acuosa (Wang *et al.*, 1997a). Los cristales de enzima entrecruzados de penicilino acilasa son capaces de hidrolizar la

cefalosporina G con una alta productividad. La concentración de CLEC's utilizada en las reacciones pudo ser reducida a 1-2% (w/v) y se reutilizaron durante 100 ciclos reteniendo 70% de su actividad inicial. La facilidad de reciclamiento de estos cristales resultó en una reducción del costo del biocatalizador durante la síntesis del ácido 7-aminodesacetoxicefalosporánico (7-ADCA) (Baust-Timpson and Seuffer-Wasserthal, 1998). Sin embargo, el uso de los CLEC's se encuentra limitado por la dificultad de obtención de los cristales de algunas proteínas a gran escala y por la pérdida de actividad enzimática después del entrecruzamiento, principalmente debido a las restricciones de movilidad que impone la red cristalina (Govardhan, 1999).

2.3.4. Plásticos biocatalíticos

Una nueva estrategia para producir biocatalizadores activos y estables en solventes orgánicos es la incorporación de enzimas durante la polimerización de plásticos. En las aplicaciones de este tipo, las características del soporte son críticas para proporcionar integridad mecánica, resistencia térmica y química, así como un determinado balance de hidrofiliidad/hidrofobicidad. Muchas de las características del soporte pueden ser aprovechadas mediante la incorporación de las enzimas durante la polimerización. Sin embargo, muchos de los plásticos utilizados como soportes no son solubles en agua, hecho que minimiza la interacción entre la proteína y el polímero en formación. Existen dos estrategias generales para solventar este problema; por un lado, la enzima puede ser modificada con polímeros como el polietilén glicol. Esta enzima modificada puede ser solubilizada en una gran variedad de solventes orgánicos anhidros, conduciendo a una mayor interacción con el plástico en formación. Por otro lado, una estrategia común consiste en la variación de las proporciones de los solventes inmiscibles utilizados en la mezcla de reacción; aquí, la capacidad de la enzima para particionarse entre las dos fases posibilita la obtención de diferentes tipos de plásticos biocatalíticos. La primera estrategia fue exitosamente utilizada en la copolimerización

de subtilisina-PEG (PM 8000 Da) en polimetil metacrilato. Este biocatalizador pudo ser empleado en un reactor bajo régimen continuo por 35 horas, indicando con esto que la copolimerización produjo un biocatalizador activo y estable (Yang and Russell, 1995). La segunda estrategia ha sido empleada en la copolimerización de α -quimotripsina y subtilisina Carlsberg en plásticos como polimetil metacrilato, estireno, acetato de vinilo y éter etil vinílico (Wang *et al.*, 1997b). Estos plásticos biocatalíticos resultaron en cargas enzimáticas cercanas al 50% en peso. Las actividades relativas de los biocatalizadores resultaron ser altamente dependientes del tipo de reacción catalizada y del solvente empleado en el medio de reacción. La actividad catalítica en sistemas acuosos de la quimotripsina copolimerizada en polimetil metacrilato resultó ser 10 veces menor que la actividad presentada por la enzima soluble, mientras que la actividad en hexano resultó similar a la de la enzima solubilizada. La reducción en la actividad en medio acuoso se debió principalmente a factores difusionales, mientras que en solventes orgánicos estas limitaciones no fueron tan severas. Una ventaja adicional de la copolimerización fue la alta estabilidad obtenida en solventes orgánicos tales como hexano y tetrahidrofurano (Wang *et al.*, 1997b). Las limitaciones difusionales inherentes a la presencia del plástico pueden ser solventadas utilizando materiales y condiciones de síntesis que permitan la formación de copolímeros con diferentes pesos moleculares y altas porosidades.

2.3.5. Modificación con polímeros

Muchas de las propiedades de las enzimas como su actividad catalítica, afinidad y estabilidad pueden ser alteradas modificando específicamente el microambiente de la proteína. Esto se puede realizar mediante la adición de algunos compuestos específicos al medio de reacción, por inmovilización o bien, por la modificación química de la proteína (García *et al.*, 1998). La modificación química con agentes monofuncionales permite la introducción de grupos poliméricos como carbohidratos y polietilén glicol que alteran las propiedades catalíticas de

algunas enzimas. La presencia de cadenas de carbohidratos en las glicoproteínas ha sido asociada al incremento en la estabilidad hacia la temperatura y proteólisis, así como una mayor solubilidad en sistemas acuosos en comparación a las enzimas desglicosiladas. Esta observación llevó al desarrollo de conjugados de proteína con carbohidratos de alto peso molecular con el objeto de obtener biocatalizadores con propiedades mejoradas. La amilasa de *Bacillus sp.* fue modificada covalentemente con polisacáridos solubles derivados de la dextrana (Srivastava, 1991). La glicosilación incrementó notablemente la estabilidad a la temperatura, a la proteólisis y a la presencia de urea. La enzima nativa fue completamente inactivada durante la exposición por 10 minutos a 100°C, mientras que la enzima glicosilada retuvo el 50% de su actividad inicial después de 20 minutos de incubación en ausencia de Ca^{2+} y de sustrato. Los autores sugirieron que la presencia del polisacárido favoreció la interacción de los grupos -OH del carbohidrato con regiones hidrofílicas de la superficie de la proteína, llevando a la formación de una red de puentes de hidrógeno que la estabilizaron (Srivastava, 1991).

Por otra parte, la modificación covalente con polietilén glicol (PEG) ha sido empleada principalmente para la solubilización de proteínas en solventes orgánicos. La modificación covalente de la peroxidasa de rábano blanco con PEG activado con *p*-nitrofenil clorofornato produjo un biocatalizador resistente a la desnaturalización térmica y al pH extremo. Aparentemente, esta protección se debió a la reducción en la repulsión electrostática entre grupos cargados en la superficie de la proteína (García *et al.*, 1998). Otra alternativa de modificación es el uso del surfactante anfipático no iónico Polioxietilén lauril éter (Brij35), el cual ha sido utilizado en la modificación química de la catalasa. El conjugado catalasa-Brij35 mostró una alta solubilidad en tolueno anhidro y en 1,1,1-tricloroetano. La actividad del conjugado resultó ser 200 veces mayor en 1,1,1-tricloroetano y de 15 a 20 veces mayor que la enzima no modificada en solución acuosa (Jene *et al.*, 1997).

2.4. Polietilén glicol

El polietilén glicol (PEG) es un poliéter neutral cuya estructura es relativamente sencilla. Esta molécula puede ser lineal o ramificada y se puede encontrar bajo una gran variedad de pesos moleculares. El PEG puede ser comúnmente utilizado como monometoxi-polietilén glicol (mPEG), en el cual uno de los extremos terminales de la molécula está sustituido por un grupo metoxilo relativamente inerte, mientras que el otro extremo es un grupo hidroxilo que es susceptible de modificarse químicamente (Figura 5). Los PEGs ramificados pueden ser preparados por la adición de óxido de etileno (la unidad monomérica del PEG) a varios polioles, incluyendo glicerol, pentaeritriol, sorbitol, etc.

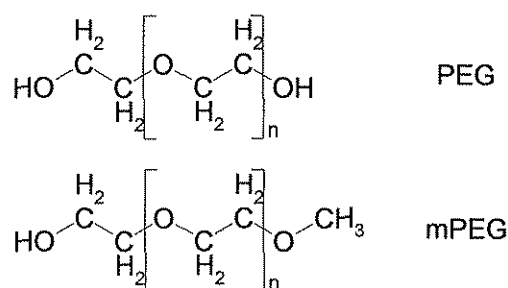


Figura 5. Estructura general del polietilén glicol.

Independientemente de su relativa simplicidad, el PEG ha encontrado una creciente aplicación a escala industrial debido a su bajo costo y facilidad de producción, así como a algunas otras propiedades útiles como su solubilidad en solventes acuosos y orgánicos, capacidad para acomplejar metales, compatibilidad biológica y a la facilidad de modificarse químicamente. Las diversas aplicaciones biotecnológicas del PEG se fundamentan en las siguientes observaciones (Harris, 1992a): a) el PEG puede ser empleado para extraer proteínas y ácidos nucleicos a partir de una solución y para promover el crecimiento de cristales de proteína; b) la mezcla de PEG y dextrana en presencia de amortiguadores produce sistemas de dos fases que pueden ser empleados para la purificación de materiales biológicos debido a su

alta biocompatibilidad; c) El PEG puede interactuar con membranas produciendo fusiones celulares; d) el acoplamiento covalente del PEG a proteínas produce conjugados activos no inmunogénicos y con una vida media prolongada bajo condiciones celulares y e) la unión covalente del PEG a algunas superficies retarda grandemente la velocidad de absorción de las proteínas hacia estas superficies.

2.4.1. Propiedades y aplicaciones

Los PEGs poseen una gran variedad de propiedades que les proporcionan utilidad e importancia en las áreas biotecnológicas y biomédicas. Los polímeros de bajo peso molecular (<1000 Da) son viscosos e incoloros, mientras que los polímeros de mayor peso molecular suelen ser sólidos blancos y cerosos. El punto de fusión de los polímeros sólidos es proporcional a su peso molecular, alcanzando un valor constante a alrededor de los 67°C. La distribución de pesos moleculares en muestras del polímero suele ser estrecha. El PEG puede formar complejos con cationes metálicos, dando lugar a aplicaciones en donde funcionan como "agentes de transferencia de fase" (Bailey Jr. and Koleske, 1976). En esta aplicación, el polímero transfiere una sal desde una fase sólida o acuosa a una fase orgánica a través del acomplejamiento o coordinación con el catión metálico, facilitando su partición a la fase orgánica. El anión correspondiente se auto transfiere para mantener el balance de cargas y durante el proceso de transferencia el anión se vuelve extremadamente reactivo debido a su pobre solvatación. Este proceso también es conocido como "catálisis en transferencia de fase", y un ejemplo característico lo constituye la transferencia de KMnO_4 desde una fase sólida hacia el benceno, en presencia de un PEG alquilado. Por otra parte, el polietilén glicol exhibe un interesante patrón de solubilidad, siendo soluble en agua y en solventes orgánicos tales como tolueno, diclorometano, etanol y acetona entre otros; de aquí que se considere como un polímero anfifílico (Bailey Jr. and Koleske, 1976). Otros polímeros relacionados como el

polimetilén óxido y el polipropilén óxido no son solubles en agua. El PEG es insoluble en hexano y en hidrocarburos alifáticos, así como en éter etílico y etilén glicol, moléculas estrechamente relacionadas estructuralmente. Este raro patrón de solubilidad es de gran utilidad en la síntesis de derivados del PEG, debido a que las reacciones de derivatización pueden realizarse en un solvente orgánico como tolueno y el producto puede ser recuperado mediante la adición de un precipitante como hexano o éter etílico (Harris, 1992b). Las soluciones acuosas de PEG tienen la propiedad de tener relativamente bajas temperaturas críticas ($\sim 100^{\circ}\text{C}$), esta propiedad resulta importante ya que elevando ligeramente la temperatura de la solución por arriba de su punto crítico se pueden formar sistemas de dos fases. La temperatura crítica de la solución varía en función del peso molecular del PEG, de la concentración y del pH. En soluciones acuosas, el polietilén glicol actúa como una molécula relativamente móvil, con un gran volumen de exclusión. De hecho, se ha demostrado a través de cromatografía de filtración en gel, que el PEG representa masas y volúmenes moleculares más grandes que otros polímeros con el mismo peso molecular, incluyendo algunas proteínas (Harris, 1992b). Como resultado de esta propiedad, el PEG excluye a otros polímeros, y puede llegar a formar sistemas de dos fases si la concentración es suficientemente elevada. Esta característica resulta en aplicaciones en la precipitación de proteínas y ácidos nucleicos, y si el PEG se encuentra unido covalentemente a una superficie, puede evitar la unión de proteínas y otros polímeros.

La unión covalente del PEG a otras moléculas ha desarrollado un creciente interés para aplicaciones biomédicas y biotecnológicas. Los grupos hidroxilo terminales de la molécula de PEG funcionan como ligandos para su unión covalente a otras moléculas y superficies. Se ha encontrado que las proteínas que han sido modificadas con PEG permanecen activas, demostrando que la unión covalente del polímero no desnaturaliza a las proteínas (Harris, 1992b). Las moléculas a las que se ha unido el PEG covalentemente presentan patrones de solubilidad alterados, esto se debe a que la presencia del polímero puede promover la

solubilidad y actividad de las enzimas modificadas en solventes orgánicos (Inada.Y. *et al.*, 1986). La unión covalente del PEG también incrementa grandemente el tamaño de la molécula modificada. La naturaleza eléctrica de la superficie o molécula modificada también se ve alterada debido a que las cargas se encuentran sumergidas en una capa neutra de polímero. Abuchowski y colaboradores demostraron que la unión covalente de PEG a una proteína produce poca pérdida de actividad haciéndola menos inmunogénica y antigénica, lo cual le imparte una elevada vida media bajo condiciones fisiológicas (Abuchowski *et al.*, 1977a, 1977b). Adicionalmente, existe un creciente interés en el desarrollo de fármacos modificados covalentemente con PEG (antibióticos, procaína, aspirina, interferón, etc) debido al incremento de la solubilidad y en tamaño, así como a las propiedades farmacocinéticas alteradas después de la modificación con PEG (Harris, 1992a). Además, el PEG puede ser utilizado en la síntesis de enzimas artificiales en donde funciona como espaciador entre el sitio catalítico y los sitios de reconocimiento y unión. Las características de longitud, flexibilidad y anfifilicidad del polímero son aspectos clave en el diseño de estos catalizadores. Yomo *et al.* (1992) han aplicado estas características en la obtención de una oxidasa semisintética mientras que Yoshinaga *et al.* (1992) han acoplado complejos catalíticamente activos de porfirinas con centros metálicos a moléculas de albúmina unidas covalentemente a PEG, la cual actúa como sitio de unión. Estos complejos demostraron ser catalíticamente activos en medio orgánico.

2.5. El citocromo c como biocatalizador

El citocromo c es una proteína ampliamente distribuída en los organismos vivos, se encuentra como un componente de la cadena mitocondrial de transporte de electrones, en donde su papel principal consiste en el transporte de electrones entre los complejos membranales citocromo c reductasa y citocromo c oxidasa. El citocromo c es una proteína relativamente estable, que presenta peso molecular alrededor de los 12,000 Da dependiendo

de la fuente de obtención y un punto isoelectrico bastante básico ($pI=10.65$) (Margoliash and Schejter, 1966). La familia de los citocromos *c* presenta una alta conservación al nivel de secuencia de amino ácidos y de estructura terciaria. De hecho, diferentes estudios han demostrado la conservación de 21 de los 103 a 112 amino ácidos totales en 91 secuencias eucarióticas (Louie and Brayer, 1990). La estructura tridimensional del citocromo *c* de levadura ha sido determinada a 1.23 Å de resolución (Louie and Brayer, 1990) y estudios adicionales han demostrado un contenido de α -hélices superior al 30% (Ahmad *et al.*, 2000) (Figura 6). Una característica esencial de esta familia de proteínas es la presencia de un grupo prostético Protoporfirina IX (hemo) que se encuentra unido covalentemente a la apoproteína por medio de dos enlaces tioéter. Adicionalmente, el átomo de hierro del grupo hemo se encuentra coordinado axialmente por dos ligandos, la His18 y la Met80.

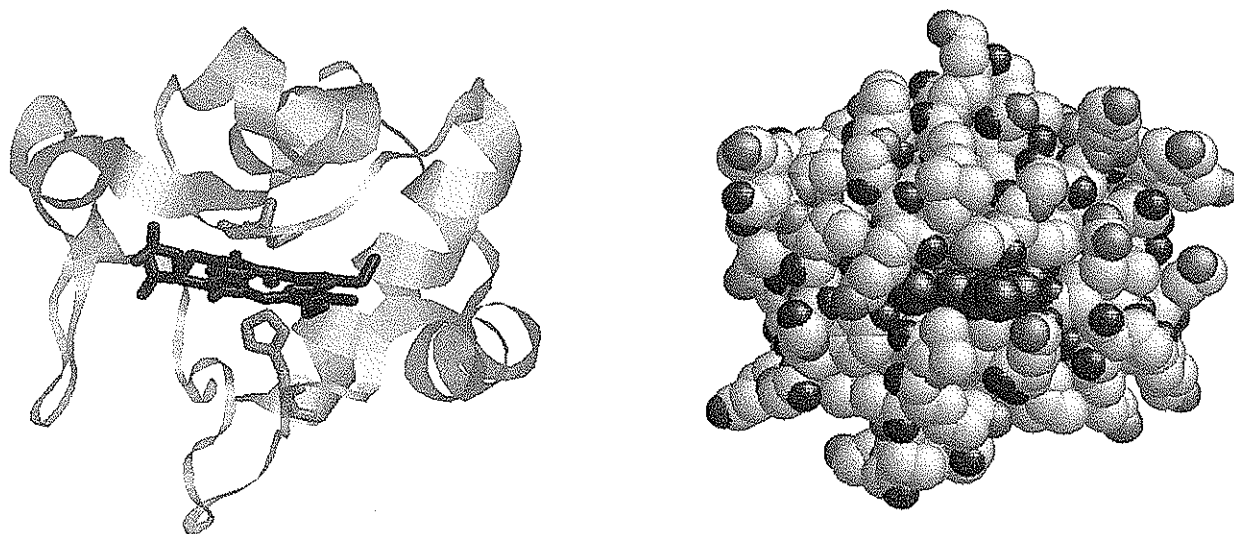


Figura 6. Estructura cristalográfica del citocromo *c* de corazón de caballo. Izquierda: Modelo de listones; se muestran el grupo hemo y sus ligandos axiales, His18 y Met80. Derecha: Modelo espacial.

El citocromo *c* posee características espectroscópicas especiales, reflejadas en la presencia de diferentes bandas de absorción (Figura 7). La presencia de tirosinas distribuidas a través de la estructura proporciona absorbancia en el UV (280 nm), que puede utilizarse como prueba de

la formación de la cavidad hidrofóbica durante el plegamiento (Nall, 1996). Por otra parte, la presencia del grupo hemo provoca la presencia de la banda de absorción del Soret (410 nm) y las bandas α y β (520 y 550 nm respectivamente). Estas bandas de absorción reflejan el estado de *spin* del átomo de hierro de la porfirina y pueden ser utilizadas para estimar su estado de coordinación, obteniendo información sobre la estructura terciaria de la cavidad del hemo (Ahmad *et al.*, 2000). En general, la absorbancia del hemo en la región visible proporciona información acerca del plegamiento correcto de la proteína y sobre la formación del sitio activo, así como una medida del estado de oxido-reducción del hemo (Nall, 1996). Por otro lado, la banda de absorción a 695 nm monitorea la coordinación de la Met80 al átomo de hierro del hemo y los cambios de absorción a esta longitud de onda proporcionan información acerca de eventos moleculares fuertemente acoplados que incluyen ligación de la Met80, apertura de la cavidad del hemo y desplegamiento global de la proteína (Nall, 1996).

Radi *et al.* reportaron por primera vez la peroxidación de lípidos catalizada por citocromo *c* en sistemas *in vivo* (Radi *et al.*, 1993). Este resultado sugirió la participación del citocromo en procesos celulares involucrados en el estrés oxidativo y en los cuales podría promover la oxidación de algunas biomoléculas en presencia de peróxido de hidrógeno mediante un mecanismo de radicales libres (Deterding *et al.*, 1998).

Por otro lado, trabajos previos han reconocido desde hace más de cuarenta años, la capacidad del citocromo *c* para promover la peroxidación de lípidos y el rompimiento de hidroperóxidos *in vitro* (Vazquez-Duhalt, 1999). Adicionalmente, se ha demostrado que el citocromo *c* puede participar en la hidroxilación de *p*-nitrofenol y en la oxidación de diferentes compuestos como el ácido 2-ceto-4-tiometil butírico, la 4-amino antipirina y luminol (Zhu *et al.*, 1998), así como en la oxidación de compuestos donadores de electrones como el ABTS (2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenztiazolina-6-sulfónico)) (Vazquez-Duhalt, 1999). La Tabla 2 resume algunas de las biotransformaciones realizadas por el citocromo *c*.

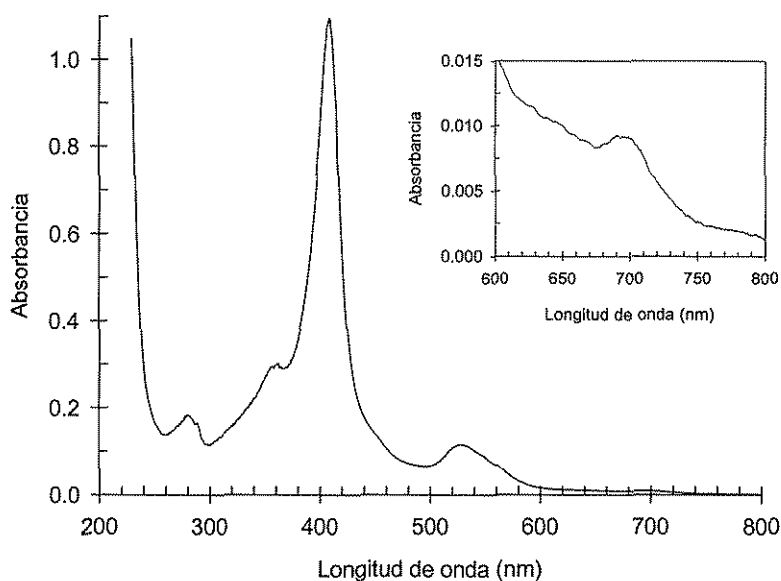


Figura 7. Espectro UV-Vis del citocromo c de corazón de caballo oxidado.

Tabla 2. Reacciones biocatalíticas catalizadas por el citocromo c (Vazquez-Duhalt, 1999).

Sustratos	Productos
Hidrocarburos polinucleoaromáticos	
Antraceno	9,10-Antraquinona
Benceno	Fenol
Benzo(a)pireno	1,6-Benzo(a)pirenodiona
Pireno	1,8-Pirenodiona
Compuestos organoazufrados y heterocíclicos	
Benzotiofeno	Sulfóxido de benzotiofeno
Carbazol	Desconocido
Dibenzotiofeno	Sulfóxido de dibenzotiofeno
Sulfuro de dibencilo	Sulfóxido de dibencilo
Sulfuro de difenilo	Sulfóxido de difenilo
N-methyl carbazol	N-Hidroximetil carbazol
Tiantreno	Disulfóxido de tiantreno
Tioanisol	Metilfenil-sulfóxido
Otros sustratos	
ABTS	ABTS (radical catiónico)
Guayacol	Tetraguayacol
Ácido linolénico	Peróxido de linoleato
Luminol	Quimioluminiscencia
Metionina	Etileno
Estilbeno	Epóxido de estilbeno

El citocromo *c* también ha sido utilizado en la oxidación de tiofenos y compuestos organoazufrados en presencia de peróxido de hidrógeno en medios que contuvieron solventes orgánicos miscibles en agua (Vazquez-Duhalt *et al.*, 1993). El análisis de los productos por GC-MS después de la reacción demostró, en todos los casos, la formación del sulfóxido correspondiente (Tabla 2). Por otra parte, no se detectó la presencia de sulfonas como productos, indicando con esto que la reacción involucra solamente la adición de un átomo de oxígeno al átomo de azufre de la molécula (Vazquez-Duhalt *et al.*, 1993). Torres *et al.* han reportado la oxidación biocatalítica de hidrocarburos polinucleoaromáticos con citocromo *c*, lignino peroxidasa y hemoglobina en medios conteniendo solventes orgánicos. (Torres *et al.*, 1997). Los productos de la reacción biocatalítica fueron identificados como las quinonas correspondientes. El hecho de que las tres hemoproteínas produzcan los mismos productos sugiere que el mecanismo de reacción es similar para los tres biocatalizadores (Torres *et al.*, 1997).

Diversos estudios se han enfocado al mejoramiento de las propiedades catalíticas del citocromo *c* utilizando como herramientas la mutagénesis sitio dirigida (Torres *et al.*, 1995) y la modificación química (Tinoco and Vazquez-Duhalt, 1998). El citocromo *c* de *Saccharomyces cerevisiae* ha sido exitosamente expresado en *E. coli* y estudios previos han demostrado que la sustitución del residuo Phe82 altera significativamente el comportamiento cinético de la proteína, mientras que la doble mutante Gly82:Thr102 demostró ser 10 veces más activa que la proteína parental contra diversos sustratos aromáticos. Adicionalmente, la sustitución de la Lys79, residuo localizado a la entrada de la cavidad del hemo, por Ala produjo una proteína con una k_{cat} y K_M elevadas, resultando en un biocatalizador con una eficiencia catalítica comparable a la parental (Torres *et al.*, 1995). Por otra parte, el citocromo *c* ha sido modificado químicamente en sus grupos amino superficiales libres con moléculas de polietilén glicol y en sus grupos carboxilo con grupos metilo y tri-metil-silil (TMS) (Tinoco and Vazquez-Duhalt, 1998). Como resultado de esta doble modificación el microambiente del grupo hemo se vio

alterado. El citocromo doblemente modificado fue capaz de oxidar 17 de 20 PAHs probados, mientras que el citocromo no modificado sólo fue capaz de oxidar 8 compuestos (Tabla 3), demostrando que la modificación química de proteínas puede ser una herramienta interesante en el diseño de nuevos biocatalizadores.

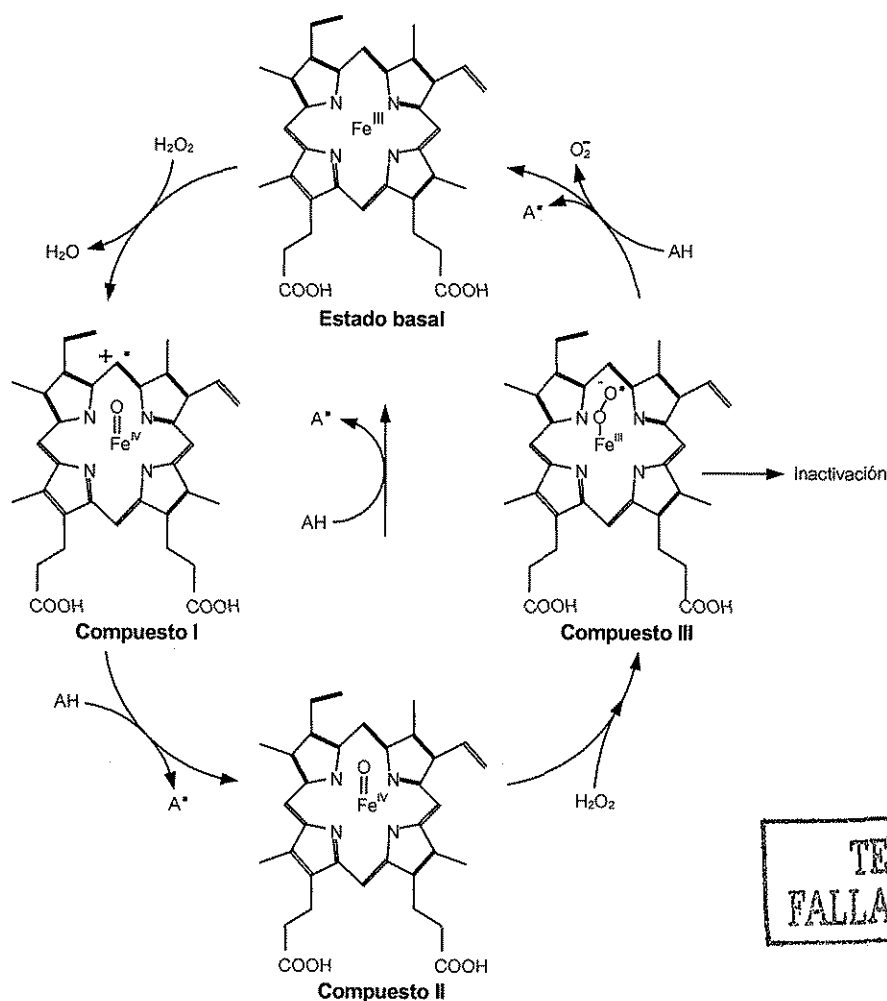
Tabla 3. Oxidación de hidrocarburos polinucleoaromáticos con citocromo *c* no modificado y con citocromo doblemente modificado con polietilén glicol y grupos metilo (Tinoco and Vazquez-Duhalt, 1998).

Compuesto aromático	Actividad específica (min^{-1})	
	No modificado	PEG-Cyt-Met
7,12-Dimetilbenzantraceno	24.59 (\pm 1.52)	80.33 (\pm 3.83)
1,2:3,4-Dibenzantraceno	NR	16.60 (\pm 2.24)
Azuleno	2.26 (\pm 0.29)	14.32 (\pm 0.57)
3-Metilcolantreno	1.88 (\pm 0.07)	10.96 (\pm 0.54)
7-Metilbenzo(a)pireno	NR	7.56 (\pm 0.42)
1,2:5,6-Dibenzantraceno	NR	5.70 (\pm 0.31)
Trifenileno	NR	5.27 (\pm 1.05)
Dibenzotiofeno	0.67 (\pm 0.06)	4.73 (\pm 0.05)
Antraceno	0.33 (\pm 0.06)	3.09 (\pm 0.32)
Tiantreno	0.49 (\pm 0.06)	1.41 (\pm 0.08)
Pireno	0.51 (\pm 0.05)	0.97 (\pm 0.03)
Fluoroantreno	NR	0.65 (\pm 0.09)
Acenafteno	NR	0.40 (\pm 0.01)
Benzo(a)pireno	0.22 (\pm 0.02)	0.39 (\pm 0.06)
Fluoreno	NR	0.22 (\pm 0.01)
Fenantreno	NR	0.17 (\pm 0.02)
Criseno	NR	NR
9,10-Dimetilantraceno	NR	NR
Naftaleno	NR	NR
Bifenilo	NR	NR

NR. No se detectó la reacción enzimática

El mecanismo catalítico del citocromo *c* ya ha sido descrito (Barr and Mason, 1995). Como en el caso de las peroxidasas, la forma oxidada del citocromo *c* (porfirina-fierro(III)) puede romper homolíticamente el enlace O-O del hidroperóxido, dando lugar a la formación de un radical catiónico llamado compuesto I (Figura 8). La presencia de un agente reductor, p. ej. un polinucleoaromático, genera el compuesto II, un complejo formado entre el fierro (IV) de la

porfirina y el oxígeno resultante de la escisión del hidropéroxido. Este compuesto II puede oxidar una segunda molécula de sustrato para regresar al estado basal del citocromo. Alternativamente, un exceso del hidropéroxido da lugar a la formación del compuesto III, un radical altamente reactivo localizado cerca del anillo de la porfirina y, debido a esta proximidad, cualquier transferencia de electrones desde el estado reducido del citocromo a una segunda molécula del hidropéroxido formará un radical hidroxilo. Este radical puede reaccionar con el anillo de la porfirina llevando a una inactivación irreversible de la enzima. Cabe mencionar que todas las peroxidasa son inactivadas por un exceso de hidropéroxido o en ausencia de cualquier sustrato oxidable.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 8. Posible ciclo catalítico del citocromo c en presencia de peróxido de hidrógeno y un sustrato aromático (AH). Adaptado de Vazquez-Duhalt (1998).

El citocromo *c* presenta varias ventajas que promueven su uso como biocatalizador (Vazquez-Duhalt, 1999): a) el grupo prostético hemo se encuentra unido covalentemente a la proteína. Esta propiedad resulta útil en la catálisis en solventes orgánicos ya que, contrario a otras peroxidases, el citocromo no pierde su grupo catalítico en estos sistemas; b) el citocromo es activo en intervalos de pH de 2 a 11; c) el citocromo *c* presenta actividad catalítica en medios con altas concentraciones de solvente orgánico. En medios con 90% de tetrahidrofurano el citocromo conserva 18% de su actividad máxima y d) la producción industrial del citocromo es relativamente barata, con la consideración adicional de la facilidad para clonar y expresar esta proteína, permitiendo la producción por métodos fermentativos.

3. HIPÓTESIS

La implementación de enzimas en la industria petrolera para la oxidación de compuestos azufrados requiere de catalizadores activos en medio orgánico y estables a 80°C. Debido a esto y con base en los antecedentes previos, proponemos que la modificación química del citocromo c con polímeros de alto peso molecular incrementará su estabilidad térmica, y modificará su hidrofobicidad, facilitando la catálisis de compuestos hidrofóbicos a altas temperaturas.

4. OBJETIVOS

Generales

1. Obtener por medio de modificaciones químicas un biocatalizador termoestable, con un sitio activo hidrofóbico y con diferentes propiedades catalíticas en medios con bajo contenido de agua.
2. Explicar los mecanismos químicos y/o termodinámicos que dan origen a la termoestabilización de las proteínas modificadas químicamente.

Específicos

1. Modificar la superficie de hemoproteínas por medio de acoplamiento covalente con polímeros anfifílicos.
2. Analizar estructuralmente a las proteínas modificadas y nativas por medio de espectrofotometría UV-visible, dicroísmo circular, fluorescencia y calorimetría.
3. Analizar termodinámicamente el proceso de termoinactivación de las proteínas modificadas y nativas.
4. Estudiar los mecanismos mediante los cuales los modificadores químicos estabilizan a las proteínas.
5. Caracterizar cinéticamente a las proteínas modificadas y no modificadas a 80°C contra diversos sustratos hidrofóbicos.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Reactivos y solventes

El citocromo *c* de corazón de caballo, el citocromo *c* de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*), así como los reactivos metoxipolietilén glicol (PM 350, 750 y 2000 Da), metoxipolietilén glicol activado con cloruro cianúrico (PM 5000 Da), peróxido de hidrógeno (solución acuosa al 30%), cloruro cianúrico (2,4,6 triclora-1,3,5-triazina), ácido trinitro bencen-sulfónico (TNBS) y cloruro de pinacianol, fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. Los compuestos polinucleoarómicos pireno, antraceno y benzo(α)pireno, así como los derivados azufrados tiantreno, dibenzotiofeno y disulfuro de fenilo, se obtuvieron de Aldrich. Los solventes orgánicos utilizados, todos grado HPLC, fueron obtenidos de Fisher Scientific. El hidrocloreuro de guanidina (GuHCl) grado ultrapuro se obtuvo de Gibco BRL. Todas las enzimas de restricción y los reactivos de modificación de ADN se obtuvieron de New England Biolabs. Todos los reactivos no mencionados fueron de la mayor pureza posible.

5.2. Mutación sitio dirigida de gene *cyc1* de *Saccharomyces cerevisiae* y sobreexpresión en *E. coli*

Todas las mutantes fueron construidas por la Dra. Brenda Valderrama utilizando el siguiente protocolo experimental. Las mutantes sencillas y dobles del gene *cyc1* se obtuvieron por extensión de megaprimers (Horton and Pease, 1991) sobre el plásmido pBTR1 (Pollock *et al.*, 1998) utilizando los siguientes primers:

- pf1** 5'-cggtagccgggatccataactaac-3',
pr4 5'-aaaaagctagcctgtttactcagtgctttttcaagaaggtaattaagtc-3',
K27A 5'-gtttggaccaaccgcatgtgggccacc-3',

K79A 5'-cccaccaaaggccatcgcggtaccaggaatat-3',

K79T 5'-cccaccaaaggccatcgtggtaccaggaatat-3',

Todas las amplificaciones fueron hechas utilizando la ADN-polimerasa de alta fidelidad. Los megaprimers se obtuvieron por la amplificación del plásmido pBTR1 con los grupos de primers pf1-K27A, K79A o K79A y fueron purificados a partir del gel. La extensión de los megaprimers fue hecha sobre el plásmido pBTR1 utilizando el primer pr4. Los productos de extensión fueron purificados a partir del gel, cortados con BamHI y NheI y ligados en pBTR1. Este plásmido también contenía el gene *cyc3* que codifica para la citocromo *c*-hemo liasa, un sitio de resistencia a ampicilina y un promotor bajo constitutivo Trc (Pollock *et al.*, 1998). La secuencia de nucleótidos de todas las clonas fue confirmada dos veces. La estrategia de mutagénesis se resume en la Figura 9.

La cepa de *E. coli* JM101 se transformó con los plásmidos obtenidos anteriormente, conservándolos en un medio rico Luria-Bertani (LB) (Ausubel *et al.*, 1999) suplementado con 100 µg/ml de ampicilina.

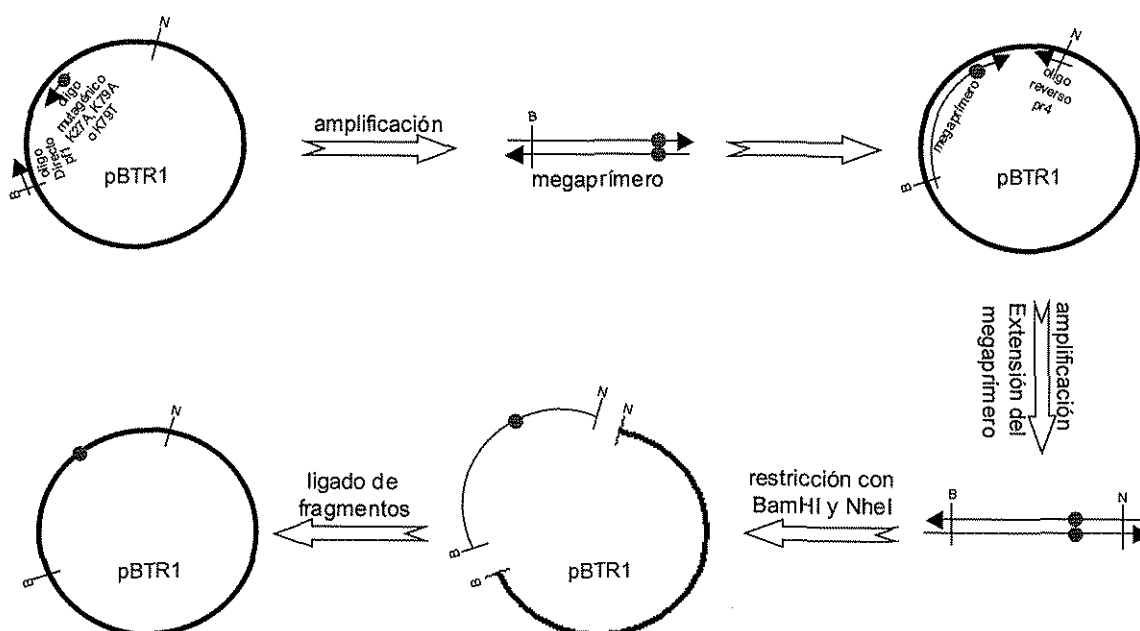


Figura 9. Estrategia de mutagénesis del citocromo *c* de *Saccharomyces cerevisiae*.

5.3. Purificación de los citocromos *c* de *Saccharomyces cerevisiae* mutantes.

En experimentos previos se determinaron las condiciones óptimas para la producción de las proteínas mutantes. En estos experimentos se manipularon independientemente la velocidad de agitación, la velocidad de aireación y la temperatura del medio de cultivo, encontrándose 300 rpm, 0.33 vvm y 37°C como parámetros óptimos.

La producción de los citocromos mutantes se llevó a cabo creciendo las cepas transformadas de *E. coli* en un fermentador con un volumen de operación de 1.5 l en medio LB suplementado con ampicilina. Las velocidades de agitación y de aireación se mantuvieron a 300 rpm y 0.33 vvm respectivamente, mientras que la temperatura se mantuvo a 37°C. La inspección visual de paquetes celulares obtenidos a intervalos regulares indicó que la acumulación de citocromo se inició una vez que el cultivo alcanzó la fase estacionaria (las células de las cepas sobreproductoras de citocromo desarrollan un color rosa tenue). Después de 30 h las células fueron cosechadas por centrifugación. El paquete celular (5 g, peso húmedo) se resuspendió en 50 ml de amortiguador de fosfato de sodio (AFS) 10 mM, pH 6.1 conteniendo 25% de sacarosa, 10 mM de EDTA, 0.2 mM de ditiotreitól y 50 µg/ml de lisozima y fue incubado por 10 min en hielo. A esta suspensión se le adicionaron 5 mg/ml del detergente Brij35, 0.01 mM de MgCl₂, 20 µg/ml de RNAsa, 100 µg/ml de DNAsa y 1 mM de PMSF (inhibidor de proteasas) y se incubó por 10 min a 37°C. Las células se rompieron por sonicación con ciclos alternados de 1 minuto. Los restos celulares fueron removidos por centrifugación (12,100 g) y el extracto celular fue precipitado con sulfato de amonio (50% saturación). El precipitado formado se separó mediante centrifugación y el sobrenadante fue dializado en frío contra 80 volúmenes de AFS (10 mM, pH 6.1). Los extractos dializados se cargaron en una columna empacada con el soporte Macro Prep High S (intercambio catiónico) y fueron eluidas mediante un gradiente lineal de 0 a 1 M de NaCl con un flujo de 1.5 ml/min. La elución de las fracciones se siguió por absorbancia a 280 nm y 410 nm. Las fracciones ricas en citocromo se

colectaron y dializaron extensivamente en frío contra AFS (10 mM, pH 6.1) y posteriormente se concentraron en un sistema de ultrafiltración equipado con una membrana de 10,000 Da de corte molecular. Todas las proteínas mutantes se purificaron a homogeneidad según se comprobó por geles de acrilamida teñidos con azul de coomasie o nitrato de plata. La relación de absorbancias a 410 nm/280 nm se conoce como el coeficiente de Reinheitszahl (R_z) y se utiliza comúnmente como un índice de la pureza de las hemoproteínas. El valor de R_z del citocromo comercial de sigma es 4.4, mientras que los valores para las proteínas mutantes obtenidas oscilaron entre 4.8 y 5.4.

5.4. Modificación química de hemoproteínas

5.4.1. Síntesis de PEG activados

La activación de los PEGs de diferente peso molecular (350, 750, o 2000 Da) se realizó de acuerdo al procedimiento reportado por Abuchowski *et al.* (1977b). Las muestras de PEG (10 mmoles) se disolvieron en 40 ml de tolueno seco conteniendo 1 g de carbonato de sodio. A esta solución se agregaron 30 mmoles de cloruro cianúrico y la mezcla se dejó reaccionar toda la noche a temperatura ambiente. La solución resultante fue filtrada y el PEG activado se recuperó por precipitación en frío con éter de petróleo (80 ml) seguido por una centrifugación a 12,100 g. El precipitado resultante fue separado y lavado con éter de petróleo frío hasta que quedó libre de cloruro cianúrico residual (determinado espectrofotométricamente). El contenido de cloro en los polímeros activados se determinó después de la hidrólisis durante 8 h de las muestras de PEGs activados en un amortiguador de carbonato de sodio (pH 10, 100 mM), seguida por una titulación con nitrato de plata 0.02 N. La reacción de activación del mPEG se muestra en la Figura 10.

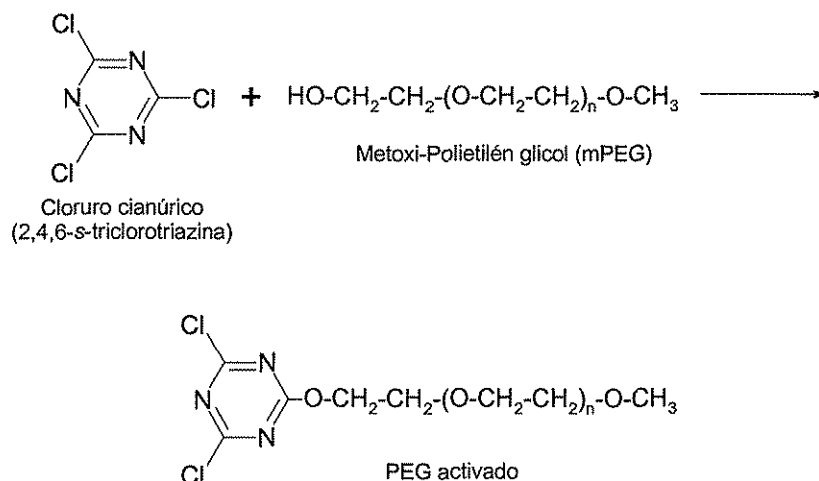


Figura 10. Síntesis de polietilén glicol activado con cloruro cianúrico.

5.4.2. Modificación con polietilén glicol (PEG)

El citocromo modificado químicamente con polietilén glicol (Cyt-PEG) se obtuvo por una modificación del método reportado anteriormente por Gaertner and Puigserver (1992). Muestras de 9 mg de citocromo *c* (de corazón de caballo) se disolvieron en 5 ml de amortiguador de boratos (40 mM, pH 10). A esta solución se le agregó PEG activado (PM 5000 Da) en un exceso de 5 veces sobre los grupos amino libres de la proteína. La mezcla resultante se mantuvo reaccionando por 5 h a temperatura ambiente bajo agitación suave. La reacción se paró mediante la adición de 100 ml de AFS (60 mM, pH 6.1) y se dializó extensivamente contra el mismo amortiguador. La solución de Cyt-PEG fue concentrada por ultrafiltración utilizando una membrana de corte molecular de 30,000 Da.

Los citocromos (de corazón de caballo) modificados con PEGs de menor peso molecular, así como los citocromos de levadura y la peroxidasa modificadas con PEG (PM 5000 Da) se obtuvieron por el mismo procedimiento.

La cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago* modificada con PEG se obtuvo por el mismo procedimiento, utilizando el mismo exceso de polímero sobre los grupos amino que en el caso del citocromo. Esta enzima es altamente sensible a pH alcalinos y debido a esto fue necesario

reducir substancialmente los tiempos de reacción durante la modificación con PEG. La mezcla de reacción se mantuvo por un periodo de 10 a 15 min a pH 10 y posteriormente se diluyó y dializó extensivamente con amortiguador de acetatos pH 5, 50 mM.

El grado de modificación de las diferentes preparaciones fue estimado por la titulación de los grupos amino libres de la proteína con ácido trinitrobencen-sulfónico (Habeeb, 1966), midiendo la absorbancia del complejo formado a 335 nm y 420 nm.

5.4.3. Copolimerización del citocromo c en Nylon

La síntesis del plástico biocatalítico citocromo-Nylon (Cyt-nyl) se realizó mediante un procedimiento desarrollado por el M.C. Raunel Tinoco (comunicación personal). El copolímero Cyt-nyl se obtuvo mediante dos reacciones secuenciales que involucran la activación del citocromo y la copolimerización de la proteína activada. Para la síntesis del copolímero se partió de las siguientes soluciones patrón. A) solución acuosa de citocromo c (10 mg/ml); B) solución acuosa de hexandiamina (0.4 g/ml) y C) solución de cloruro de adipóilo en cloroformo (50% v/v). Alícuotas de la solución A (1 mg/ml) se hicieron reaccionar bajo agitación vigorosa y en un intervalo de 1 min con alícuotas de la solución B (40 mg/ml). Esta mezcla de reacción (1 ml) fue adicionada en intervalos de 1 min a 1 ml de una solución diluida (1:10) de la solución C, la cual estaba contenida en tubos de ensayo provistos de mamparas para promover una mayor agitación durante la reacción. La mezcla resultante se mantuvo bajo agitación vigorosa durante 1 min y posteriormente fue centrifugada a 5000 g. Las fases orgánica y acuosa fueron separadas del polímero por decantación. Esta reacción fue repetida aproximadamente 60 veces y el polímero obtenido se dejó secar a temperatura ambiente. Posteriormente el polímero seco se lavó intensivamente con mezclas de etanol/agua (50% v/v) para separar el citocromo que no reaccionó. La carga de proteína en el copolímero se estimó mediante un balance de masa entre

la cantidad inicial de citocromo en las mezclas de reacción y el citocromo desprendido durante el proceso de lavado.

5.5. Determinación de la concentración de proteína

Las distintas preparaciones de citocromo se disolvieron en AFS (60 mM, pH 6.1). La concentración del citocromo no modificado fue estimada espectrofotométricamente en su estado reducido utilizando el coeficiente de extinción molar $\epsilon=29.5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 550 nm (Margoliash and Schejter, 1966).

Como resultado de la modificación química el espectro de absorción del citocromo se vio alterado, la banda típica de absorción a 550 nm se perdió, evitando con esto la estimación de la concentración en esa región del espectro. Adicionalmente, la banda Soret se encontró desplazada hacia los 402 nm. Ahmad *et al.* han reportado previamente un valor de $\epsilon=1.061 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 410 nm para el estado oxidado del citocromo *c* (Ahmad *et al.*, 2000). La estimación de la concentración de los citocromos modificados se realizó empleando el coeficiente de extinción reportado por Ahmad *et al.* utilizando el valor de la absorbancia a 402 nm. Para confirmar la concentración, muestras del citocromo modificado se digirieron con ácido perclórico y se estimó la cantidad de hierro liberado mediante absorción atómica, asumiendo que cada molécula de citocromo posee un átomo de hierro. Los valores de concentración estimados por ambos métodos mostraron una correlación de 0.992 (Figura 11).

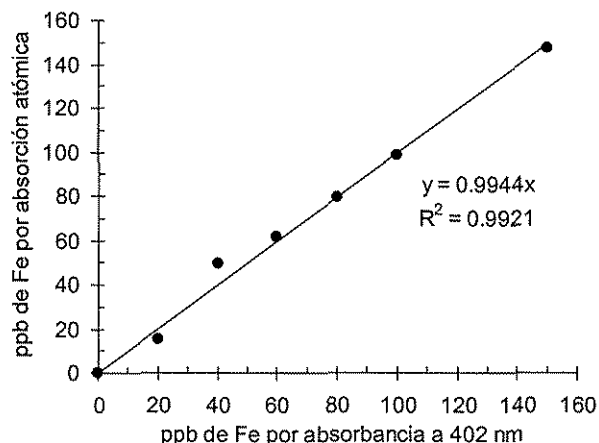


Figura 11. Curva estándar para la estimación de la concentración de Cyt-PEG.

5.6. Determinación de los perfiles de actividad en función de la temperatura

Se ensayaron series de reacciones desde 20°C hasta 120°C en viales de vidrio sellados con septos de teflón. El sistema de reacción contenía 850 μl de AFS (60 mM, pH 6.1), 150 μl de acetonitrilo, 5 $\mu\text{g/ml}$ de cloruro de pinacianol o 20 μM de pireno como substratos y 0.5-4.6 μM de la preparación de citocromo (concentraciones finales). Las mezclas completas se incubaron el tiempo necesario para alcanzar la temperatura deseada (usualmente menos de 5 min, medida con un termómetro digital en un vial independiente sujeto a las mismas condiciones), y la reacción fue iniciada por la adición de 1 μmol de H_2O_2 . La actividad catalítica se determinó siguiendo la disminución de la absorbancia a 603 nm para el cloruro de pinacianol ($\epsilon = 82.35 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) o a 335 nm para el pireno ($\epsilon = 32.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Vazquez-Duhalt *et al.*, 1994). Las actividades fueron expresadas en min^{-1} .

5.7. Ensayos de estabilidad de las hemoproteínas modificadas con PEG (PM 5000 Da)

Se evaluó la estabilidad térmica de las preparaciones de hemoproteínas modificadas con PEG y se comparó con la estabilidad de las respectivas hemoproteínas no modificadas. La

estabilidad térmica de las preparaciones de citocromo *c* de corazón de caballo se determinó estimando la actividad específica residual después de diferentes tiempos de incubación a 80°C, en ausencia o en presencia de sustrato (cloruro de pinacianol 5 µg/ml o pireno 20 µM).

Se ha reportado previamente que la estabilidad del citocromo *c* de levadura es menor a la presentada por su homólogo de corazón de caballo (Endo *et al.*, 1985). En nuestro trabajo, los ensayos previos demostraron que el citocromo *c* de levadura no presentó actividad a 80°C y debido a esto no fue posible evaluar la estabilidad a 80°C. La estabilidad térmica de las preparaciones de citocromo *c* de levadura se estimó incubando en ausencia de sustrato las diferentes preparaciones por 5 horas a 70°C. Al término de la incubación se adicionó el sustrato (pireno 20 µM) al medio de reacción y se determinó su actividad residual a 70°C.

La estabilidad térmica de la cloroperoxidasa y la peroxidasa se estimó incubando en ausencia de sustrato las diferentes preparaciones a 45°C y 70°C respectivamente. Al término de la incubación se adicionaron 5 µg/ml de cloruro de pinacianol al medio de reacción y se determinó su actividad residual a la misma temperatura de incubación. Las temperaturas se seleccionaron en base al perfil de actividades presentado por cada una de estas proteínas. En el caso de la cloroperoxidasa se seleccionó 45°C ya que temperaturas superiores resultaron en una rápida inactivación, dificultando con esto la estimación de la estabilidad de la proteína. En el caso de la peroxidasa se seleccionó 70°C debido a que es una temperatura suficientemente alta para someter a la proteína a un estrés térmico sin provocar pérdidas significativas en la actividad. El perfil de temperaturas demostró que a 70°C la peroxidasa conserva más del 80% de la actividad máxima en ambas preparaciones.

Las constantes de inactivación para cada hemoproteína se determinaron mediante el ajuste de los datos experimentales a la ecuación de primer orden ($A = A_0 e^{-kt}$).

5.8. Ensayos de actividad contra sustratos hidrofóbicos

Todas las reacciones se realizaron en viales sellados con septos de teflón para evitar evaporación del medio. Cada mezcla de reacción contenía 850 μl de AFS (60 mM, pH 6.1), 150 μl de acetonitrilo, 20 μM de HPA o derivados organoazufrados como sustrato y 0.5-3.5 μM de la preparación de citocromo (todos en concentraciones finales). Las reacciones fueron iniciadas por la adición de 5 μl de una solución 200 mM de H_2O_2 (concentración final de 1 mM) y, después de 2 min de reacción se pararon mediante la adición de 1 ml de acetonitrilo. La reacción fue monitoreada espectrofotométricamente a las longitudes de onda de máxima absorción para cada sustrato, o bien, midiendo el consumo de sustrato por HPLC utilizando una columna de fase reversa LC-18 (Supelcosil 5 μm , 150 mm x 3.9 mm). La columna fue eluída con una fase de acetonitrilo:agua (60:40).

La actividad catalítica se determinó mediante la estimación de la cantidad de sustrato transformado por mol de preparación de citocromo y se expresó en min^{-1} . Todas las reacciones se hicieron por triplicado.

El papel de la presencia del solvente en el medio de reacción ha sido revisado previamente por Torres, *et al.* (1996, 1998). La presencia de bajas concentraciones de solvente en el medio tiende a incrementar la actividad enzimática, fenómeno que se debe principalmente a una mayor solubilidad del sustrato hidrofóbico y consecuentemente a una disminución de los problemas de transferencia de masa. También se ha observado que concentraciones de solvente por arriba de un valor óptimo tienen como consecuencia una disminución de la actividad; esto se debe principalmente a que la partición del sustrato es más favorable hacia el solvente que hacia el sitio activo de la enzima. Con base en los reportes de Torres, *et al.* (1996, 1998 se estableció que las reacciones se llevaran a cabo a concentraciones de acetonitrilo entre 15% y 20% y que, transcurrido el tiempo de reacción, se pararan mediante la adición de 1 ml del mismo solvente.

5.9. Determinación de los parámetros cinéticos

Se determinaron las constantes cinéticas de los citocromos no modificado y modificado a 30°C y 80°C. Todas las reacciones se ensayaron en 1 ml de AFS (60 mM, pH 6.1) conteniendo 20% de acetonitrilo, pireno, peróxido de hidrógeno y 2.46 μM de Cyt-PEG o 5.31 μM de Cyt (concentraciones finales). Las determinaciones a 30°C se siguieron midiendo el cambio de absorbancia por minuto a 335 nm. En las determinaciones a 80°C las muestras conteniendo AFS, acetonitrilo y pireno se preincubaron hasta alcanzar la temperatura deseada (usualmente menos de 3 minutos). Cuando el sistema de reacción alcanzó los 80°C se adicionó la preparación de citocromo y el peróxido para iniciar la reacción. Después de 30 segundos se paró la reacción mediante la adición de 1 ml de acetonitrilo y se midió la absorbancia a 335 nm, comparándola con sus respectivos controles. Para cada uno de las condiciones probadas se realizaron controles en ausencia de citocromo o peróxido para descartar precipitación del sustrato u oxidación química por el peróxido.

Para cada una de las preparaciones y para cada temperatura, se inició con un barrido inicial de peróxido de hidrógeno (0.25 mM a 50 mM) manteniendo fija la concentración de pireno a 20 μM , una vez que se encontró una concentración de saturación para el H_2O_2 se siguió con un barrido de pireno (5 μM a 50 μM) manteniendo fija la concentración de peróxido a valores cercanos a los de saturación correspondientes para cada preparación. Finalmente se realizó un nuevo barrido de H_2O_2 (0.25 mM a 50 mM) a la concentración de pireno de saturación encontrada para cada preparación.

El ajuste de los datos se realizó mediante un ajuste no lineal de mínimos cuadrados utilizando el programa Sigma-Plot V.2001.

5.10. Análisis de la estructura secundaria y terciaria por dicroísmo circular y espectrometría UV-Visible

Los ensayos de dicroísmo circular (CD) se realizaron en un espectropolarímetro AVIV 62 Ds. El análisis por espectrometría UV-Visible se realizó en un espectrofotómetro Beckman 650. Todos los amortiguadores empleados fueron previamente filtrados (0.22 μm) y desgasificados. Para el análisis de CD, los citocromos no modificados y modificados (20 nmoles) se disolvieron en 1 ml de AFS (10 mM, pH 6.1). Se corrieron muestras control conteniendo 5 mM de PEG en el mismo amortiguador y su señal fue restada de la señal de las muestras. Para el análisis por CD se obtuvieron los barridos de longitud de onda desde 180 nm hasta 260 nm, y desde 350 nm a 450 nm bajo las siguientes condiciones: 1 mm de espesor de la celda, 1 nm de ancho de banda, 1 nm del paso de la longitud de onda, 1 s de tiempo de promediado. Para cada muestra se reportó el promedio de tres barridos. En el análisis por UV-Vis se obtuvieron los barridos de las muestras de proteína (10 μM) desde 200 nm hasta 800 nm. Para la obtención de los datos a 7 h y 24 h, las muestras se incubaron en un baño de agua previamente equilibrado a 80°C en viales perfectamente sellados para evitar evaporación del medio. A los tiempos especificados, las muestras se removieron del baño de agua y rápidamente se colocaron en las celdas de cuarzo. Las muestras se reequilibraron a la temperatura de incubación al menos durante 10 minutos. La temperatura en el compartimiento de la celda fue controlada por un módulo Peltier en ambos equipos. Se determinó la concentración de proteína antes y después de cada barrido.

5.11. Desnaturalización térmica de los citocromos modificados

Las proteínas se disolvieron en 1 ml de AFS (10 mM, pH 6.1) y se siguió su desnaturalización térmica por dicroísmo circular a 222 nm desde 25°C hasta 90°C bajo las siguientes condiciones: 1 mm de espesor de la celda, 1 nm de ancho de banda, 0.2°C/min de velocidad del barrido, 20 s de tiempo de equilibrio y 5 s de tiempo de promediado.

5.12. Determinación de los perfiles de actividad en presencia de guanidina

Se ensayaron reacciones en presencia de concentraciones crecientes de hidrocloreuro de guanidina (GuHCl). Las reacciones se realizaron en 1 ml de un medio de AFS (10 mM, pH 6.1) conteniendo citocromo modificado o no modificado (3 a 5 μM), 20 μM de pireno, 15% de acetonitrilo y diferentes concentraciones de GuHCl disuelto en el mismo amortiguador. Las mezclas de reacción se preincubaron por al menos dos horas para permitir el equilibrio de la proteína. Después del tiempo establecido se inició la reacción mediante la adición de 1 mmol de H_2O_2 y se siguió la disminución de absorbancia por minuto a 335 nm. La actividad de las preparaciones de citocromo se expresó como min^{-1} .

5.13. Desnaturalización química de los citocromos modificados

Las muestras conteniendo 2 μM de las preparaciones de citocromo se incubaron a diferentes concentraciones de GuHCl hasta alcanzar el equilibrio. Los espectros de fluorescencia durante la desnaturalización química se obtuvieron en un espectrómetro Perkin Elmer LS-50B. Las muestras se colocaron en celdas de cuarzo (1 cm de espesor) y fueron excitadas a 295 nm. Para cada concentración de GuHCl se obtuvo el promedio de tres espectros de emisión desde 300 nm hasta 500 nm.

Los espectros de fluorescencia de proteínas desnaturalizadas químicamente tienden a mostrar aumentos en la intensidad de la emisión y desplazamientos en la longitud de onda de máxima emisión. Debido a esto, el análisis de los datos se hizo tomando en cuenta el centro de masas de cada espectro obtenido. El centro de masas representa el centroide del espectro y se define matemáticamente con la expresión:

$$cm = \frac{\sum I_{\lambda} \lambda (d\lambda)}{\sum I_{\lambda} (d\lambda)}$$

En donde cm representa el centro de masas del espectro, I_λ representa la intensidad de la emisión a la longitud de onda λ y $(d\lambda)$ representa el intervalo de longitud de onda del barrido del espectro (el cual se mantuvo entre 0.5 nm y 1 nm).

La desnaturalización por GuHCl también fue seguida por actividad y CD. Los parámetros de los espectros de CD fueron establecidos con las mismas condiciones que las utilizadas para el análisis de estructura secundaria.

5.14. Análisis de las transiciones de desnaturalización al equilibrio y determinación de los parámetros termodinámicos del desplegamiento

El ajuste de los datos y la obtención de los parámetros termodinámicos del desplegamiento se hicieron en base a lo reportado previamente por Saab-Rincón (1994). El perfil de desnaturalización del citocromo no modificado se ajustó a un modelo de dos estados. El modelo de dos estados es el modelo más simple de desnaturalización de proteínas y asume que sólo dos especies moleculares se encuentran pobladas, el estado nativo y el estado desplegado. Este modelo se representa mediante la expresión:



En donde N representa al estado nativo de la proteína y D al estado desplegado. El análisis de los perfiles de desnaturalización se realizó mediante una normalización de los datos para obtener la fracción desnaturalizada F_d . Este parámetro define la fracción de la proteína que se encuentra desplegada como función de la concentración de agente desnaturalizante y se obtiene mediante la relación:

$$F_d = \frac{y - y_N}{y_D - y_N} \quad (1)$$

En donde y es la propiedad observada (fluorescencia, dicroísmo circular o actividad) a cualquier concentración de GuHCl, y_N y y_D son las propiedades observadas de los estados nativo y desplegado respectivamente a cualquier concentración de GuHCl. Los valores de y_N y y_D se calcularon mediante una extrapolación de las líneas base de los estados nativo y desplegado (Figura 12A). La constante de equilibrio que define la zona de transición está dada por la expresión:

$$K_{ND} = \frac{f_D}{f_N} = \frac{Fd}{1-Fd} = \frac{y - y_N}{y_D - y_N} = e^{-\Delta G_{ND}^{\circ}/RT} \quad (2)$$

En donde f_N y f_D representan las fracciones de los estados nativo y desplegado respectivamente, ΔG_{ND}° es la energía libre estándar de la transición, R es la constante de los gases y T es la temperatura absoluta. Los datos del citocromo no modificado normalizados a Fd se ajustaron a la ecuación (2) para obtener la energía libre del proceso de desnaturalización. El valor de ΔG_{ND}° obtenido de esta manera refleja el cambio de energía libre estándar de la desnaturalización en función de las diferentes concentraciones de GuHCl dentro de la región de transición. El cambio de energía libre en ausencia del agente desnaturalizante se obtuvo mediante una extrapolación lineal utilizando la siguiente expresión (Pace 1986):

$$\Delta G_{ND}^{\circ} = \Delta G_{ND}^{\circ}(\text{H}_2\text{O}) - m_{ND}[\text{GuHCl}] \quad (3)$$

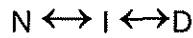
En donde $\Delta G_{ND}^{\circ}(\text{H}_2\text{O})$ representa la energía libre estándar del desplegamiento definida en ausencia de desnaturalizante, a 25°C y 1 atmósfera de presión, y m_{ND} representa la dependencia lineal de la energía libre sobre la concentración de desnaturalizante. El valor de m_{ND} también representa la cooperatividad del proceso y es un reflejo del cambio en la exposición de los residuos hidrofóbicos hacia el solvente durante la desnaturalización.

Una manera alternativa de encontrar los valores de $\Delta G_{ND}^{\circ}(\text{H}_2\text{O})$ y m_{ND} consiste en combinar las ecuaciones (2) y (3) para obtener la ecuación (4) de donde los parámetros pueden ser obtenidos mediante un ajuste no lineal de mínimos cuadrados.

$$K_{ND} = \frac{F_d}{1-F_d} = \frac{y - y_N}{y_D - y_N} = e^{-\left(\Delta G_{ND}^{\circ}(\text{H}_2\text{O}) - m_{ND}[\text{GuHCl}]\right)/RT} \quad (4)$$

Los perfiles de desnaturalización del citocromo no modificado obtenidos por fluorescencia, CD y actividad fueron analizados mediante éste último procedimiento utilizando una versión modificada del programa Savuka V. 5.0 (Ionescu *et al.*, 2000). Los parámetros que arroja directamente el ajuste son $\Delta G_{ND}^{\circ}(\text{H}_2\text{O})$ y m_{ND} .

Por otra parte, el perfil de desnaturalización del citocromo modificado se ajustó a un modelo de tres estados, definido por la expresión:



En donde I representa a un estado intermediario que aparece durante el proceso de desplegamiento. Las constantes de equilibrio para cada transición están definidas como:

$$K_{NI} = \frac{f_I}{f_N} \quad (5)$$

$$K_{ID} = \frac{f_D}{f_I} \quad (6)$$

Los valores de f_N , f_I y f_D representan las fracciones de los estados nativo, intermediario y desplegado. Los valores de F_d se obtuvieron mediante la ecuación (1). La suma de f_N , f_I y f_D es igual a 1, de tal forma que F_d puede expresarse de la siguiente manera:

$$F_d = \frac{y - y_N}{y_D - y_N} = f_D + f_I Z_I \quad (7)$$

El parámetro Z_I representa el valor de la propiedad observada (fluorescencia, dicroísmo, actividad, etc.) para el estado intermediario y está definido por $Z_I = (y_I - y_N)/(y_D - y_N)$. El valor de Z_I puede variar de 0, si la conformación del estado intermediario es similar al estado nativo, a 1, si la conformación es similar al estado desplegado. Combinando las ecuaciones (5), (6) y (7) se obtiene una ecuación para F_d expresada en términos de las constantes de equilibrio:

$$F_d = \frac{K_{NI}(K_{ID} + Z_I)}{1 + K_{NI}(1 + K_{IU})} \quad (8)$$

o bien, expresada en términos de la energía libre del desplegamiento:

$$F_d = \frac{e^{-\left[\frac{\Delta G_{NI}^\circ(\text{H}_2\text{O}) - m_{NI}[\text{GuHCl}]}{RT}\right]} \left(e^{-\left[\frac{\Delta G_{ID}^\circ(\text{H}_2\text{O}) - m_{ID}[\text{GuHCl}]}{RT}\right]} + Z_I \right)}{1 + e^{-\left[\frac{\Delta G_{NI}^\circ(\text{H}_2\text{O}) - m_{NI}[\text{GuHCl}]}{RT}\right]} \left(1 + e^{-\left[\frac{\Delta G_{ID}^\circ(\text{H}_2\text{O}) - m_{ID}[\text{GuHCl}]}{RT}\right]} \right)} \quad (9)$$

Los valores de F_d obtenidos para la desnaturalización del citocromo modificado se ajustaron a la ecuación (9) utilizando una versión modificada del programa Savuka V. 5.0 (Ionescu *et al.*, 2000). Los parámetros que arroja directamente el ajuste son $\Delta G_{NI}^\circ(\text{H}_2\text{O})$, $\Delta G_{ID}^\circ(\text{H}_2\text{O})$, m_{NI} , m_{ID} y Z_I .

Los valores de la concentración de desnaturalizante ($[\text{GuHCl}]_{1/2ij}$) a la cual ocurren las transiciones se obtuvieron mediante la relación $[\text{GuHCl}]_{1/2ij} = \Delta G_{ij}^\circ(\text{H}_2\text{O})/m_{ij}$ para ambas proteínas.

La Figura 12 muestra un ejemplo de la obtención de los parámetros termodinámicos para una desnaturalización de dos estados mediante el método descrito anteriormente. La desnaturalización al equilibrio fue monitoreada por fluorescencia (Figura 12A). En esta curva es posible distinguir tres zonas, la primera ocurre a concentraciones bajas del agente desnaturalizante y corresponde a la línea base del estado nativo. Esta zona representa a la conformación nativa de la proteína. La segunda zona representa la zona de transición, en la cual la estructura de la proteína está distorsionada y las formas nativa, intermediaria(s) y desplegada se encuentran en equilibrio. La tercera zona corresponde a la línea base del estado desplegado y representa la conformación desplegada de la proteína (Pace 1986). Aplicando la ecuación (1) es posible obtener los valores correspondientes a la fracción desplegada (F_d) de la proteína en función de la concentración de GuHCl (Figura 12B). Utilizando la ecuación (2) se pueden obtener los valores de la constante de equilibrio (K_{ND}) a una concentración de GuHCl

determinada. Con los valores de la K_{ND} se pueden obtener los valores correspondientes de ΔG_{ND}° . Los valores de ΔG_{ND}° se grafican en función de la concentración de GuHCl (Figura 12C) y los datos se ajustan a una línea recta con la ecuación (3). La extrapolación de los datos arroja los valores estimados para $\Delta G_{ND}^{\circ}(\text{H}_2\text{O})$ y m_{ND} .

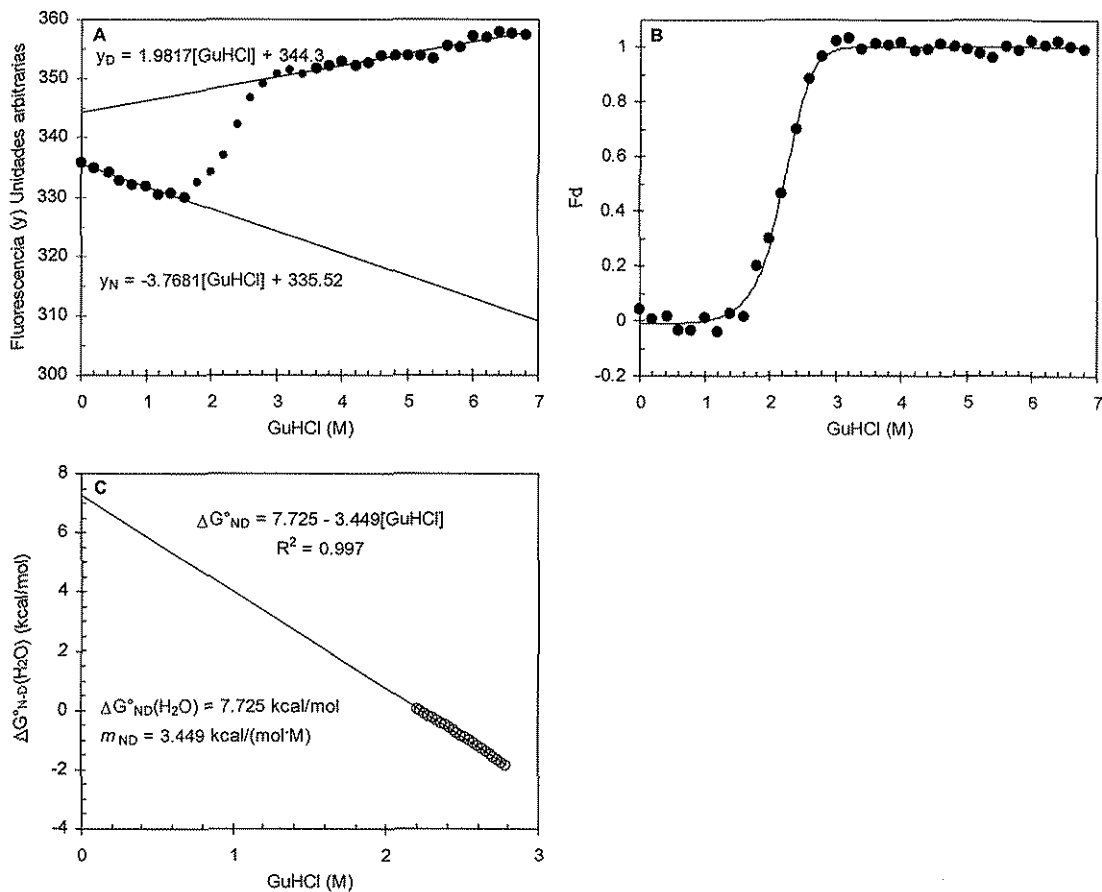


Figura 12. Ejemplo de un perfil de desnaturalización al equilibrio de citocromo *c* de corazón de caballo en función de la concentración de GuHCl. A) Datos obtenidos mediante fluorescencia, las líneas representan la extrapolación de las líneas bases nativa y desplegada. B) Datos normalizados a F_d , la línea representa el ajuste de los datos a la ecuación (4) mediante el análisis no lineal de mínimos cuadrados. C) Ajuste de los datos normalizados a F_d en la zona de transición. El valor de $\Delta G_{ND}^{\circ}(\text{H}_2\text{O})$ se obtiene por una extrapolación lineal de los datos.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Modificación química de hemoproteínas

6.1.1. Síntesis del plástico biocatalítico citocromo-Nylon

El citocromo *c* de corazón de caballo fue incorporado durante la reacción de polimerización del Nylon. Como resultado de esta reacción se obtuvo el copolímero citocromo-Nylon (Cyt-nyl) que resultó ser activo contra pireno. La carga estimada de proteína en el polímero fue 5.2% p/p (4.2 nmol cyt/mg biocatalizador). El perfil de actividad contra temperatura de esta preparación se muestra en la Figura 13. El citocromo no modificado (Cyt-wt) mostró una temperatura óptima alrededor de los 40°C, seguido de una rápida inactivación. Por otra parte, la incorporación del citocromo en el plástico alteró en el perfil de actividades de la proteína, provocando un incremento de 10°C en la temperatura óptima del biocatalizador y adicionalmente, se encontró un intervalo de temperaturas entre los 60°C y 80°C en donde la actividad se mantuvo relativamente constante. Sin embargo, es importante mencionar que la copolimerización también provocó una pérdida notable de la actividad de la proteína, este comportamiento se vio acentuado a temperaturas superiores a los 80°C.

La pérdida de actividad de la proteína modificada puede ser atribuida a la presencia de un medio orgánico (cloroformo 50%) en la reacción de copolimerización. La relativa inestabilidad e insolubilidad de las proteínas en estos medios ha sido uno de los factores que han limitado la síntesis de los de plásticos biocatalíticos (Yang and Russell, 1995). Por otra parte, la polimerización pudo haber producido un plástico con una estructura muy compacta en la cual los factores difusionales pueden ser responsables de la baja actividad observada en el biocatalizador. Wang *et al.* han reportado una reducción de 10 veces en la actividad en sistemas acuosos de la quimotripsina copolimerizada en polimetil-metacrilato. Esta reducción

fue atribuida principalmente a las limitaciones difusionales de sustratos hidrofóbicos en el medio acuoso (Wang *et al.*, 1997b). Adicionalmente, otro de los factores que pueden explicar la baja actividad del Cyt-nyl puede ser la baja disponibilidad de los sitios activos de la proteína para efectuar la catálisis. La reacción de modificación puede haber producido un polímero muy compacto con baja porosidad, bloqueando con esto los sitios activos de la proteína. El hecho que algunos de los sitios activos estén bloqueados puede tener como resultado que la actividad se vea subestimada debido a la carencia de información acerca de la concentración real de sitios activos presentes en el plástico. Este problema podría resolverse mediante una titulación de los sitios activos disponibles en el biocatalizador o bien, empleando otro monómero como agente espaciador que permita la síntesis de un plástico más poroso. Sin embargo, es importante mencionar que no existe un método de titulación de sitios activos para peroxidases (o hemoproteínas con actividad peroxidásica).

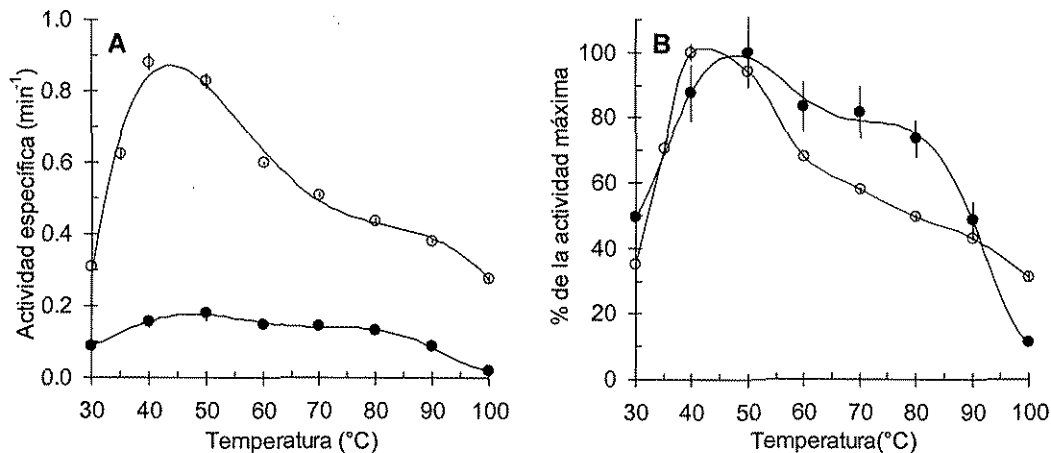


Figura 13. Perfil de actividades contra temperatura del citocromo c inmovilizado en Nylon. (A) Actividad específica; (B) porcentaje de la actividad máxima. La actividad se estimó utilizando pireno como sustrato. Cyt-wt (○), Cyt-nyl (●).

6.1.2. Modificación de la cloroperoxidasa y peroxidasa con Polietilén glicol (PEG)

Se modificó químicamente con PEG (PM 5000 Da) a la cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago* (CPO) y la peroxidasa de rábano blanco (HRPO) mediante el método descrito en

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

materiales y métodos. Estas enzimas son proteínas relativamente ácidas, que presentan un número bajo de grupos amino libres en su superficie (entre 3 y 6). En la Figura 14 se muestra el perfil de actividades de la CPO y HRPO modificadas con PEG₅₀₀₀. La modificación química no alteró el perfil de actividades de la CPO, encontrándose una temperatura óptima de 45°C para ambas preparaciones, sin embargo, la modificación provocó una pérdida de actividad cercana al 30% a todas las temperaturas ensayadas. La pérdida de actividad en la CPO-PEG puede estar directamente relacionada con la inestabilidad de la CPO bajo las condiciones a las que se realiza la modificación química, que requiere de la presencia de un pH superior a 10.

En el caso de la peroxidasa de rábano blanco, el perfil de actividades de ambas preparaciones se mantuvo inalterado hasta los 65°C. Sin embargo, la HRPO-PEG resultó 35% más activa a temperaturas entre 35°C y 65°C, con una temperatura óptima 10°C menor a la observada para la proteína no modificada. Temperaturas superiores a los 60°C inactivaron marcadamente a la HRPO-PEG.

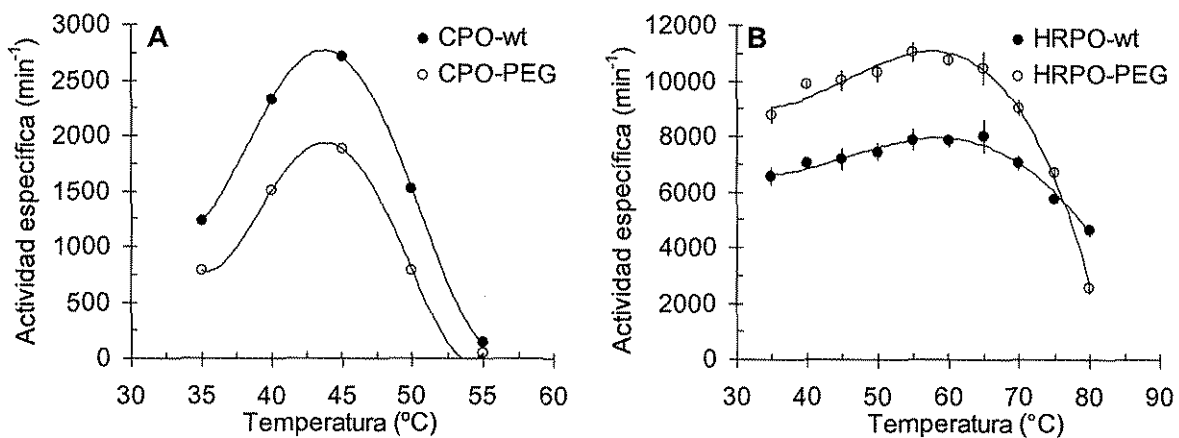


Figura 14. Perfil de actividades en función de la temperatura de hemoproteínas modificadas con PEG₅₀₀₀. A) Cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago*. B) Peroxidasa de rábano blanco. La actividad se midió sobre cloruro de pinacianol

La Figura 15A muestra que la modificación química de la CPO tuvo efectos desfavorables en la estabilidad de la proteína. Mientras que la CPO se inactivó completamente después de 5 minutos a 45°C, la enzima modificada perdió cerca del 80% de su actividad inicial durante los

dos primeros minutos de incubación a la misma temperatura. No fue posible obtener las curvas de estabilidad a temperaturas superiores a los 45°C debido a la rápida inactivación de esta proteína. Por otra parte, la modificación no tuvo efectos notables en la inactivación térmica de la peroxidasa (Figura 15B). La cinética de inactivación de la HRPO-PEG fue similar a la de la enzima no modificada y ambas se inactivaron completamente dentro de los primeros 10 minutos de incubación a 70°C. Se ha demostrado previamente que la HRPO mantiene una movilidad restringida alrededor del hemo cuando se modifican cuatro de los seis grupos amino de la proteína con anhídridos carboxílicos o ácido picrilsulfónico (Ugarova *et al.*, 1979). Sin embargo, los mismos autores encontraron que la modificación de sólo dos de los grupos amino o la modificación de todos los seis grupos amino de esta proteína tiene como efecto una disminución de la termoestabilidad de la enzima. De acuerdo a estos autores, la estabilidad de la HRPO modificada está directamente relacionada al grado de modificación. Por otra parte, nuestro trabajo sugiere que el incremento en la actividad observado para la HRPO-PEG es causado por la modificación con el polímero, sin embargo, el grado de modificación de la preparación puede no ser el adecuado para alcanzar una estabilización notable. Es necesaria una caracterización más profunda de la enzima modificada para poder elucidar los efectos de la modificación química sobre la estabilidad y actividad de la misma.

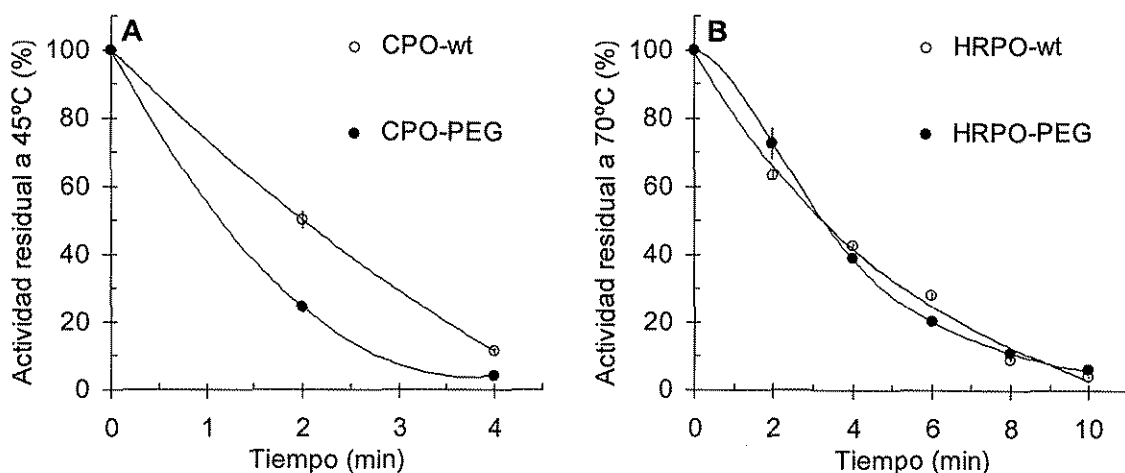


Figura 15. Estabilidad de hemoproteínas modificadas con PEG₅₀₀₀. A) cloroperoxidasa; B) peroxidasa. La actividad se estimó sobre cloruro de pinacianol.

6.1.3. Modificación química del citocromo c

El citocromo c de corazón de caballo fue modificado con PEG₅₀₀₀ (Cyt-PEG₅₀₀₀). El grado de modificación se estimó mediante la titulación de los grupos amino libres con el método del ácido trinitro-bencensulfónico (TNBS). Los resultados indicaron que el 80% de los grupos amino superficiales se modificaron con el polímero. El método de TNBS se basa en la formación de un compuesto colorido entre los grupos amino libres de la proteína y el TNBS, el cual se sigue por su absorbancia a 335 nm y 420 nm. La absorbancia a 335 nm produjo lecturas irregulares en todas las preparaciones ensayadas, mientras que la lectura a 420 nm se sobrepone con la banda Soret del citocromo (ver figura 7). Debido a esto, fue necesario tratar de validar el grado de modificación por diferentes métodos. Como resultado de la modificación se esperaba que la masa molecular del citocromo aumentara a 94,752 Da y se redujera el número de cargas positivas en la superficie de la proteína, por lo que se consideró que los métodos de separación de proteínas basados en el peso molecular o carga podrían dar un estimado del grado de modificación. Las preparaciones de citocromo fueron sometidas a electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE), isoelectroenfoque y a cromatografía de filtración en gel, sin embargo, ninguno de estos métodos fue capaz de dar resultados reproducibles. Varios autores han observado un patrón de movilidad alterado en las electroforesis o cromatografías de enzimas modificadas con PEG (Varalakshmi *et al.*, 1995; Longo and Combes, 1997). Este comportamiento puede ser atribuido a un incremento en el volumen hidrodinámico de la proteína después de la modificación química, y adicionalmente, la presencia del polímero puede obstruir la interacción de la proteína con los soportes cromatográficos dando lugar a patrones de elución alterados. Esta puede ser la causa del comportamiento observado para el citocromo modificado, en donde, dado el alto grado de modificación obtenido con el método de TNBS, la proteína sólo constituye el 13% de la masa del biocatalizador. El peso molecular del Cyt-PEG₅₀₀₀ fue posteriormente estimado por espectrometría de masas. Los resultados mostraron

una amplia distribución de pesos moleculares con variaciones aproximadas de 5,000 Da, sugiriendo la presencia de diferentes especies moleculares del citocromo modificado. Este espectro también demuestra la presencia de un pico mayoritario con un peso molecular de 94.3 kDa (Figura 16), confirmando los resultados obtenidos por TNBS. El grado de modificación, cuantificado por TNBS, de las diferentes muestras producidas posteriormente indicó que el grado de modificación fue relativamente constante, oscilando alrededor del 80%.

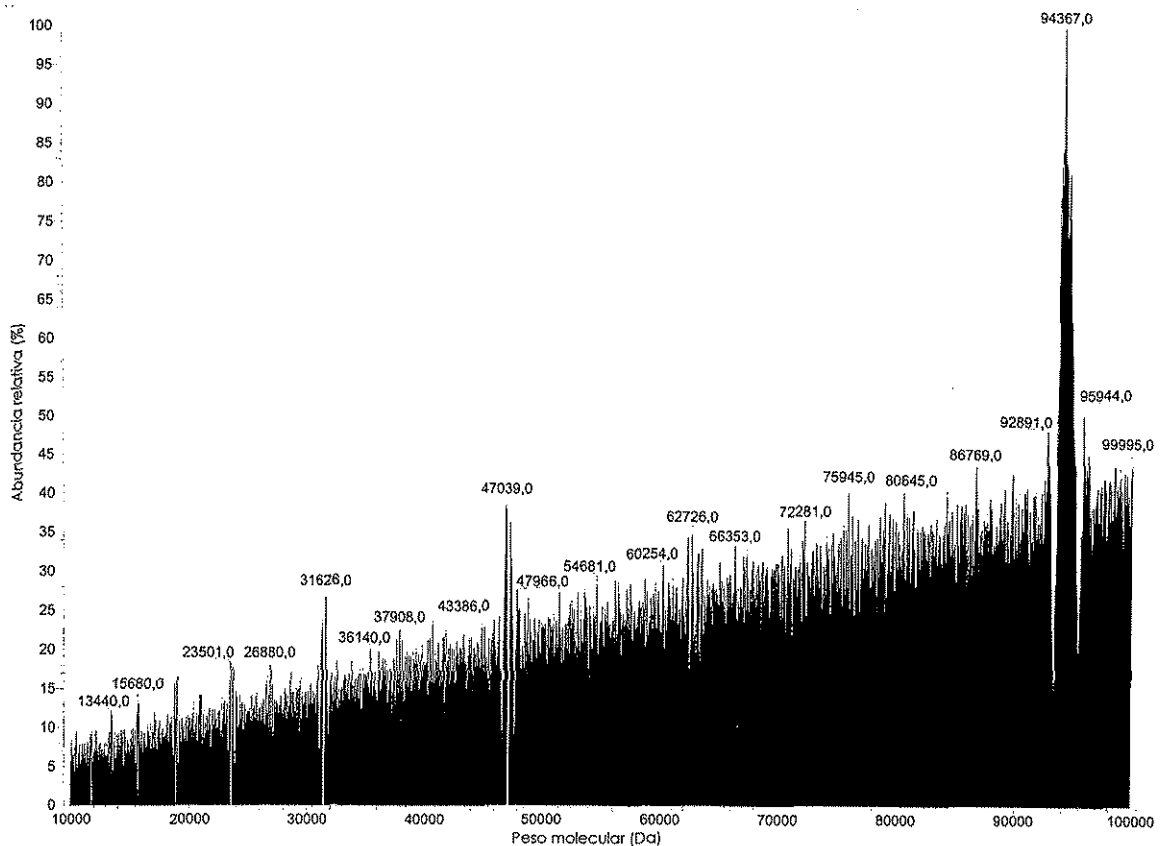


Figura 16. Estimación del peso molecular del citocromo modificado por espectrometría de masas (ES-MS).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6.2. Estabilidad del citocromo modificado con PEG₅₀₀₀

El citocromo *c* de corazón de caballo es una proteína pequeña formada por 104 aminoácidos y con un peso molecular de 12,348 Da. Es una molécula compacta cuya estructura secundaria posee cerca de 30% en α -hélices (Ahmad *et al.*, 2000), mantenidas por una compleja red de puentes de hidrógeno (Louie and Brayer, 1990). El citocromo *c* de corazón de caballo es una de las proteínas más estables dentro de la familia de los citocromos (Endo *et al.*, 1985), de hecho esa alta estabilidad le confiere actividad catalítica sobre el cloruro de pinacianol a temperaturas superiores a los 110°C con actividad máxima alrededor de los 70°C (Figura 17A). La modificación química del citocromo *c* de corazón de caballo con PEG₅₀₀₀ produjo un conjugado activo a altas temperaturas. En contraste con la proteína no modificada, el Cyt-PEG₅₀₀₀ presentó una pérdida de actividad menos drástica a temperaturas superiores a 80°C, lo que sugirió una posible estabilización debida a la modificación química. Se ha reportado previamente que la modificación química con PEG provoca un incremento en la hidrofobicidad global de la molécula (Longo and Combes, 1997). El incremento en la hidrofobicidad de la enzima es favorable en la catálisis contra sustratos hidrofóbicos ya que permite una mayor solubilidad del biocatalizador en medio orgánico y se favorece la partición del sustrato hacia el sitio activo de la enzima. El cloruro de pinacianol es un sustrato relativamente hidrofílico, por lo que se esperaba que la modificación con PEG no alterara de manera significativa el perfil de actividades, sin embargo, cuando se utiliza un sustrato hidrofóbico como el pireno, la actividad del Cyt-PEG₅₀₀₀ se ve incrementada de manera importante (Figura 17B). La temperatura óptima de ambas preparaciones cuando se utiliza pireno como sustrato, se ve desplazada hacia los 40°C y, contrario a los resultados obtenidos con cloruro de pinacianol, el Cyt-wt perdió completamente su actividad a temperaturas superiores a los 80°C, mientras que a esta misma temperatura el Cyt-PEG₅₀₀₀ logró conservar cerca del 15% de su actividad máxima.

La modificación química también incrementó notablemente la termoestabilidad del citocromo. El citocromo no modificado perdió completamente su actividad después de tres horas a 80°C, mientras que el Cyt-PEG₅₀₀₀ logró retener 50% de su actividad inicial después de 7 horas a 80°C (Figura 18). La presencia de sustrato en el medio de reacción incrementó la estabilidad de ambas preparaciones. En el caso del citocromo modificado, la presencia del sustrato resultó en la completa estabilización del catalizador, el cual conservó 100% de su actividad inicial aún después de 7 horas de incubación a 80°C. La relación de las constantes de inactivación del Cyt-PEG₅₀₀₀ y Cyt-wt incubados en ausencia de sustrato demostró que la proteína modificada con PEG es 5 veces más estable que la proteína no modificada (k_{in} Cyt-wt = 0.6046 h⁻¹; k_{in} Cyt-PEG₅₀₀₀ = 0.1244 h⁻¹). Este efecto puede ser atribuido directamente a la modificación química con PEG.

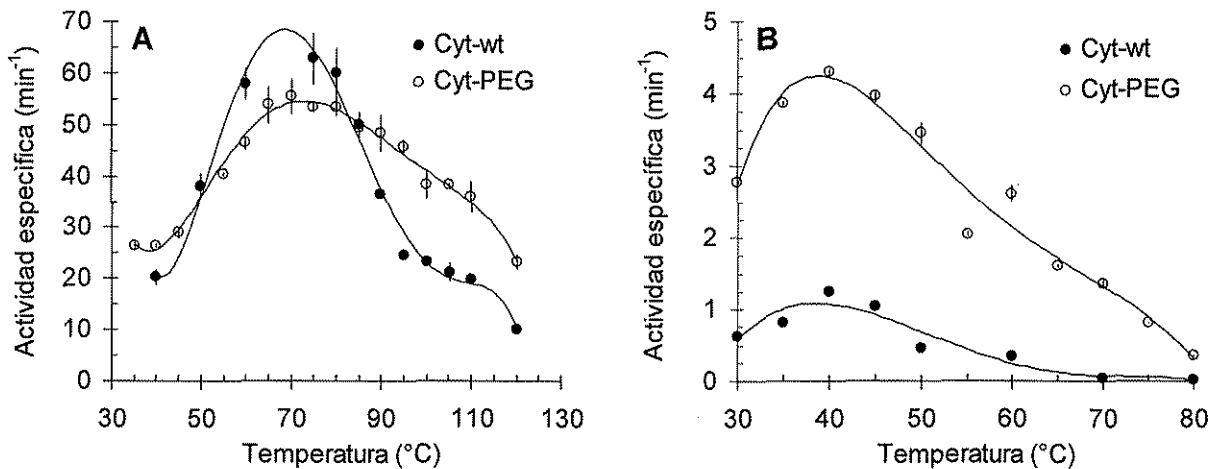


Figura 17. Perfil de actividades contra temperatura del citocromo c. A) Actividad contra cloruro de pinacianol. B) Actividad contra pireno.

Cuando la actividad residual es detectada sobre pireno (Figura 19), la estabilidad del Cyt-PEG₅₀₀₀ se ve incrementada con respecto a la observada sobre cloruro de pinacianol. Bajo condiciones de incubación en ausencia de sustrato, el citocromo modificado retuvo 65% de su actividad inicial con una constante de inactivación de 0.0496 h⁻¹. La estabilidad del Cyt-PEG₅₀₀₀

evaluada bajo estas condiciones resultó ser 2.5 veces mayor a la obtenida para el Cyt-PEG₅₀₀₀ incubado en ausencia de pinacianol (Figura 18). Por otra parte, no fue posible obtener una curva de inactivación del citocromo no modificado debido a la baja actividad presentada por esta proteína a 80°C cuando se utiliza pireno como sustrato.

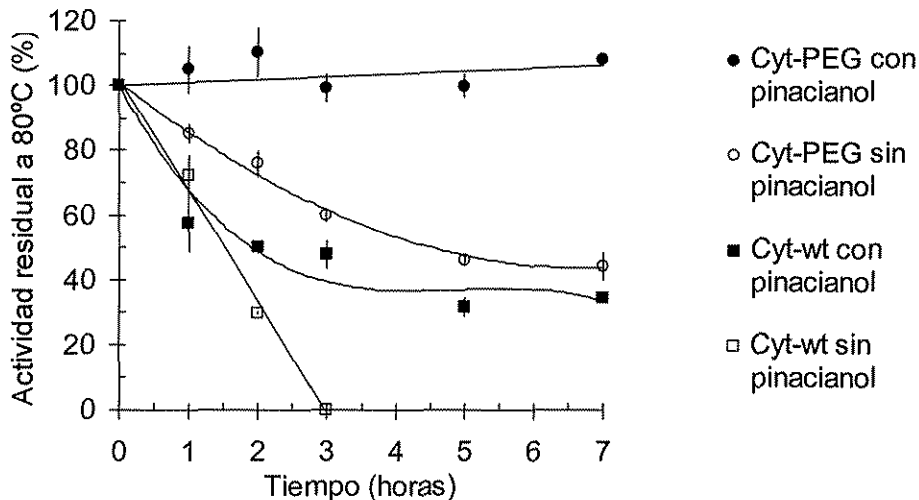


Figura 18. Estabilidad del citocromo *c* a 80°C y 15% de acetonitrilo. La actividad se midió incubando a la proteína a la temperatura indicada en ausencia y presencia de cloruro de pinacianol.

El PEG es un polímero anfifílico que tiene la capacidad de enlazar varias moléculas de agua por medio de puentes de hidrógeno. De hecho, se ha demostrado que el oxígeno de cada unidad de etilén glicol es capaz de unir entre dos y tres moléculas de agua (Liu and Parsons, 1969; Donato *et al.*, 1996), de aquí que es posible que el efecto estabilizante de la modificación con polímero pueda deberse a la formación de una compleja red de puentes de hidrógeno entre los residuos hidrofílicos que se encuentran en la superficie de la proteína y el polímero. La disminución en la movilidad de la proteína debida a la alta estructuración de las moléculas de agua que solvatan al polímero y a la proteína puede ser el principal factor responsable de la estabilización del biocatalizador.

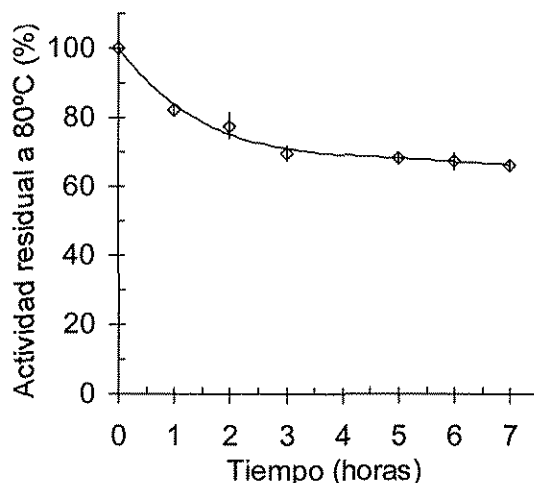


Figura 19. Estabilidad del Cyt-PEG₅₀₀₀ a 80°C. El ensayo se realizó en ausencia de sustrato en 15% de acetonitrilo. Después del tiempo indicado se adicionaron 4 μ l de pireno 5 mM en acetonitrilo y 5 μ l de H₂O₂ 20 mM para iniciar la reacción.

Para descartar que la estabilidad observada en el citocromo modificado pudiera deberse a la presencia del polímero en estado libre, se ensayó la estabilidad del citocromo no modificado a 80°C en presencia de mPEG libre. Es necesario hacer notar que el citocromo no modificado no presentó actividad a 80°C y debido a esto fue necesario enfriar la muestra a 30°C para medir su actividad residual. La Figura 20 mostró que el incremento en la concentración del polímero en el medio de reacción provocó una reducción en la estabilidad del citocromo nativo, descartando con esto que la presencia del polímero en solución sea el responsable del efecto estabilizante observado en los experimentos anteriores. Sin embargo, este resultado contrasta con los resultados obtenidos por otros autores, quienes han sugerido que el PEG actúa como un agente estabilizante (García *et al.*, 1998). Este efecto se da por un mecanismo de exclusión preferencial, en el cual el PEG se ve expulsado de la superficie de la proteína por un mecanismo estérico, provocando al mismo tiempo una mayor hidratación de la superficie de la enzima. Es un hecho conocido que las sustancias que favorecen la hidratación preferencial de las proteínas tienden a estabilizarlas (Xie and Timasheff, 1997). Por otra parte, otros autores sugieren que el PEG, al ser una molécula hidrofóbica, tiende a interaccionar preferentemente

con las cadenas hidrofóbicas que se exponen al solvente como resultado de la desnaturalización de la proteína. El resultado neto de esta interacción es una reducción de la temperatura de transición entre los estados nativo y desplegado de la proteína (Lee and Lee, 1987). Este parece ser el efecto observado en el citocromo cuando se incubaba en presencia de mPEG libre. El citocromo es una proteína de membrana que presenta zonas hidrofóbicas en su superficie. Aquí, la mayor interacción de los residuos hidrofóbicos de la proteína con el agua presente en el microambiente de la proteína debida al mecanismo de hidratación preferencial, es termodinámicamente desventajosa. Esto puede explicar la tendencia en la disminución de la actividad residual debida al incremento de la concentración del polímero libre en el medio de reacción.

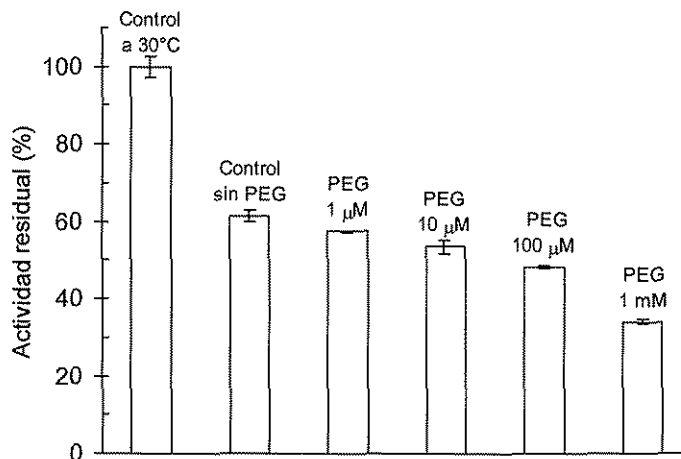


Figura 20. Efecto de la adición de mPEG libre en la estabilidad del citocromo no modificado. Con excepción del control a 30°C, todas las muestras fueron incubadas a 80°C durante 7 hrs. La actividad residual se midió sobre pireno después de enfriar la muestra hasta 30°C.

6.3. Actividad del citocromo c contra sustratos hidrofóbicos

Se determinó la actividad catalítica de las preparaciones de citocromo contra diversos sustratos hidrofóbicos mediante HPLC (Tabla 4). Los ensayos a 80°C demostraron una

reducción en el área del pico del sustrato y, al mismo tiempo, la aparición de productos (datos no mostrados), confirmando con esto que el Cyt-PEG₅₀₀₀ es activo contra este tipo de sustratos.

La Tabla 4 muestra las actividades específicas de las preparaciones de citocromos contra tres hidrocarburos polinucleoaromáticos (pireno, antraceno y benzo(α)pireno) y tres compuestos organoazufrados (tiantreno, dibenzotiofeno y disulfuro de fenilo). El Cyt-PEG₅₀₀₀ resultó más activo contra todos los sustratos en comparación al Cyt-wt a las dos temperaturas probadas y en términos generales la actividad que presentaron las dos preparaciones de citocromo fue mayor para los sustratos azufrados que para los polinucleoaromáticos.

Tabla 4. Actividad específica del citocromo contra sustratos hidrofóbicos.

Citocromo	Sustrato	Actividad específica (min ⁻¹)*	
		30°C	80°C
Cyt-wt	Pireno	0.5 ± 0.03	0.07 ± 0.01
	Antraceno	1.0 ± 0.1	0.12 ± 0.002
	Benzo(α)pireno	0.8 ± 0.12	0.5 ± 0.05
	Tiantreno	5.8 ± 0.22	0.6 ± 0.04
	Dibenzotiofeno	1.9 ± 0.03	0.13 ± 0.003
	Disulfuro de fenilo	1.2 ± 0.09	0.1 ± 0.01
Cyt-PEG ₅₀₀₀	Pireno	1.2 ± 0.19	0.08 ± 0.0003
	Antraceno	3.3 ± 0.12	0.54 ± 0.005
	Benzo(a)pireno	2.6 ± 0.35	1.5 ± 0.03
	Tiantreno	11.6 ± 0.56	2.6 ± 0.31
	Dibenzotiofeno	5.1 ± 0.84	1.0 ± 0.01
	Disulfuro de fenilo	3.9 ± 0.21	0.7 ± 0.03

*La actividad se midió en HPLC equipado con una columna LC-18. El ensayo de actividad duró 10 minutos.

La mayor actividad presentada por el Cyt-PEG₅₀₀₀ en comparación del citocromo no modificado puede atribuirse a la presencia del polímero en el microambiente de la proteína. Los ensayos de actividad contra sustratos hidrofóbicos requieren de la presencia de un solvente orgánico y, como consecuencia de esto, el sustrato se ve particionado hacia el solvente debido a que la hidrofobicidad del medio de reacción es mayor que la del sitio activo de la enzima. Se

ha reportado anteriormente que la modificación con PEG produce biocatalizadores más hidrofóbicos que son capaces de solubilizarse en solventes orgánicos (Vazquez-Duhalt *et al.*, 1992; Longo and Combes, 1997). Este incremento en la hidrofobicidad favorece la partición del sustrato hacia el sitio activo de la enzima, explicando con esto el comportamiento observado por el Cyt-PEG₅₀₀₀.

Con el objeto de analizar la capacidad del Cyt-PEG para catalizar reacciones en sistemas orgánicos, se realizaron ensayos de actividad de las dos preparaciones de citocromo en medios con 97.5% de distintos solventes orgánicos miscibles en agua. Los resultados se resumen en la Tabla 5. Puede observarse que el citocromo modificado fue más activo que el no modificado en todos los solventes ensayados. Interesantemente, solventes como el acetonitrilo, butanol, etanol y metanol, indujeron incrementos en la actividad de 213, 50, 41 y 30 veces respectivamente en comparación a la actividad obtenida por el citocromo no modificado en los mismos solventes.

Tabla 5. Actividad del citocromo en 97.5% de solvente orgánico.

Solvente	Actividad específica (min ⁻¹) [*]	
	Cyt-wt	Cyt-PEG ₅₀₀₀
Agua/ACN (90/10)	5.6 ± 0.5	19.7 ± 0.6
Metanol	1.3 ± 0.2	39.2 ± 1.8
Etanol	0.5 ± 0.03	20.6 ± 0.9
Isopropanol	2.9 ± 0.4	7.9 ± 0.2
Butanol	0.3 ± 0.02	14.9 ± 0.3
Acetonitrilo	0.1 ± 0.003	21.3 ± 0.4
Acetona	1.5 ± 0.3	11.1 ± 0.4
Tetrahidrofurano	1.2 ± 0.1	7.6 ± 0.6
Dimetil formamida	0.71 ± 0.05	3.7 ± 0.2
Dimetil sulfóxido	0.01 ± 0.001	0.06 ± 0.004

^{*}La actividad se midió a 25°C utilizando cloruro de pinacianol como sustrato.

Diversos estudios se han enfocado a tratar de predecir la actividad catalítica en medios orgánicos utilizando diferentes propiedades físicas de los solventes (Halling, 1994). El parámetro más comúnmente utilizado es el logaritmo del coeficiente de partición entre octanol y

agua ($\log P$), sin embargo, este parámetro dista mucho de ser general y no puede aplicarse a mezclas de solventes orgánicos miscibles en agua. Torres *et al.* han propuesto un nuevo parámetro para estimar la hidrofobicidad de mezclas de agua/solvente orgánico y se ha utilizado para correlacionar la actividad catalítica de cuatro peroxidasas y del citocromo *c* en sistemas acuosos conteniendo solventes orgánicos miscibles (Torres *et al.*, 1998). Este nuevo parámetro de hidrofobicidad está directamente correlacionado con la actividad termodinámica del solvente en la mezcla e inversamente correlacionado con la polaridad del solvente:

$$H = \frac{a_s}{E_T(30)}$$

En donde H (moles/cal) es la hidrofobicidad de la mezcla agua/solvente orgánico, a_s es la actividad del solvente orgánico en la mezcla y $E_T(30)$ (kcal/mol) es el parámetro de polaridad de Dimroth-Reichardt. De la misma manera, a_s está en función del coeficiente de actividad y de la fracción molar del solvente en la mezcla. El coeficiente de actividad se calcula a partir de las ecuaciones NRTL utilizando los datos de las tablas de equilibrio vapor-líquido a 25°C para diferentes mezclas de agua-solvente orgánico. A partir de la ecuación anterior, se calcularon los valores de hidrofobicidad de las mezclas de agua/solvente orgánico y se trataron de correlacionar con la actividad obtenida por las preparaciones de citocromo (Figura 21). Los valores de hidrofobicidad ($\mu\text{mol/cal}$) calculados para las mezclas de reacción fueron: agua/acetonitrilo (90/10), 5.62; metanol, 17.05; etanol, 17.87; isopropanol, 18.71; dimetil sulfóxido, 19.4; butanol, 19.54; acetonitrilo, 20.67; dimetil formamida, 20.73; acetona, 21.85; tetrahidrofurano, 25.41. La hidrofobicidad del butanol fue obtenida a partir de una extrapolación de la relación lineal entre la hidrofobicidad de los alcoholes de menor peso molecular y el número de unidades $-\text{CH}_2-$ de los mismos ($r^2=1$). Laane *et al.* (1987) han demostrado que, para algunas enzimas, existe una correlación directa entre la actividad y la hidrofobicidad del solvente cuando el $\log P$ es utilizado como una medida de la hidrofobicidad. Basándonos en

este reporte, esperábamos encontrar una mayor actividad del Cyt-PEG en solventes más hidrofóbicos, sin embargo, contrariamente a lo esperado, la correlación entre la hidrofobicidad del medio de reacción y la actividad de la preparación de citocromo obtenida para ambas preparaciones de citocromo fue baja. De la misma manera, no se obtuvieron buenas correlaciones cuando los datos se expresaron en función de la polaridad o de la capacidad de desnaturalización del solvente (datos no mostrados).

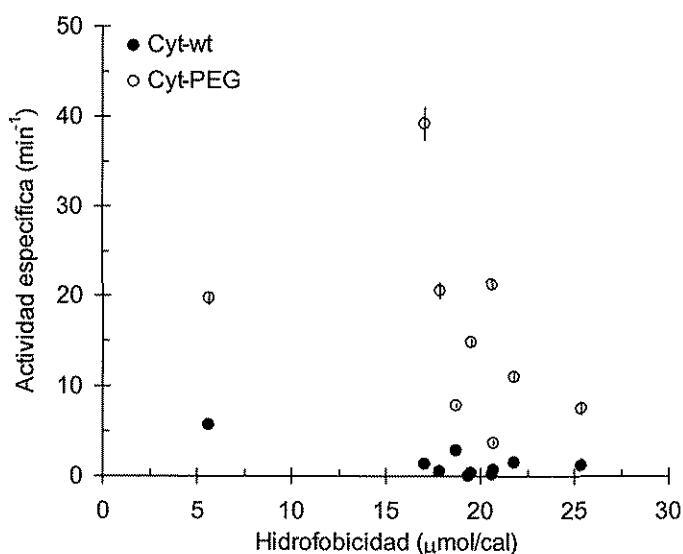


Figura 21. Actividad específica sobre cloruro de pinacianol de las preparaciones de citocromo en función de la hidrofobicidad del medio de reacción. Los valores de hidrofobicidad fueron calculados a partir de la ecuación $H = \alpha_s / E_T(30)$.

Por otra parte, se determinaron los parámetros cinéticos de ambas preparaciones de citocromo a 30°C y 80°C. Ambas preparaciones siguieron cinéticas de Michaelis-Menten (Figura 22). En la mayoría de los casos, no fue posible utilizar condiciones de saturación para ambos sustratos debido a que concentraciones elevadas de peróxido provocaron una rápida inactivación de la proteína, mientras que concentraciones de pireno por arriba de 50 μM resultaron en la precipitación de éste sustrato. En el caso del Cyt-PEG₅₀₀₀ a 30°C, el barrido de pireno se hizo manteniendo fija la concentración de H₂O₂ a 5 mM ya que concentraciones

superiores de éste último inactivaron rápidamente a la proteína. Por el contrario, el Cyt-wt presentó valores elevados de saturación para el pireno y para el peróxido. La inactivación por peróxido fue menor para el Cyt-wt que para el citocromo modificado y esto facilitó la utilización de concentraciones mayores para la determinación de los parámetros. La cinética del Cyt-PEG₅₀₀₀ a 80°C mostró en términos generales una menor velocidad de reacción que la presentada a 30°C y al mismo tiempo una rápida saturación con el peróxido de hidrógeno. La Tabla 6 presenta los datos cinéticos obtenidos como resultado del ajuste no lineal de los datos. Dado que en la mayoría de los casos no se utilizaron concentraciones de saturación por las razones anteriormente expuestas, la constante de afinidad se reporta como aparente, K_{Map} . Interesantemente, ambas preparaciones mostraron valores comparables de V_{max} a 30°C, sin embargo, la modificación con PEG disminuyó 3.1 y 7.4 veces la K_{Map} para el pireno y el peróxido respectivamente. La reducción de la K_{Map} tiene como consecuencia un incremento notable en la eficiencia catalítica del Cyt-PEG₅₀₀₀. Resultados similares han sido observados en diversas preparaciones de citocromo c modificado químicamente (Tinoco and Vazquez-Duhalt, 1998), en donde la modificación con PEG redujo 5.4 y 8.8 veces la K_{Map} para el tiantreno y para el peróxido respectivamente. Este efecto ha sido atribuido principalmente al incremento en la hidrofobicidad del microambiente que rodea al grupo hemo (Torres *et al.*, 1996). Como se discutió anteriormente, uno de los principales problemas que afectan a la biocatálisis en medio orgánico es la partición favorable del sustrato hacia el solvente. Aquí, un incremento en la hidrofobicidad del biocatalizador puede promover una mayor interacción del sustrato hidrofóbico con el sitio activo, incrementando la eficiencia catalítica del mismo. Por otra parte, los datos cinéticos obtenidos a 80°C indicaron una disminución de 2 veces en la V_{max} del Cyt-PEG₅₀₀₀ y un aumento de 8 veces en la K_{Map} para el pireno en relación a los datos obtenidos para la misma preparación a 30°C. Es importante hacer notar el incremento de 17 veces en la eficiencia catalítica para el H₂O₂ debida principalmente a una reducción en la K_{Map} para el

mismo sustrato. Esto puede explicar la mayor susceptibilidad a la inactivación por peróxido por parte de la proteína modificada. Por otra parte, no fue posible obtener la cinética del Cyt-wt a 80°C debido a la baja actividad presentada por esta preparación.

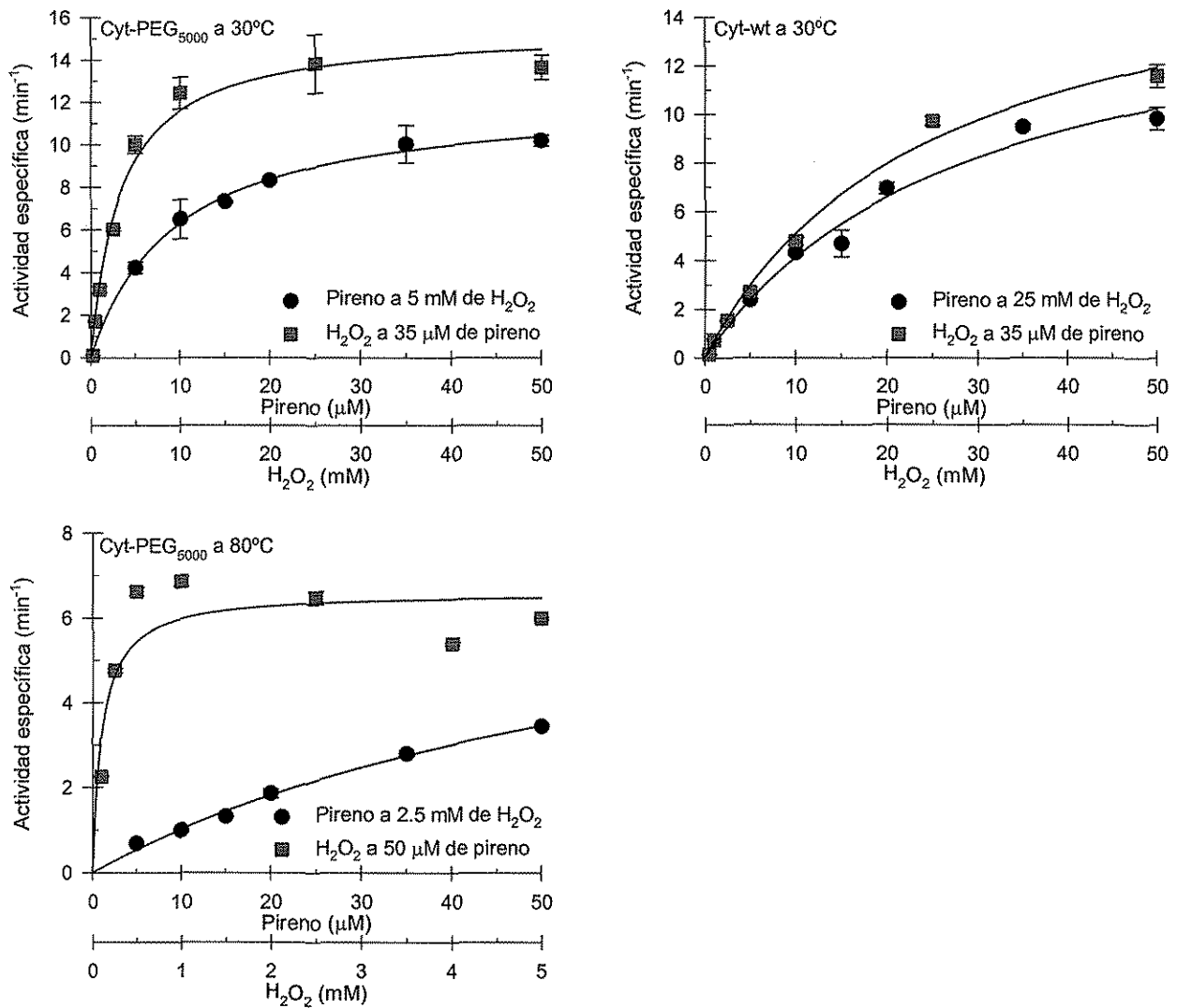


Figura 22. Cinéticas de Michaelis-Menten de las preparaciones de citocromo a 30°C y 80°C.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 6. Constantes cinéticas de las preparaciones de citocromo c a 30 y 80°C.

Preparación	V_{max} (s^{-1})	Pireno		H_2O_2	
		K_{Map} (M)	V_{max}/K_{Map} ($s^{-1}M^{-1}$)	K_{Map} (M)	V_{max}/K_{Map} ($s^{-1}M^{-1}$)
30°C					
Cyt-PEG ₅₀₀₀	0.232	9.5×10^{-6}	2.4×10^4	3.4×10^{-3}	69.16
Cyt-wt	0.284	29.3×10^{-6}	9.7×10^3	25.2×10^{-3}	11.31
80°C					
Cyt-PEG ₅₀₀₀	0.127	75.1×10^{-6}	1.7×10^3	1.06×10^{-4}	1.2×10^3
Cyt-wt*	-----	-----	-----	-----	-----

*No determinado debido a la baja actividad presentada por esta preparación a 80°C.

6.4. Efecto del tamaño del polímero en la estabilidad de la proteína modificada.

Se evaluó el efecto de la relación PEG/Cyt sobre la estabilidad del citocromo. Para esto, se sintetizaron los PEG (PM 350, 750, 2000 Da) activados con cloruro cianúrico utilizando el método reportado previamente (Abuchowski *et al.*, 1977b). La titulación del cloro residual con nitrato de plata indicó que en el caso del PEG₃₅₀ activado se obtuvieron los derivados mono y bis, mientras que para los PEG₇₅₀ y PEG₂₀₀₀ solo se obtuvo el derivado mono. El citocromo c de corazón de caballo fue modificado con los PEG previamente activados y el porcentaje de modificación se determinó por titulación de los grupos amino libres con TNBS. Los resultados de la titulación, así como los pesos moleculares estimados de las preparaciones se resumen en la Tabla 7.

Tabla 7. Porcentaje de modificación* y peso molecular estimado de los citocromos modificados con PEG (PM 350, 750 y 2000 Da).

Preparación	Modificación (%)	PM estimado (kDa)
Cyt-PEG ₃₅₀	30.64	15.3
Cyt-bisPEG ₃₅₀	20.76	15.6
Cyt-PEG ₇₅₀	70.64	24.4
Cyt-PEG ₂₀₀₀	80.52	45.2

*Porcentaje de modificación expresado en función del número de grupos amino modificados de un total de 20.

Es importante mencionar que, al igual que en el caso del Cyt-PEG₅₀₀₀, los citocromos modificados con todos los PEGs de menor peso molecular también presentaron patrones de elución alterados, así como un retardamiento en el perfil electroforético (Figura 23). En el caso del Cyt-bisPEG₃₅₀ se puede observar la presencia de una pequeña banda alrededor de los 28 kDa la cual puede ser el resultado de una dimerización de las diferentes especies de citocromo o bien, a especies en donde el total de los grupos amino del citocromo se encuentran modificados. La dimerización parece ser la opción más viable, debido a que residuos del agente utilizado en la activación del PEG pueden funcionar como agente entrecruzante, llevando a la multimerización de la proteína. En el caso de las preparaciones con PEG₇₅₀ y PEG₂₀₀₀ se observan bandas anchas que sugieren la formación de especies con una amplia distribución de pesos moleculares. El peso molecular de estas especies, estimado a partir de la electroforesis no coincidió con el obtenido a partir del método de TNBS.

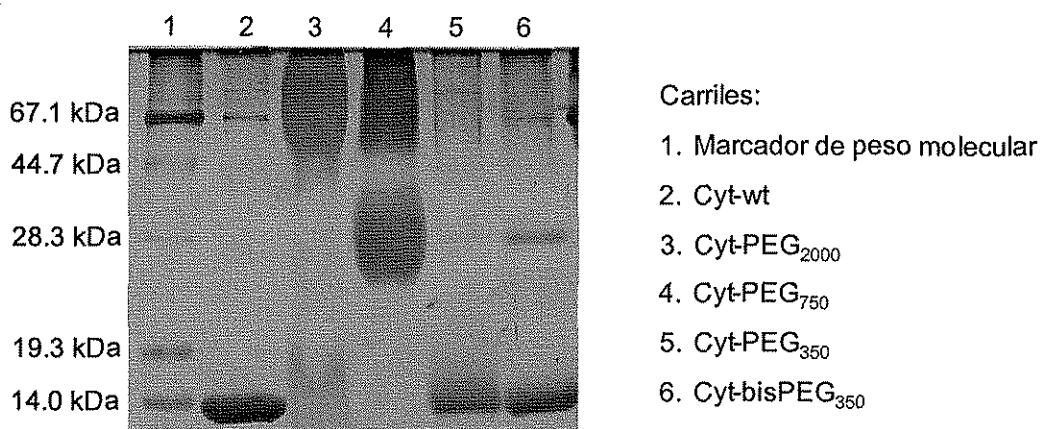


Figura 23. Electroforesis (SDS-PAGE) de los citocromos modificados con PEG de diferente peso molecular. El gel está teñido con plata.

La Tabla 8 presenta las actividades a 30°C y 80°C, así como las constantes de inactivación a 80°C obtenidas para cada una de las preparaciones de citocromo. Las dos preparaciones de

Cyt-PEG₃₅₀ presentaron un bajo porcentaje de modificación, mientras que el grado de modificación obtenido con los polímeros de 750 y 2000 Da fue comparable al del Cyt-PEG₅₀₀₀ (80%). La actividad específica de las preparaciones se incrementó conforme aumentó el peso molecular del PEG y la relación PEG/Cyt hasta valores óptimos de 750 Da y 1.03 respectivamente, mientras que valores superiores a este óptimo provocaron una disminución en la actividad de la proteína. En la molécula de citocromo existen dos lisinas cerca de la cavidad del sitio activo (Lys27 y Lys79) y, debido al alto grado de modificación obtenido, existe la posibilidad de que estos residuos se encuentren modificados. El PEG es una molécula que presenta un alto volumen de exclusión (que es proporcional al peso molecular del polímero), y debido a esto, es muy probable que el polímero esté bloqueando el paso del sustrato al sitio activo y por lo tanto, reduciendo la actividad del biocatalizador. Polímeros de menor peso molecular con un menor volumen de exclusión facilitan el paso del sustrato al sitio activo, reflejándose en una mayor actividad específica. Este efecto también ha sido observado en la actividad de la tripsina modificada con PEGs de diferente peso molecular, donde el incremento en el tamaño del PEG resultó en una disminución de 2 veces en la K_M de la enzima (Gaertner and Puigserver, 1992). Los autores sugieren que este efecto puede ser atribuido a la hidrofiliación de la superficie de la molécula debido a la modificación química. Por otra parte, la actividad de la tripsina-PEG contra sustratos polipeptídicos se vio reducida, fenómeno que fue atribuido a los efectos estéricos ocasionados por la presencia del polímero.

Tabla 8. Actividades específicas y actividad residual después de 7 h a 80°C.

Preparación	g PEG/g Cyt*	Actividad específica (min^{-1})		Actividad residual a 80°C (%)
		30°C	80°C	
Cyt-PEG ₅₀₀₀	6.76	2.77 ± 0.08	0.35 ± 0.002	66.2 ± 1.7
Cyt-PEG ₂₀₀₀	2.79	3.65 ± 0.02	1.44 ± 0.03	102.3 ± 2.7
Cyt-PEG ₇₅₀	1.03	4.58 ± 0.11	1.54 ± 0.03	80 ± 0.7
Cyt- bisPEG ₃₅₀	0.30	1.45 ± 0.09	0.03 ± 0.001	ND
Cyt-PEG ₃₅₀	0.25	0.88 ± 0.013	0.05 ± 0.001	ND
Cyt-wt	-----	0.63 ± 0.17	0.015 ± 0.001	ND

*Valores obtenidos a partir del porcentaje de modificación reportado en la Tabla 7.

ND. No determinado debido a la baja actividad presentada a 80°C

Se determinó la estabilidad a 80°C de los citocromos modificados con PEG de diferente peso molecular en ausencia de sustrato (Tabla 8). En todos los casos la cinética de inactivación se ajustó a un modelo de primer orden. Los citocromos modificados con PEG₃₅₀ presentaron actividad muy baja a 80°C y debido a esto no fue posible hacer un ensayo de estabilidad. Sorprendentemente el citocromo modificado con PEG₂₀₀₀ retuvo completamente su actividad aún después de 7 horas a 80°C, mientras que bajo las mismas condiciones los citocromos modificados con PEG₇₅₀ y PEG₅₀₀₀ fueron menos estables, reteniendo 80% y 66% de actividad respectivamente. Los valores de vida media a 80°C en ausencia de sustrato para los Cyt-PEG₇₅₀ y Cyt-PEG₅₀₀₀ fueron 27 y 14 h respectivamente. La alta movilidad y la capacidad del PEG para enlazar varias moléculas de agua pueden llevar a la formación de una capa protectora de polímero alrededor de la proteína. Esta capa puede estar interaccionado con la superficie de la proteína formando, por un lado, una compleja red de puentes de hidrógeno con los residuos hidrofílicos de la proteína (Gaertner and Puigserver, 1992), y por otra parte, las zonas hidrofóbicas del PEG pueden interaccionar con los residuos hidrofóbicos de la proteína, de tal forma que el efecto neto podría ser una completa protección del contacto con el agua del medio. La suposición de la formación de esta capa protectora alrededor de la superficie de la proteína sugiere que, mientras mayor sea la relación PEG/proteína, mayor será el efecto protector. Esta suposición parece ser correcta hasta un valor de 2.8 g PEG/g Cyt. Estos resultados sugieren que existe una relación polímero/proteína óptima para la actividad y estabilidad del citocromo modificado con PEG. La baja estabilidad obtenida a ambos lados de esta relación óptima puede atribuirse a dos factores: en el caso de relaciones polímero/proteína bajas, a un pobre efecto protector de la capa del polímero ocasionada por la presencia de pocas moléculas del mismo en la superficie de la proteína; mientras que en el caso de relaciones altas, a efectos estéricos entre las moléculas del polímero con alto volumen de exclusión, que pueden llevar a una distorsión de la estructura de la proteína.

A pesar de que estos resultados indicaron claramente que el polímero con un peso molecular de 2000 Da es el mejor agente estabilizante, el trabajo posterior se realizó con la proteína modificada con el polímero de 5000 Da. La razón de esto estriba en que la síntesis de los PEGs de menor peso molecular realizada en el laboratorio implica algunos pasos de purificación del PEG activado que no son 100% eficientes. La incompleta separación de la triazina utilizada para activar al polímero puede resultar en modificaciones no deseadas de la proteína, como la posible dimerización observada en el caso del Cyt-bisPEG₃₅₀, complicando además el análisis de los datos.

6.5. Efecto de la mutación de los residuos adyacentes al sitio activo en la estabilidad del citocromo c de *Saccharomyces cerevisiae* modificado con PEG₅₀₀₀

La estructura cristalina del citocromo c de levadura (γ -Cyt) ya ha sido elucidada a alta resolución (Louie and Brayer, 1990). Esta estructura muestra dos lisinas, Lys79 y Lys27, adyacentes a la cavidad del hemo (Figura 24). La Lys79 está localizada a la entrada del sitio activo y forma puentes de hidrógeno con la Ser47 en el citocromo de levadura o con la Thr47 en el citocromo de corazón de caballo. Bajo condiciones reductoras, este puente de hidrógeno cierra la cavidad del hemo. Por otra parte, la Lys27 forma parte de un "omega-loop" que se mantiene por una red de puentes de hidrógeno. Dicha red está formada por tres puentes de hidrógeno que involucran a átomos del esqueleto polipeptídico entre los residuos Lys27, Gly29 y Cys17, y por un puente de hidrógeno entre las cadenas laterales de la Lys27 y la Leu15. Estudios de mutagénesis sitio dirigida han demostrado que este residuo es crucial para la estabilidad del citocromo de levadura, sustituciones en esta posición por residuos que son incapaces de formar esta red de puentes de hidrógeno producen una proteína menos estable (Louie and Brayer, 1990).

Las lisinas 27 y 79 son las únicas que se encuentran en la cara de la proteína donde se encuentra la apertura del sitio activo (Figura 24). Con el objeto de evaluar el efecto de la modificación en posiciones cercanas al sitio activo, se decidió producir una serie de citocromos de levadura mutantes buscando dejar la cara de la proteína más cercana al sitio activo libre de lisinas y libre de PEG, evaluando sus efectos sobre la actividad y estabilidad de estas proteínas. Para tal efecto se expresaron en *E. coli* y se purificaron seis citocromos *c* de levadura mutantes en los cuales los residuos 27 y 79 fueron substituidos por alanina o treonina. Estos residuos no son susceptibles de modificarse químicamente con PEG. Cabe aclarar que, a pesar de que el citocromo *c* de corazón de caballo es una proteína ampliamente estudiada, no se cuenta con el gene que codifica para esta proteína. Sin embargo, debido a la alta homología existente entre la familia de los citocromos (Louie and Brayer, 1990) se decidió utilizar al citocromo *c* de levadura. El gene parental contenía inicialmente tres mutaciones, T-5A, Y97F y C102T. Esta última mutación evita la dimerización de la proteína. Todos los citocromos mutantes fueron purificados a homogeneidad, como fue confirmado por geles de SDS-PAGE teñidos con azul de coomasie y nitrato de plata. Los valores de *Rz* (relación de la absorbancia del Soret a 410 nm y la absorbancia de los grupos aromáticos a 280 nm) oscilaron entre 4.8 y 5.4, indicando una alta pureza de las proteínas mutantes. Los citocromos mutantes fueron modificados con PEG₅₀₀₀. La caracterización en términos de las mutaciones, la relación g PEG/g Cyt y la actividad contra pireno se muestran en la Tabla 9. Cabe aclarar que el citocromo *c* de levadura sólo posee 16 lisinas en comparación de las 19 que presenta su homólogo de corazón de caballo y debido a ésto, se esperaba que los valores de la relación g PEG/g Cyt fueran menores que los obtenidos anteriormente para el citocromo de corazón de caballo modificado con PEG₅₀₀₀. Independientemente del número de aminos libres presentes en cada una de las mutantes, la relación PEG/proteína se mantuvo relativamente constante (en promedio 4.3 ± 0.6 g PEG/g Cyt). Esto es importante ya que los efectos obtenidos con la modificación química pueden ser

atribuidos directamente a la posición donde ocurre la modificación y no a un diferente grado de modificación.

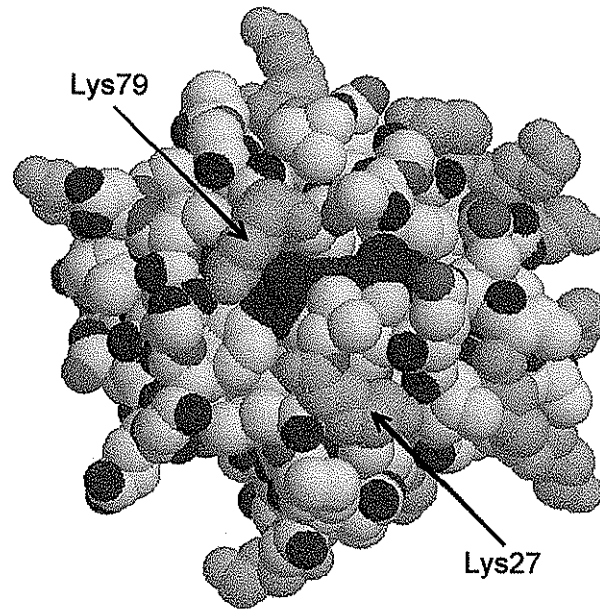


Figura 24. Estructura del citocromo *c* de levadura. Las lisinas se muestran en color anaranjado. Nótese que las lisinas 27 y 79 son las únicas que se encuentran en la cara de la proteína que tiene expuesto al hemo.

La Tabla 9 también muestra que las mutantes no modificadas prácticamente no presentaron actividad a 70°C, mientras que la modificación con PEG₅₀₀₀ incrementó significativamente la actividad de las proteínas contra pireno. A pesar de que existe una alta homología entre la familia de los citocromos, se ha reportado que el citocromo *c* de levadura presenta una estabilidad menor en comparación a su homólogo de corazón de caballo, con una T_m entre 52.3°C y 54.2°C (Nall, 1996), esto es, cerca de 20°C menor a la de los citocromos de mamíferos (Endo *et al.*, 1985). La ausencia de actividad a 70°C de las mutantes no modificadas, confirma este comportamiento.

Otro resultado que confirma el efecto favorable de la modificación química con PEG sobre la actividad de las proteínas es el hecho de que las mutantes no modificadas fueron

completamente inactivas a 70°C mientras que las mutantes modificadas presentaron, en términos generales, entre un 20% y 30% de la actividad mostrada a 30°C. Esto sugiere que el perfil de actividades de estas proteínas se alteró como resultado de la modificación química. El citocromo comercial (sigma) modificado sólo se utilizó como control interno. Este citocromo es un dímero que se encuentra unido mediante un puente disulfuro entre los residuos C102 de cada monómero y debido a esta característica no puede ser comparado directamente con las mutantes. Sin embargo, es importante hacer notar que la actividad mostrada por éste dímero modificado a 70°C fue mayor que su actividad a 30°C. Este comportamiento puede ser atribuido directamente a la modificación con PEG ya que el citocromo comercial no modificado no presentó actividad a 70°C.

Tabla 9. Grado de modificación y actividad específica contra pireno de los citocromos *c* de levadura mutantes.

Citocromo	g PEG/g Cyt	Actividad específica (min ⁻¹)	
		30 °C	70 °C
y-Cyt(sigma) ^a	-----	0.35 ± 0.002	N. R.
y-Cyt(parental) ^b	-----	0.81 ± 0.002	0.018 ± 0.0002
y-Cyt(K27A)	-----	0.64 ± 0.01	N. R.
y-Cyt(K79A)	-----	1.13 ± 0.03	N. R.
y-Cyt(K79T)	-----	0.73 ± 0.006	N. R.
y-Cyt(K27A, K79A)	-----	0.86 ± 0.03	N. R.
y-Cyt(K27A, K79T)	-----	0.53 ± 0.006	N. R.
y-Cyt(sigma)-PEG	5.68	0.85 ± 0.01	0.95 ± 0.08
y-Cyt-(parental)-PEG	4.05	2.17 ± 0.02	0.73 ± 0.01
y-Cyt(K27A)-PEG	4.54	2.12 ± 0.13	0.66 ± 0.01
y-Cyt(K79A)-PEG	4.11	2.15 ± 0.04	0.47 ± 0.01
y-Cyt(K79T)-PEG	4.11	2.32 ± 0.14	0.48 ± 0.01
y-Cyt(K27A, K79A)-PEG	3.85	2.06 ± 0.05	0.56 ± 0.01
y-Cyt(K27A, K79T)-PEG	3.57	1.70 ± 0.03	0.41 ± 0.01

^aCitocromo de levadura comercial (dímero).

^bEl citocromo parental contiene las siguientes mutaciones T-5A, Y97F, C102T.
N.R. No hubo reacción.

Por otra parte, la modificación química también presentó un efecto importante sobre la estabilidad (expresada como porcentaje de la actividad inicial a 70°C) de las proteínas mutantes

(Figura 25). La proteína γ -Cyt(parental)-PEG perdió cerca del 30% de su actividad, siendo similar al comportamiento observado para la proteína comercial. Esto permite sugerir que las mutaciones presentadas en la proteína parental no tienen efecto alguno en la estabilidad de este citocromo, descartando también la participación de estas sustituciones en la estabilidad de las mutantes. Por otra parte, la mutante γ -Cyt(K27A)-PEG sólo retuvo el 54% de su actividad inicial a 70°C, mientras que las mutantes sencillas K79A, K79A y la doble mutante (K27A, K79A) resultaron ser completamente estables como resultado de la modificación con PEG, manteniendo 100% de la actividad inicial a 70°C. Interesantemente, la presencia de la mutación K27A en la doble mutante (K27A, K79A) no suprimió el efecto estabilizante de la mutación K79A. Por otra parte, la doble mutante (K27A, K79T) modificada no siguió el mismo comportamiento observado para la otra doble mutante, resultando en una pérdida de actividad del 50% después de la incubación a 70°C. Las razones de este comportamiento no son claras, sin embargo es importante señalar que fue la mutante que presentó menor actividad a 70°C y la menor relación PEG/Cyt (Tabla 9). Nuestros resultados sugieren que la ausencia de polímero en el residuo 79, así como la modificación de la lisina 27 son cruciales para obtener una alta estabilidad.

Xu *et al.* han sugerido que el desplegamiento del citocromo es un proceso secuencial que se produce por la presencia de varias subunidades estructurales en la molécula, cada una de éstas con diferentes estabildades (Xu *et al.*, 1998). La subunidad menos estable comprende el "loop" que une a la hélice formada por los residuos 60 a 70 con la hélice del extremo carboxilo terminal. En esta subunidad están localizados la Lys79 y el ligando axial Met80. Existen evidencias que indican que el rompimiento de la interacción axial entre el fierro del hemo y el grupo sulfidrilo de la Met80 provoca la apertura de la cavidad del hemo (Kaminsky *et al.*, 1973). Es posible que la modificación del residuo 79 con un polímero que presenta un alto volumen de exclusión esté alterando la conformación del "loop", provocando con esto la pérdida de la ligación axial y, como consecuencia final, la inestabilidad de la proteína. Por otra parte, la lisina

27 se encuentra ubicada en la segunda subunidad más estable en la molécula de citocromo (Xu *et al.*, 1998). La modificación química sin duda provoca la pérdida del puente de hidrógeno formado entre las cadenas laterales de este residuo y la leucina 15, sin embargo, a juzgar por los resultados obtenidos, la pérdida de esta interacción está compensada por el efecto estabilizante ocasionado por la presencia del polímero.

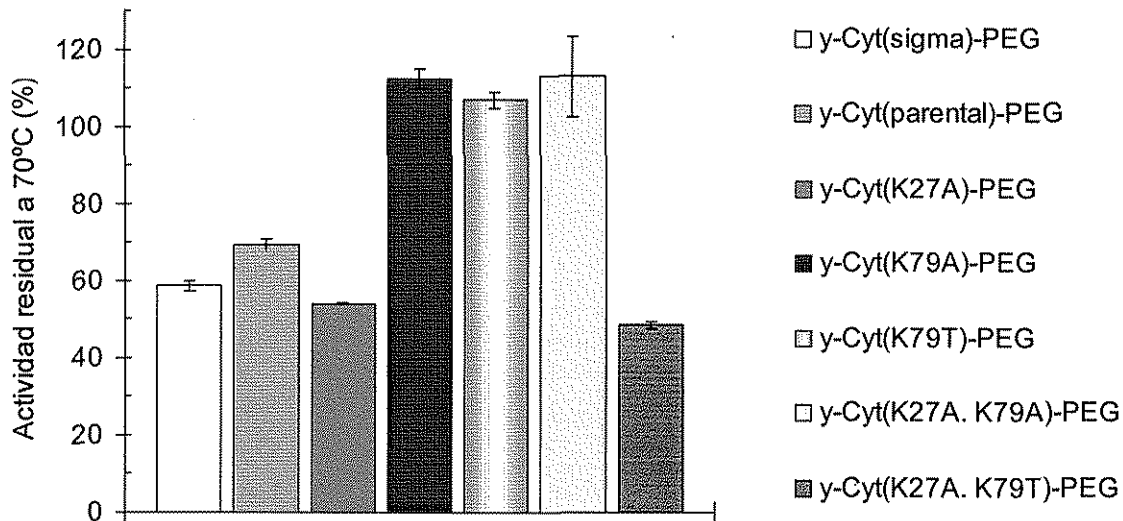


Figura 25. Estabilidad de las proteínas mutantes a 70°C. Las distintas preparaciones fueron sometidas a una incubación por 5 h a 70°C y se determinó su actividad residual a la misma temperatura utilizando pireno como sustrato. La actividad residual se expresa como el porcentaje de la actividad inicial a 70°C.

6.6. Evaluación por dicroísmo circular de la estructura secundaria del citocromo c de corazón de caballo modificado con PEG₅₀₀₀

Existen pocos reportes en la literatura que se centren en el estudio estructural de proteínas modificadas químicamente. Con el objetivo de evaluar el efecto de la modificación química sobre las características estructurales del citocromo c nos enfocamos en sus características espectroscópicas. El dicroísmo circular es una técnica que se ha utilizado habitualmente para evaluar el contenido de α -hélices en proteínas (Wright *et al.*, 1986; Greenfield, 1996) y es una herramienta útil en el estudio estructural del citocromo y de hemoproteínas (Myer, 1978; Woody,

1995). El citocromo es una proteína compacta de 104 aminoácidos que presenta un contenido de α -hélices superior al 30% (Ahmad *et al.*, 2000). La Figura 26 presenta los espectros de dicroísmo circular de las preparaciones de citocromo obtenidos bajo diferentes tiempos de incubación a 80°C. El espectro de dicroísmo circular del Cyt-wt muestra las características típicas de un espectro de una proteína rica en α -hélices, con mínimos marcados a los 222 nm y 210 nm. Cuando esta proteína es calentada por 10 minutos a 80°C se observa una drástica pérdida de elipticidad a 222 nm y un desplazamiento de la señal hacia los 200 nm. Esto indica una pérdida notable de la estructura secundaria de la proteína y explica la baja actividad observada a altas temperaturas. Por otra parte, los espectros del Cyt-PEG₅₀₀₀ mostraron un aumento considerable en la relación ruido/señal. Tasaki (1996) ha demostrado, a través de simulaciones de dinámica molecular, que el PEG en solución puede llegar a tomar conformaciones helicoidales que se mantienen por medio de la estructuración de una red de puentes de hidrógeno formados entre el PEG, el agua y entre las mismas moléculas de agua que actúan como solvente. Cabe hacer notar que se corrieron experimentos control en presencia de diferentes concentraciones de mPEG₅₀₀₀ para evaluar cualquier posible contribución del polímero a la elipticidad, sin embargo, ninguno de los controles ensayados presentó señal significativa. Esto sugirió que la dispersión que se observó en los espectros se debe únicamente a la modificación química del citocromo. Interesantemente los espectros del Cyt-PEG₅₀₀₀ mostraron desplazamientos de los mínimos observados a 222 nm y 210 nm hacia longitudes de onda menores, sugiriendo que la modificación química alteró la estructura secundaria de la proteína. Se observó una ligera pérdida de señal a 222 nm durante los 10 primeros minutos de incubación a 80°C, después de la cual, los espectros se mantuvieron sin cambio aún después de 24 h a 80°C. Estos resultados sugieren que, aunque la modificación química con PEG₅₀₀₀ altera la estructura secundaria nativa de la proteína, la nueva conformación producida por efecto de la modificación se conserva aún durante la incubación

intensiva a 80°C. Esta nueva conformación puede ser la responsable de la actividad encontrada a alta temperatura.

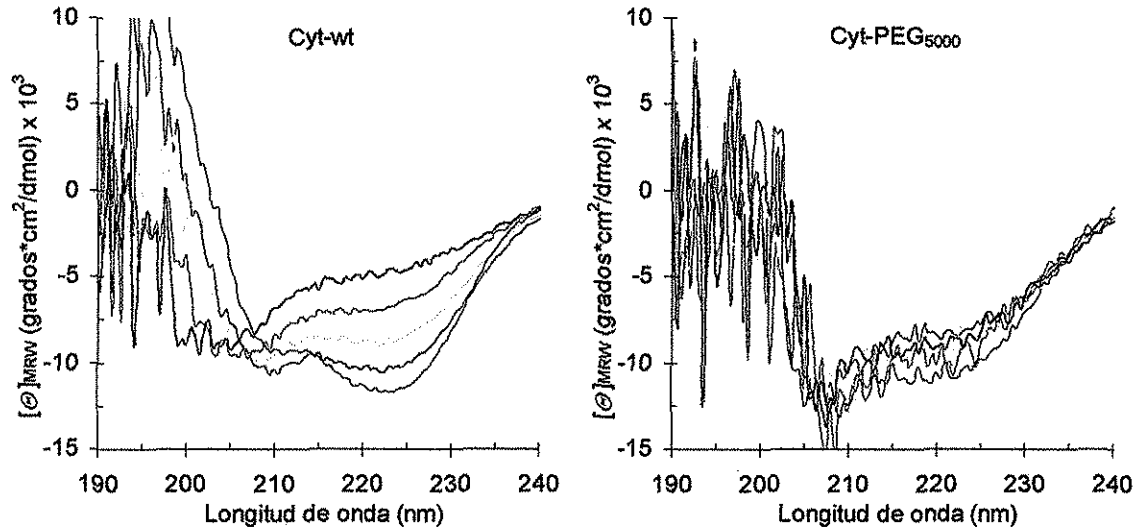


Figura 26. Espectros de dicroísmo circular del Cyt-wt y del Cyt-PEG₅₀₀₀. Las proteínas se disolvieron en amortiguador de fosfatos y se incubaron bajo las siguientes condiciones: 10 min a 30°C (—); 10 min a 80°C (---); 7 h a 80°C (····); 24 h a 80°C (-·-·-); 24 h a 80°C, seguido de enfriamiento hasta 30°C (— — —).

La Figura 27 presenta el perfil de desnaturalización térmica de las preparaciones de citocromo. Este perfil se obtuvo mediante el seguimiento de la pérdida de la señal a 222 nm a diferentes temperaturas. La conformación nativa de una proteína está estabilizada por diversas interacciones (puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, etc.), cuando existe alguna perturbación en el medio, la fuerza de estas interacciones tiende a disminuir. Esto provoca que las interacciones se rompan y la proteína se despliegue. Si el rompimiento de estas interacciones es simultáneo, se considera que el proceso es cooperativo, por el contrario, si las interacciones se pierden de manera secuencial, el proceso es poco cooperativo. Es posible estimar la magnitud de la cooperatividad de un proceso de desnaturalización a partir de la pendiente que presenta una curva de la fracción desnaturalizada (F_d) en la zona de transición (Figura 27). La zona de transición describe el equilibrio existente entre las diversas poblaciones

de moléculas con conformaciones nativa, intermediaria(s) o desplegadas. En esta zona también es posible determinar el parámetro T_m , el cual por definición corresponde a la temperatura en la cual el valor de F_d es igual a 0.5 (y por lo tanto el valor de la constante de equilibrio es 1). Los valores de F_d mostrados en la Figura 27 para las dos proteínas fueron determinados de acuerdo a la ecuación (1), descrita en Materiales y Métodos (inciso 5.14). El Cyt-wt presentó una marcada línea base del estado nativo y su transición fue muy cooperativa. El perfil de desnaturalización sugirió una transición de dos estados. La temperatura media de desnaturalización (T_m) estimada para la transición de este citocromo fue de 85.8 °C. Un comportamiento similar ha sido observado por otros autores para citocromos obtenidos de diferentes fuentes, sin embargo es importante mencionar que la T_m obtenida en este trabajo es aproximadamente 6°C mayor que la observado por Endo *et al.* (Endo *et al.*, 1985). Por otra parte, el Cyt-PEG₅₀₀₀ mostró una transición poco cooperativa, caracterizada por la ausencia clara de líneas bases para ambos estados, nativo y desnaturalizado. La ausencia de una línea base nativa sugiere que la estructura de la proteína se encuentra en un estado inicial alterado como resultado de la modificación, confirmando los datos obtenidos anteriormente. La poca cooperatividad sugiere la presencia de un estado intermediario, indicando también que la desnaturalización no se ajustó a un modelo de dos estados. La T_m encontrada para esta preparación fue 48°C, esto es 38°C menos que la obtenida para el citocromo no modificado. Estos resultados contrastan con los datos iniciales en los que se observa una mayor conservación de estructura secundaria en el citocromo modificado. Es posible, por tanto, que la transición que se observa en el Cyt-PEG₅₀₀₀ sea un cambio menor al nivel de estructura, involucrando un intermediario estable que se mantiene aún a temperaturas superiores a 80°C; si esta suposición es cierta, se esperaría una segunda transición a temperaturas superiores a los 100°C, en donde ésta segunda transición correspondería a una desnaturalización completa del citocromo modificado. Desafortunadamente, las características del equipo no nos permitieron seguir el perfil de desplegamiento a temperaturas superiores a los 100°C por lo que

se consideró que una manera de solventar este problema era realizar la desnaturalización con agentes desnaturalizantes.

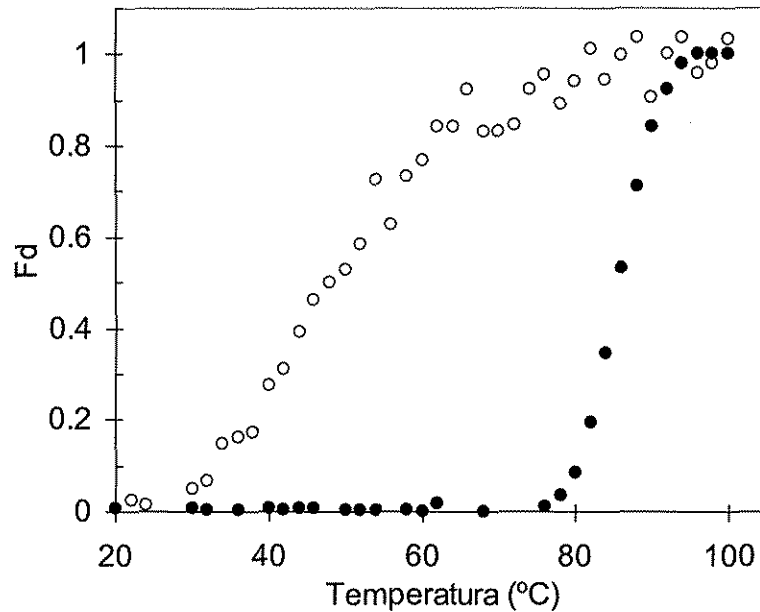


Figura 27. Perfil de desnaturalización térmica del citocromo c de corazón de caballo seguido por dicroísmo circular a 222 nm. Cyt-wt (●); Cyt-PEG₅₀₀₀ (○).

6.7. Desnaturalización del citocromo en presencia de hidrocloreuro de guanidina

El perfil de actividades del citocromo contra pireno en presencia de GuHCl se muestra en la Figura 28. Las actividades se encuentran en el mismo orden de magnitud que las obtenidas en función de la temperatura. El citocromo modificado fue más activo contra pireno que el Cyt-wt a todas las concentraciones de GuHCl ensayadas. Un aspecto importante es que el comportamiento mostrado por ambas preparaciones en presencia de GuHCl fue similar al perfil de actividades obtenido en función de la temperatura (Figura 17B).

Los mecanismos de desnaturalización de proteínas por temperatura y agentes químicos han sido revisados previamente (Vanzi *et al.*, 1998). El incremento en la temperatura tiende a disminuir la fuerza de las interacciones que se encuentran bajo control entálpico (puentes de

hidrógeno, interacciones de van der Waals e interacciones electrostáticas entre otras), mientras que la fuerza de las interacciones que se encuentran bajo control entrópico (interacciones hidrofóbicas principalmente) se ve incrementada. Conforme se incrementa la temperatura, la fuerza de las interacciones hidrofóbicas llega a ser máxima en el intervalo entre 60°C a 80°C, sin embargo, si la temperatura aumenta hacia los 100°C la fuerza de las interacciones hidrofóbicas sufre una reducción repentina. El resultado neto del efecto de la temperatura sobre las interacciones controladas entálpica o entrópicamente, es que el proceso de desnaturalización ocurre en el intervalo de los 60°C a 80°C para un gran número de proteínas. Por otra parte, el mecanismo de desnaturalización por agentes químicos como la guanidina o la urea no es bien conocido, sin embargo, se han propuesto dos mecanismos principales. El primero sugiere que la presencia del desnaturalizante altera la estructura de la red de puentes de hidrógeno que hidrata a la proteína, favoreciendo con esto una mayor exposición de los residuos hidrofóbicos desde el interior de la proteína. El segundo mecanismo sugiere que el agente desnaturalizante tiene la capacidad de unirse preferencialmente con las cadenas laterales no polares de los aminoácidos que se encuentran en el interior de la proteína. El resultado final de ambos mecanismos es que el efecto desnaturalizante de los agentes químicos se debe a la debilitación general de las interacciones hidrofóbicas que mantienen a la proteína en su conformación plegada (Vanzi *et al.*, 1998).

La comparación de los perfiles de actividad de las preparaciones de citocromo obtenidos en función de la temperatura (Figura 17B) o en función de la concentración de GuHCl (Figura 28), sugiere que el perfil de actividad del citocromo es independiente del mecanismo de desnaturalización por temperatura o agentes químicos.

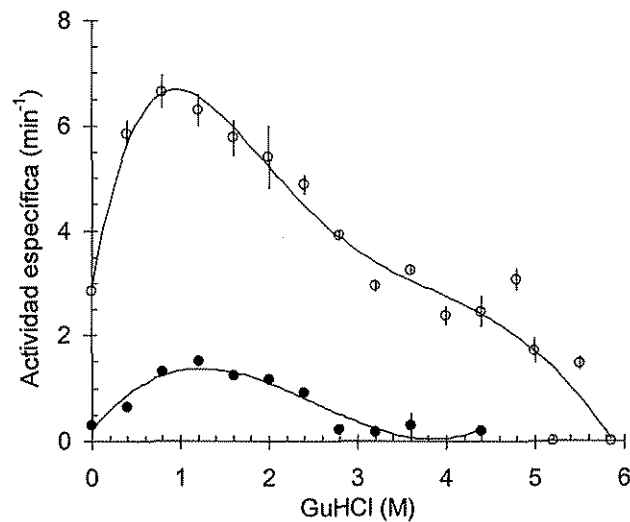


Figura 28. Perfil de actividades del citocromo *c* en presencia de hidrocloreto de guanidina (GuHCl). La actividad se midió utilizando pireno como sustrato. Cyt-wt (●); Cyt-PEG₅₀₀₀ (○).

Existen numerosos reportes que se han enfocado a la evaluación de la desnaturalización del citocromo *c* con agentes químicos (Kaminsky *et al.*, 1973; Tsong, 1973; Saito and Wada, 1983; Schejter *et al.*, 1992). Se ha considerado que la desnaturalización del citocromo *c* con GuHCl procede como una transición de dos estados (Puett, 1973), mientras que la desnaturalización con urea procede al menos por dos intermediarios (Myer *et al.*, 1980). Uno de los estados intermediarios identificados puede estar relacionado con el rompimiento de la interacción axial entre el hierro del hemo y la metionina 80, mientras que el segundo intermediario no se ha identificado claramente (Saito and Wada, 1983). Adicionalmente, se han reportado al menos tres estados intermediarios que resultan a partir del desplegamiento cooperativo de una o más de las cuatro subunidades que se han identificado dentro de la molécula de citocromo (Xu *et al.*, 1998). En nuestro trabajo se llevó a cabo la desnaturalización química de las preparaciones de citocromo *c* de corazón de caballo con GuHCl. El proceso de desnaturalización se siguió a través de la variación en el centro de masas (fluorescencia), por la pérdida de elipticidad a 222 nm (dicroísmo circular) y por la pérdida de actividad específica (Figura 29). La desnaturalización fue completamente reversible en ambos casos. El perfil de desnaturalización del Cyt-wt mostró

una transición bastante cooperativa entre 1.8 M y 2.8 M de GuHCl, similar a la observada en el desplegamiento por temperatura (ver la Figura 27). La desnaturalización de esta proteína fue ajustada a un modelo de dos estados. Es importante notar que la pérdida de actividad es un fenómeno que no está completamente acoplado a la pérdida de estructura secundaria o terciaria de la proteína no modificada, como puede observarse a partir de la no coincidencia de las curvas correspondientes a bajas concentraciones de GuHCl (Figura 29). Por otra parte, la desnaturalización del Cyt-PEG₅₀₀₀ presentó una menor cooperatividad y la inflexión que aparece en la zona de transición permite sugerir que la desnaturalización del Cyt-PEG₅₀₀₀ ocurre a través de un estado intermediario. El ajuste de los datos a un modelo de tres estados señaló dos transiciones ocurriendo, la primera entre 0.6 M y 2.2 M de GuHCl, y la segunda entre 3.4 M y 4.8 M GuHCl. La pérdida de actividad se mantuvo fuertemente acoplada a la pérdida de estructura secundaria y terciaria. El estado intermediario encontrado entre las dos transiciones puede ser el responsable de la actividad presentada a altas concentraciones de desnaturalizante y a altas temperaturas.

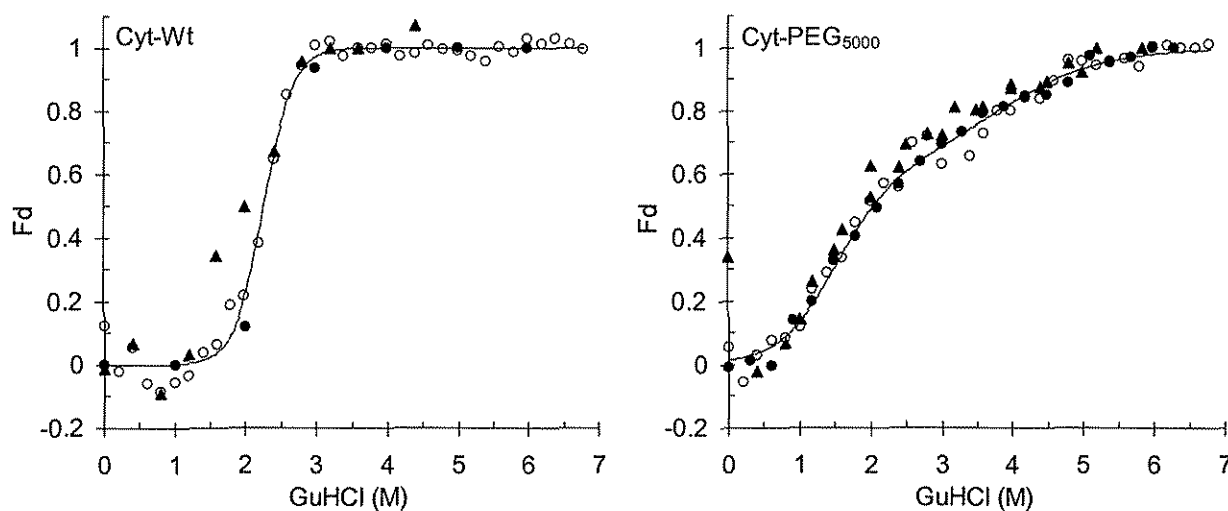


Figura 29. Curvas de desnaturalización al equilibrio de las preparaciones de citocromo *c* en función de la concentración de GuHCl. El proceso fue seguido por fluorescencia (\circ); elipticidad a 222 nm (\bullet) y actividad específica (\blacktriangle). El símbolo (—) denota el ajuste a un modelo de dos estados para el Cyt-wt y de tres estados para el Cyt-PEG₅₀₀₀. Los coeficientes de correlación estimados para el ajuste del modelo a los datos experimentales globales fueron 0.95 para el Cyt-wt y 0.999 para el Cyt-PEG₅₀₀₀.

6.8. Determinación de los parámetros termodinámicos

Los parámetros termodinámicos de la desnaturalización de las preparaciones de citocromo se calcularon a partir del ajuste de los datos a un modelo de dos estados para el Cyt-wt y de un modelo de tres estados para el Cyt-PEG₅₀₀₀ como se describe en Materiales y Métodos. Para esto, se hizo un análisis global con los datos obtenidos por fluorescencia y dicroísmo circular, asumiendo que las dos técnicas siguen el mismo proceso de desplegamiento. Los datos obtenidos se resumen en la Tabla 10. Los valores de los parámetros obtenidos para el Cyt-wt son bastante cercanos a los obtenidos por Saito, *et al.* quienes reportan valores de $\Delta G_{ND}^{\circ}(H_2O)$ de 7.27 kcal/mol, $[GuHCl]_{1/2ND}$ de 2.42 M y una cooperatividad, m_{ND} , de 3.01 kcal/mol/M (Saito and Wada, 1983). Por otra parte, el valor de $\Delta G_{ND}^{\circ}(H_2O)$ global del Cyt-PEG₅₀₀₀ fue menor al presentado por el Cyt-wt ($\Delta \Delta G_{ND}^{\circ}(H_2O)$ de 1.36 kcal/mol), indicando una menor estabilidad termodinámica de la proteína modificada. Los parámetros de cooperatividad, m_{NI} y m_{ID} , del Cyt-PEG₅₀₀₀ fueron menores en las dos transiciones presentadas por esta proteína que los obtenidos para el Cyt-wt. El parámetro Z_i indica el valor de F_d que corresponde a la aparición del estado intermediario. Este valor puede ser localizado gráficamente en la curva de desplegamiento del Cyt-PEG₅₀₀₀ en donde corresponde a la inflexión de la curva observada a una concentración de 2.37 M de GuHCl (Figura 29).

Estos resultados indican claramente que el citocromo modificado es menos estable termodinámicamente que el citocromo no modificado. Sin embargo, no explican la mayor conservación de estructura secundaria ni el comportamiento observado a altas temperaturas, en donde se demuestra que el Cyt-PEG₅₀₀₀ presenta actividad en condiciones en las que el Cyt-wt es prácticamente inactivo. Para encontrar una explicación a este fenómeno se decidió evaluar los efectos de la modificación sobre la estructura del sitio activo de la proteína.

Tabla 10. Parámetros termodinámicos de la desnaturalización del citocromo *c* de corazón de caballo a 25°C.^a

Parámetro ^b	Cyt-wt ^c	Parámetro ^b	Cyt-PEG ₅₀₀₀ ^d
$\Delta G_{ND}^{\circ}(\text{H}_2\text{O})$ (kcal/mol)	6.4 ± 0.8	$\Delta G_{NI}^{\circ}(\text{H}_2\text{O})$ (kcal/mol)	2.19 ± 0.15
m_{ND} (kcal/mol/M)	2.83 ± 0.34	m_{NI} (kcal/mol/M)	1.45 ± 0.14
$[\text{GuHCl}]_{1/2ND}$ (M)	2.27	$\Delta G_{ID}^{\circ}(\text{H}_2\text{O})$ (kcal/mol)	2.85 ± 0.55
		m_{ID} (kcal/mol/M)	0.76 ± 0.09
		Z_I	0.58 ± 0.08
		$\Delta G_{ND}^{\circ}(\text{H}_2\text{O})$ (kcal/mol)	5.04 ± 0.6
		$[\text{GuHCl}]_{1/2NI}$ (M)	1.51
		$[\text{GuHCl}]_{1/2ID}$ (M)	3.75

^aLos subíndices indican las siguientes transiciones: *ND*, estado nativo a estado desnaturalizado; *NI*, estado nativo a estado intermediario; *ID*, estado intermediario a estado desplegado.

^bLos parámetros se calcularon como se describe en Materiales y Métodos (inciso 5.14)

^cLos datos se calcularon asumiendo el modelo de dos estados $N \leftrightarrow D$.

^dLos datos se calcularon asumiendo el modelo de tres estados $N \leftrightarrow I \leftrightarrow D$.

6.9. Evaluación de la estructura del sitio activo del citocromo *c*

Se evaluó la conservación de la estructura alrededor del sitio activo mediante espectrofotometría UV-Visible y dicroísmo circular. La presencia del grupo hemo en la molécula de citocromo *c* provoca la presencia de diferentes bandas de absorción (ver Figura 7). La banda de absorción del Soret (410 nm) y las bandas α y β (520 y 550 nm respectivamente) reflejan el estado de *spin* del átomo de hierro de la porfirina y pueden ser utilizadas para obtener información sobre la estructura terciaria de la cavidad del hemo, así como para estimar su estado de coordinación, (Nall, 1996; Ahmad *et al.*, 2000). Por otro lado, la banda de absorción a 695 nm muestra la coordinación de la Met80 al átomo de hierro del hemo y los cambios de absorción a esta longitud de onda proporcionan información acerca de eventos moleculares fuertemente acoplados que incluyen ligación de la Met80, apertura de la cavidad del hemo y desplegamiento global de la proteína (Nall, 1996). Los espectros UV-Vis y de dicroísmo circular de los citocromos modificado y no modificado obtenidos después de diferentes tiempos de incubación a 80°C se muestran en los paneles superiores de la Figura 30. A través de este

análisis es posible observar la disminución en la banda Soret del Cyt-wt cuando esta proteína es incubada por 7 horas a 80°C, indicando con esto una alteración de la cavidad del hemo. La señal del Soret no se recuperó aún cuando la muestra fue enfriada a 30°C. Esto puede deberse a fenómenos de agregación, lo cual es muy común cuando la concentración de proteína es suficientemente elevada. Por el contrario, el espectro del Cyt-PEG₅₀₀₀ no sufre un cambio notable aún después de 7 horas a 80°C, sugiriendo una mayor conservación de la cavidad del sitio activo.

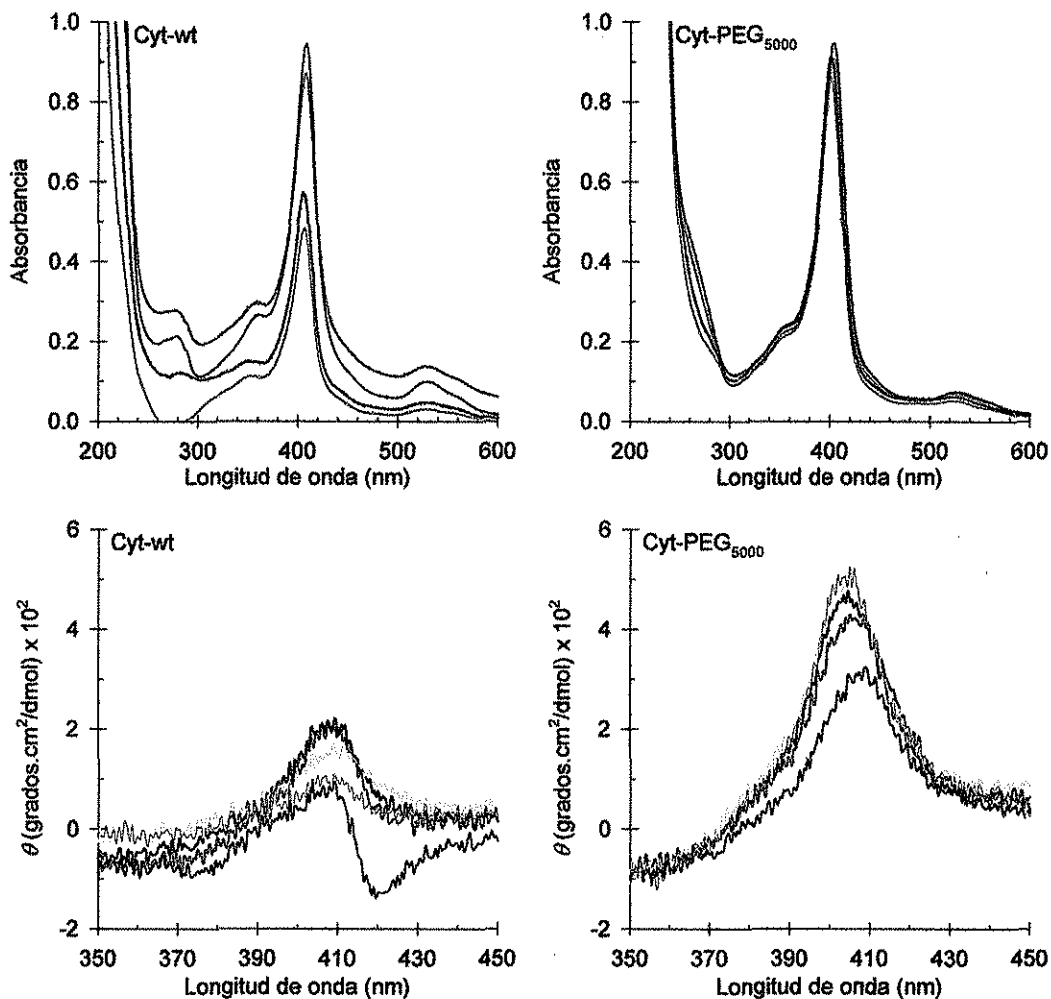


Figura 30. Espectros UV-Visible y de dicroísmo circular del Cyt-wt y del Cyt-PEG₅₀₀₀ en la región del Soret (sitio activo). Las proteínas se disolvieron en amortiguador de fosfatos y se incubaron bajo las siguientes condiciones: 10 min a 30°C (—); 10 min a 80°C (---); 7 h a 80°C (····); 7 h a 80°C, seguido de enfriamiento hasta 30°C (-.-.-); 24 h a 80°C (— — —); 24 h a 80°C, seguido de enfriamiento hasta 30°C (— — —).

Los paneles inferiores de la Figura 30 muestran los espectros de dicroísmo circular de los sitios activos de las preparaciones de citocromo. El espectro del Cyt-wt a 30°C presenta bandas características a 410 nm y 418 nm. Myer (1978) ha establecido que la banda a 418 nm refleja las interacciones entre el hemo y la cadena polipeptídica y por lo tanto es una medida directa de la integridad de la cavidad del hemo. Cuando el Cyt-wt se calienta a 80°C la banda a 418 nm se pierde, y es posible observar un incremento inicial de la señal a 410 nm durante las primeras 7 horas de incubación. Sin embargo, el espectro obtenido después de 24 horas demuestra una ligera tendencia a disminuir la señal a 410 nm. Las características generales del espectro no fueron recuperadas aún cuando la muestra se enfrió a 30°C. Estos cambios sugieren una posible apertura del sitio activo y, por tanto, la inactivación de la proteína a 80°C. Por otro lado, el espectro del Cyt-PEG₅₀₀₀ indica que la modificación química por sí misma altera la estructura de la cavidad del hemo, como lo confirma la ausencia de la banda a 418 nm. También se observa un incremento notable de la señal durante los primeros 10 minutos de incubación a 80°C, después de lo cual el espectro de la proteína ya no sufre cambios significativos. El incremento de la señal a 410 nm sugiere una mayor estructuración de la cavidad del hemo. Esta estructuración puede dar lugar a la formación del estado intermediario observado en el perfil de desnaturalización con GuHCl y puede ser el responsable de la actividad observada a altas temperaturas y a altas concentraciones de solvente orgánico. Existen evidencias adicionales que soportan esta hipótesis. Por un lado, la banda Soret de la proteína modificada se ve desplazada hacia el UV, los máximos de absorción se observan a 402 y 410 nm para el Cyt-PEG₅₀₀₀ y el Cyt-wt respectivamente, lo que sugiere una mayor exposición del grupo hemo hacia el solvente, y por otra parte la banda de absorción a 695 nm está ausente en la proteína modificada. Como se discutió anteriormente, esta banda refleja el estado de coordinación del hierro del hemo con la Met80 y su presencia es una medida de la integridad del sitio activo. Trabajos previos han demostrado que la doble modificación química del citocromo induce la pérdida de la coordinación axial, la Met80 es desplazada como ligando axial por una molécula

de agua y este proceso deja un hemo en estado pentacoordinado altamente reactivo (Busi *et al.*, 1999). La aparición de esta especie altamente reactiva explica en parte la mayor actividad de la proteína modificada con polietilén glicol.

Russell *et al.* (2000) han demostrado a través de espectroscopia de resonancia magnética nuclear que la forma oxidada del citocromo *c* puede sufrir la sustitución del ligando axial met80 por uno o más ligandos no nativos. Una de las formas no nativas es un intermediario que aparece durante el desplegamiento bajo condiciones parcialmente desnaturalizantes y ha sido atribuida al remplazo de la Met80 por una o más cadenas laterales de lisinas. Sin embargo, esta forma presenta valores de ΔG° de transición del estado nativo al estado intermediario similares a los de la forma nativa (~ 4.1 kcal/mol), sugiriendo que la aparición de esta forma ocurre sin una disrupción notable de la estructura nativa de la proteína. La segunda forma no nativa aparece bajo condiciones fuertemente desnaturalizantes y consiste en la sustitución de la Met80 por una histidina, dejando una molécula de citocromo *c* con una ligación hemo-bisHis. Esta especie presenta valores de ΔG° de transición de 11.2 kcal/mol y representa una forma desnaturalizada del citocromo *c* que mantiene contactos bien definidos entre el hemo, la His18 y la histidina que aparece como nuevo ligando axial. Partiendo de estos datos, y asumiendo que las lisinas del Cyt-PEG₅₀₀₀ no pueden substituir a la Met80 como ligandos axiales debido a que están modificadas, es posible que el estado intermediario observado en nuestro trabajo para el Cyt-PEG₅₀₀₀, corresponda a la forma hemo-bisHis observada en los trabajos de Russell *et al.*

Por otra parte, se evaluó también la estabilidad a 80°C de la banda Soret en las preparaciones de citocromo por medio de espectrofotometría visible, midiendo el cambio en absorbancia en la banda Soret del citocromo en función del tiempo de incubación a 80°C (Figura 31). En la proteína no modificada, la disminución en la absorbancia de la banda Soret se ajustó a una cinética bifásica con una vida media calculada de 38 horas, mientras que la cinética del Cyt-PEG₅₀₀₀ siguió un modelo lineal con una vida media de 165 horas, esto es, un incremento de alrededor de 4 veces en la vida media del sitio activo como resultado de la

modificación química. La reducción de la absorbancia de la banda Soret como resultado de la exposición de la proteína a altas temperaturas indica una modificación en el microambiente del hemo que puede provocar la apertura del sitio activo y la inactivación de la proteína. Estos resultados indican que la velocidad de desplegamiento del sitio activo es menor en la proteína modificada que en la no modificada. Por lo tanto, es posible que la presencia del polímero en el microambiente de la proteína esté actuando como una barrera durante el desplegamiento del citocromo, dando lugar a la formación de un intermediario que presenta una mayor conservación del sitio activo y que además, es catalíticamente activo. En otras palabras, la modificación química produce una proteína cinéticamente más estable, en la cual la barrera energética para alcanzar el estado de transición durante el desplegamiento es más alta. Esto provoca que la velocidad de desplegamiento de la proteína modificada sea más lenta en comparación con la proteína no modificada.

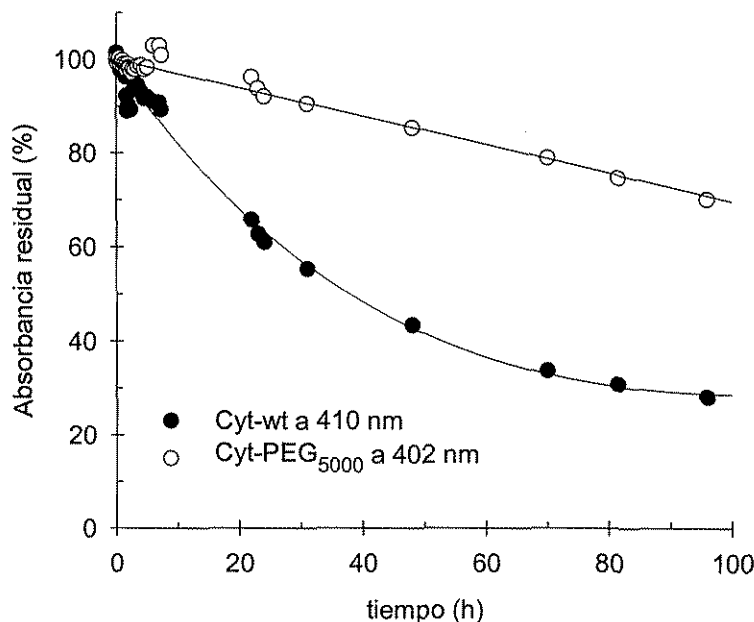


Figura 31. Estabilidad del sitio activo del citocromo *c* de corazón de caballo a 80°C. Las muestras fueron incubadas a 80°C en amortiguador de fosfatos 60 mM, pH 6.1 en viales sellados para evitar la evaporación. La absorbancia se midió a la longitud de onda de máxima absorción para cada uno de los citocromos.

6.10. Posible mecanismo de estabilización del polietilén glicol

Diversos estudios han propuesto que la conformación del PEG puede oscilar entre estructuras con un enrollamiento aleatorio y estructuras en hélice, en donde el oxígeno de la cadena del polímero actúa como un punto de anclaje para la formación de puentes de hidrógeno. De hecho, se ha demostrado que cada residuo de etilén glicol (la unidad monomérica del PEG) es capaz de enlazar de dos a tres moléculas de agua por medio de puentes de hidrógeno (Liu and Parsons, 1969; Donato *et al.*, 1996). También se ha encontrado que el PEG es flexible en solventes orgánicos mientras que posee cierta rigidez en soluciones acuosas. Esta pérdida de entropía en sistemas acuosos es explicada por una mayor estructuración de las moléculas de agua alrededor de las zonas hidrofílicas del polímero, mientras que la estructuración de las moléculas de agua es menor en las zonas hidrofóbicas (Tasaki, 1996). La mayor movilidad de las cadenas del polímero en solventes orgánicos puede explicar la mayor actividad observada por el Cyt-PEG₅₀₀₀ en sistemas con alto contenido de solvente orgánico. El mecanismo de estabilización puede deberse a la anfifilicidad del conjugado, por un lado, una capa primaria de moléculas de agua puede solvatar las regiones hidrofílicas del polímero, mientras que sus zonas hidrofóbicas pueden interactuar con las regiones hidrofóbicas de la superficie de la proteína. Estas interacciones pueden dar lugar a la formación de una estructura polimérica alrededor de la proteína que la protege del contacto directo con el agua presente en el medio. La presencia del polímero en la superficie de la proteína altera de alguna manera la estructura secundaria de la proteína lo cual provoca que la proteína modificada presente un estado nativo desestabilizado, sin embargo, es precisamente la estructuración de la capa polimérica la que evita que la proteína modificada se despliegue rápidamente. En este punto, el polímero funciona como una barrera cinética durante el desplegamiento de la proteína, facilitando la aparición de un estado intermediario que conserva

su sitio activo y que es catalíticamente activo a altas temperaturas y en altas concentraciones de solvente orgánico o agentes desnaturizantes.

7. CONCLUSIONES

Las conclusiones de este trabajo se resumen en los siguientes puntos:

- La copolimerización del citocromo en Nylon provocó un incremento de 10°C en la temperatura óptima del citocromo modificado, sin embargo, provocó una pérdida notable en la actividad de la proteína.
- La modificación química de la cloroperoxidasa y la peroxidasa con PEG, no tuvo efectos favorables en la estabilidad de éstas proteínas.
- La modificación química con polietilén glicol produjo un biocatalizador con un alto peso molecular. En este biocatalizador, la proporción de proteína osciló alrededor del 13%.
- El citocromo c modificado químicamente es un biocatalizador activo a temperaturas superiores a los 100°C cuando se utiliza cloruro de pinacianol como sustrato. En el caso de un sustrato más hidrofóbico como el pireno, el citocromo modificado presentó actividad a 80°C, temperatura en la cual la proteína no modificada fue inactiva. La proteína modificada demostró ser termoestable y conservó una alta actividad residual aún después de la incubación por 7 horas a 80°C. Este es el primer reporte en el cual se describe la actividad de una peroxidasa a temperaturas superiores a los 100°C.
- Como consecuencia del incremento en la hidrofobicidad, la proteína modificada fue capaz de oxidar compuestos polinucleoaromáticos y organoazufrados a 80°C. La modificación química también alteró el comportamiento catalítico del citocromo c. La proteína modificada presentó valores de K_M para el pireno y para el peróxido de hidrógeno menores en comparación a la proteína no modificada. Esto se vio reflejado en un incremento en la eficiencia catalítica.
- La presencia del polímero facilitó una mayor solubilidad de la proteína en solventes orgánicos y favoreció a catálisis en medios con bajo contenido de agua.

- La relación polímero/proteína parece ser un factor determinante para obtener biocatalizadores más activos y más estables.
- Los estudios con los citocromos de levadura mutantes permitieron identificar residuos que son importantes para la estabilidad de la proteína. La ausencia de polímero en la posición el residuo Lys79, así como la modificación del residuo Lys27 son esenciales para obtener una mayor estabilidad.
- La modificación química provocó cambios en la estructura secundaria de la proteína produciendo un estado nativo alterado. Como resultado de la modificación, la estabilidad termodinámica del Cyt-PEG₅₀₀₀ se vio reducida en comparación a la proteína no modificada.
- El conjugado polímero-proteína mostró un perfil de desnaturalización diferente al de la proteína no modificada. La proteína modificada siguió un modelo de tres estados, que involucró la presencia de un intermediario estable, mientras que la proteína no modificada se ajustó a un modelo de dos estados. En el Cyt-PEG₅₀₀₀ la pérdida de actividad está acoplada a la pérdida de la estructura del biocatalizador, mientras que en el Cyt-wt la actividad se pierde antes de que la proteína pierda su estructura.
- El polímero puede formar una estructura alrededor de la superficie de la proteína, la cual puede actuar como una barrera cinética durante el desplegamiento. Este fenómeno, da origen a un estado intermediario que conserva su sitio activo y que es activo a altas temperaturas, en altas concentraciones de solvente orgánico y en altas concentraciones de agentes desnaturalizantes.
- El efecto global de la modificación fue una desestabilización termodinámica, obtenida como consecuencia de un estado nativo alterado, pero por otro lado, la modificación promovió una mayor estabilidad cinética del citocromo, disminuyendo significativamente la velocidad de desplegamiento en condiciones desnaturalizantes.

8. PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES

Las perspectivas de este trabajo son amplias. Por un lado es necesario hacer una caracterización intensiva del Cyt-nyl. La generación de plásticos catalíticos es una estrategia que presenta amplias ventajas sobre algunos otros métodos de inmovilización de enzimas. En este trabajo se produjo un plástico biocatalítico basado en Nylon, sin embargo, este plástico resultó poco activo contra sustratos aromáticos y su perfil de actividades a diferentes temperaturas no se vio grandemente alterado. La baja actividad obtenida con este biocatalizador puede ser el resultado de diferentes factores, que pueden incluir, inactivación de la proteína durante la copolimerización y la formación de un plástico poco poroso que presente problemas de difusión de sustratos y productos. Por lo tanto, es importante explorar nuevas condiciones de reacción que eviten la inactivación de la proteína y por otra parte, evaluar nuevas unidades monoméricas que permitan la síntesis de polímeros con porosidades diferentes que permitan reducir los problemas de difusión de sustratos y productos.

Otro aspecto importante a estudiar es el efecto que tiene la modificación química con PEG de otras hemoproteínas, entre ellas la cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago*. Esta es la peroxidasa más activa que se conoce y presenta un alto potencial para ser empleada como biocatalizador en la industria petrolera. En este trabajo se modificó con PEG a la cloroperoxidasa y la peroxidasa de rábano, sin embargo ni la estabilidad ni la actividad de ambas proteínas se vieron grandemente afectadas. Cabe señalar que estas enzimas son proteínas relativamente ácidas que presentan pocos grupos amino superficiales susceptibles de modificarse químicamente. Debido a esto es probable que la falta de efectos notables en estabilidad y actividad se deba a un bajo grado de modificación. En este sentido es interesante explorar nuevos agentes de modificación química que permitan el acoplamiento covalente sobre los grupos carboxilo superficiales, o bien, emplear nuevas estrategias durante la modificación,

como la incorporación de un mayor número de grupos amino en la superficie de las proteínas, seguida de la modificación con PEG activado con cloruro cianúrico.

Otra alternativa interesante puede ser la búsqueda, aislamiento y caracterización de peroxidasas provenientes de microorganismos termófilos e hipertermófilos. Los efectos combinados de la estabilidad intrínseca de estas proteínas y la modificación química podrían generar biocatalizadores sumamente estables y resistentes para ser empleados en procesos industriales.

Por otra parte, uno de los factores que ha limitado el uso y la aplicación de las hemoproteínas, es su inestabilidad hacia el peróxido de hidrógeno. Actualmente se están realizando estudios enfocados a dilucidar el mecanismo de inactivación por peróxido, principalmente a través del uso de técnicas de biología molecular. El contar con biocatalizadores termoestables y además resistentes a la inactivación por peróxido abriría el panorama para la aplicación industrial de las peroxidasas, no sólo en la industria petrolera, sino también en la industria química.

9. REFERENCIAS

Abuchowski, A., McCoy, J. R., Palczuk, N. C., van Es, T., and Davis, F. F. (1977a). Effect of covalent attachment of polyethylene glycol on immunogenicity and circulating life of bovine liver catalase. *J. Biol. Chem.* 252:3582-3586.

Abuchowski, A., van Es, T., Palczuk, N. C., and Davis, F. F. (1977b). Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylene glycol. *J. Biol. Chem.* 252:3578-3581.

Ahmad, A., Madhusudanan, K. P., and Bhakuni, V. (2000). Trichloroacetic acid and trifluoroacetic acid-induced unfolding of cytochrome c: stabilization of a native-like folded intermediate. *Biochim. Biophys. Acta.* 1480:201-210.

Aksoy, S., Tunturk, H., and Hasirci, N. (1998). Stability of α -amylase immobilized on poly(methyl methacrylate-acrylic acid) microspheres. *J. Biotechnol.* 60:37-46.

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K. (1999). *Short protocols in molecular biology*. F. M. Ausubel *et al.* Eds. New York, NY. 1104 pp.

Ayala, M., Tinoco, R., Hernandez, V., Bremauntz, P., and Vazquez-Duhalt, R. (1998). Biocatalytic oxidation of fuel as an alternative to biodesulfurization. *Fuel Process. Technol.* 57:101-111.

Bailey Jr., F. E. and Koleske, J. V. (1976). *Poly(ethylene oxide)*. Academic Press. New York. pp.173.

Barr, D. P. and Mason, R. P. (1995). Mechanism of radical production from reaction of cytochrome c with organic hydroperoxides. *J. Biol. Chem.* 270:12709-12716.

Baust-Timpson, M. and Seuffer-Wasserthal, P. (1998). CLECs: robust and efficient biocatalyst for fine chemicals and pharmaceutical manufacturing. *Specialty Chemicals* 18:248-251.

Bhadra, A., Scharer, J. M., and Moo-Young, M. (1987). Microbial desulphurization of heavy oils and bitumen. *Biotech. Adv.* 5:1-27.

- Bogan, B. W., Lamar, R. T., and Hammel, K. E.** (1996). Fluorene oxidation *in vivo* by *Phanerochaete chrysosporium* and *in vitro* during manganese peroxidase-dependent lipid peroxidation. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1788-1792.
- Busi, E., Howes, B. D., Pogni, R., Basosi, R., Tinoco, R., and Vazquez-Duhalt, R.** (1999). Modified cytochrome *c*/H₂O₂ system: spectroscopic EPR investigation of the biocatalytic behaviour. *J. Mol. Catal. B:Enzymatic.* 9:39-48.
- Chemical and Engineering News.** (1999). New rules expected for sulfur in gasoline, cleaner vehicles. April 26, 77(17):19.
- DeSantis, G. and Jones, J. B.** (1999). Chemical modification of enzymes for enhanced functionality. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10:324-330.
- Deterding, L. J., Barr, D. P., Mason, R. P., and Tomer, K. B.** (1998). Characterization of cytochrome *c* free radical reactions with peptides by mass spectrometry. *J. Biol. Chem.* 273:12863-12869.
- Dill, K. A.** (1990). Dominant forces in protein folding. *Biochemistry* 29:7133-7155.
- Donato, I. D., Magazú, S., Maisano, G., Majolino, D., Migliardo, P., and Pollicino, A.** (1996). Hydration phenomena and hydrogen bond connectivity in polymeric aqueous solutions. *Molec. Phys.* 87:1463-1469.
- Durant, J. L., Busby, W. F., Lafleur, A. L., Penman, B. W., and Crespi, C. L.** (1996). Human cell mutagenicity of oxygenated, nitred and unsubstituted polycyclic aromatic hydrocarbons with urban aerosols. *Mutation Res.* 371:123-157.
- Endo, S., Nagayama, K., and Wada, A.** (1985). Probing stability and dynamics of proteins by protease digestion I: comparison of protease susceptibility and thermal stability of cytochromes *c*. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 3:409-421.
- Fedorak, P. M., Semple, K. M., Vazquez-Duhalt, R., and Westlake, D. W. S.** (1993). Chloroperoxidase-mediated modification of petrophorphyrins and asphaltenes. *Enzyme Microb. Technol.* 15:429-437.
- Filby, R. H.** (1975). *The Role of Trace Metals in Petroleum*. T. F. Yen, Ed. Ann Arbor, MI. pp. 31-58.

- Filby, R. H. and VanBerkel, G. J.** (1987). *Metal Complexes in Fossil Fuels: Geochemistry, Characterization, and Processing*. R. H. Filby and J. F. Branthaver, Eds. Washington, DC. pp. 2-39.
- Gaertner, H. F. and Puigserver, A. J.** (1992). Increased activity and stability of poly(ethylene glycol)-modified trypsin. *Enzyme Microb. Technol.* 14:150-155.
- Gallegos, E. J. and Sundararaman, P.** (1985). Mass-spectrometry of geoporphyrins. *Mass Spectrometry Reviews* 4:55-85.
- Garcia, D., Ortéga, F., and Marty, J. L.** (1998). Kinetics of thermal inactivation of horseradish peroxidase: stabilizing effects of methoxypoly(ethylene glycol). *Biotechnol. Appl. Biochem.* 27:49-54.
- Govardhan, C. P.** (1999). Crosslinking of enzymes for improved stability and performance. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10:331-335.
- Greenfield, N. J.** (1996). Methods to estimate the conformation of proteins and polypeptides from circular dichroism data. *Anal. Biochem.* 235:1-10.
- Grossman, M. J., Lee, M. K., Prince, R. C., Garret, K. K., George, G. N., and Pickering, I. J.** (1999). Microbial desulfurization of a crude oil middle-distillate fraction: analysis of the extent of sulfur removal and the effect of removal on remaining sulfur. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:181-188.
- Habeeb, A. F. S. A.** (1966). Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzenesulfonic acid. *Anal. Biochem.* 14:328-336.
- Hammel, K. E. Kalyanaraman, B., and Kirk, K.** (1986). Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbon and dibenzo[p]-dioxins by *Phanerochaete crysosporium* ligninase. *J. Biol. Chem.* 261:16948-16952.
- Halling, P. J.** (1994). Thermodynamic predictions for biocatalysis in non-conventional media: Theory, tests, and recommendations for experimental design and analysis. *Enzyme Microb. Technol.* 16:178-206.

Harford-Cross, C. F., Carmichael, A. B., Allan, F. K., England, P. A., Rouch, D. A., and Wong, L. L. (2000). Protein engineering of cytochrome P450_{cam} (CYP101) for the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Prot. Eng.* 13:121-128.

Harris, J. M. (1992a). *Poly(ethylene glycol) Chemistry. Biotechnical and Biomedical applications.* J. M. Harris, Eds. New York. 385 pp.

Harris, J. M. (1992b). Introduction to biotechnical and biomedical applications of poly(ethylene glycol). In *Poly(ethylene glycol) chemistry. Biotechnical and biomedical applications.* J. M. Harris, Ed. New York. pp. 1-14.

Hodgson, G. W. (1973). Geochemistry of porphyrins-reactions during diagenesis. *Ann. NY. Acad. Sci.* 206:670-684.

Hollecker, M. and Creighton, T. E. (1982). Effect on protein stability of reversing the charge on amino- groups. *Biochim. Biophys. Acta* 701:395-404.

Horton, R. M. and Pease, L. R. (1991). Recombination and mutagenesis of DNA sequences using PCR. In *Directed mutagenesis. A practical approach.* M. J. McPherson, Ed. Oxford, UK. pp. 217-247.

Inada, Y., Takahashi, K., Yoshimoto, T., Ajima, A., Matsushima, A., and Saito, Y. (1986). Application of polyethylene glycol-modified enzymes in biotechnological processes: organic solvents-soluble enzymes. *TIBTECH* 4:190-194.

International Agency for Research on Cancer (1983). *Polynuclear aromatic hydrocarbons. Part 1. Chemical, environmental and experimental data.* Lyon, France.

Ionescu, R., Smith, V. F., O'Neill, J. C. Jr., and Mathews, R. (2000). Multistate equilibrium unfolding of *Escherichia coli* dihydrofolate reductase: thermodynamic and spectroscopic description of the native, intermediate, and unfolded ensembles. *Biochemistry* 39:9540-9550.

Jene, Q., Pearson, J. C., and Lowe, C. R. (1997). Surfactant modified enzymes: Solubility and activity of surfactant-modified catalase in organic solvents. *Enzyme Microb. Technol.* 20:69-74.

Kaminsky, L. S., Miller, V. J., and Davison, A. J. (1973). Thermodynamic studies of the opening of the heme crevice of ferricytochrome *c*. *Biochemistry* 12: 2215-2220.

- Katchalski-Katzir, E.** (1993). Immobilized enzymes - learning from past successes and failures. *TIBTECH* 11:471-478.
- Kayser, K. J., Bielagajones, B. A., Jackowski, K., Odusan, O., and Kilbane, J. J.** (1993). Utilization of organosulfur compounds by axenic and mixed cultures of *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8. *Journal of General Microbiology* 139:3123-3129.
- Kazan, D., Ertan, H., and Erarslan, A.** (1997). Stabilization of *Escherichia coli* penicillin G acylase against thermal inactivation by cross-linking with dextran dialdehyde polymers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48:191-197.
- Kim, T. S., Kim, H. Y. and Kim, B. H.** (1990). Petroleum desulfurization by *Desulfovibrio desulfuricans* M6 using electrochemically supplied reducing equivalent. *Biotechnol. Lett.* 12:757-760.
- Klibanov, A.** (1997). Why are enzymes less active in organic solvents than in water? *TIBTECH.* 15:97-101.
- Laane, C., Boreren, S., Vos, K., and Veeger, C.** (1987). Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. *Biotech. Bioeng.* 30:81-87.
- Lee, L. L. Y. and Lee, J. C.** (1987). Thermal stability of proteins in the presence of poly(ethylene glycols). *Biochemistry* 26:7813-7819.
- Liu, K. J. and Parsons, J. L.** (1969). Solvents effects on the preferred conformation of poly(ethylene glycols). *Macromolecules* 2:529-533.
- Longo, M. A. and Combes, D.** (1997). Influence of surface hydrophilic/hydrophobic balance on enzyme properties. *J. Biotechnol.* 58:21-32.
- Longo, M. A. and Combes, D.** (1999). Thermostability of modified enzymes: a detailed study. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 74:25-32.
- Louie, G. V. and Brayer, G. D.** (1990). High-resolution refinement of yeast iso-1-cytochrome c and comparisons with other eukaryotic cytochromes c. *J. Mol. Biol.* 214:527-555.

- Mansfeld, J., Vriend, G., Van der Burg, B., Eijsink, V. G. H., and Ulbrich-Hofmann, R.** (1999). Probing the unfolding region in a thermolysin-like protease by site-directed immobilization. *Biochemistry* 38:8240-8245.
- Margoliash, E. and Schejter, A.** (1966). Cytochrome *c*. *Adv. Protein. Chem.* 21:113-286.
- McFarland, B. L., Boron, D. J., Deever, W., Meyer, J. A., Johnson, A. R., and Atlas, R. M.** (1998). Biocatalytic sulfur removal from fuels: Applicability for producing low sulfur gasoline. *Crit. Rev. Microbiol.* 24:99-147.
- Miller, K. W.** (1992). Reductive desulfurization of dibenzyl disulfide. *App. Environ. Microbiol.* 58:2176-2179.
- Monticello, D. J. and Finnerty, W. R.** (1985). Microbial desulfurization of fossil fuels. *Ann. Rev. Microbiol.* 39: 389-
- Myer, Y. P.** (1978). Circular dichroism spectroscopy of hemoproteins. *Methods Enzymol.* 54:249-17.
- Myer, Y. P., McDonald, L. H., Verma, B. C., and Pande, A.** (1980). Urea denaturation of horse heart ferricytochrome *c*. Equilibrium studies and characterization of intermediate forms. *Biochemistry* 19:199-207.
- Nall, B. T.** (1996). Cytochrome *c* folding and stability. In *Cytochrome c. A multidisciplinary approach*. R. A. Scott and G. Mauk, Eds. Sausalito, CA. pp. 167-200.
- Ohshiro, T., Hine, Y., and Izumi, Y.** (1994). Enzymatic desulfurization of dibenzothiophene by a cell-free system of *Rhodococcus erythropolis* D-1. *FEMS Microbiol. Lett.* 118:341-344.
- Ortiz-Leon, M., Velasco, L., and Vazquez-Duhalt, R.** (1995). Biocatalytic oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by hemoglobin and hydrogen peroxide. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 215:968-973.
- Pace, N.** (1986). Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. *Methods Enzymol.* 14:266-280.
- Pelet, R., Behar, F., and Monin, J. C.** (1986). Resins and asphaltenes in the generation and migration of petroleum. *Organic Geochemistry* 10:481-498.

- Pieters, B. R. and Bardeletti, G.** (1992). Enzyme immobilization on a low-cost magnetic support: Kinetic studies on immobilized and coimmobilized glucose oxidase and glucoamylase. *Enzyme Microb. Technol.* 14:361-370.
- Pollock, W. B., Rosell, F. I., Twitchett, M., Dumont, M., and Mauk, A. G.** (1998). Bacterial expression of a mitochondrial cytochrome c. Trimethylation of Lys72 in yeast iso-cytochrome c and the alkaline transition. *Biochemistry* 37:6124-6131.
- Privalov, P. L.** (1992). Physical basis of the stability of the folded conformations of proteins. In *Protein Folding*. T. E. Creighton, Ed. New York. pp. 83-126.
- Puett, D.** (1973). The equilibrium unfolding parameters of horse and sperm whale myoglobin. Effects of guanidine hydrochloride, urea and acid. *J. Biol. Chem.* 248:4623-4634.
- Quiocho, F. A. and Richards, F. M.** (1964). Intermolecular cross-linking of a protein in the crystalline estate: Carboxipeptidase-A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 52:833-839.
- Radi, R., Bush, K. M., and Freeman, B. A.** (1993). The role of cytochrome c and mitochondrial catalase in hydroperoxide-induced heart lipid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 300:409-415.
- Reynolds, J. G. and Biggs, W. R.** (1988). Application of size exclusion chromatography coupled with element-specific detection to the study of heavy crude-oil and residue processing. *Acc. Chem. Res.* 21:319-326.
- Russell, B. S., Melenkivitz, R., and Bren, K. L.** (2000). NMR investigation of ferricytochrome c unfolding: detection of an equilibrium unfolding intermediate and residual structure in the denaturated state. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:8312-8317.
- Saab-Rincón, G.** (1994). NMR and biophysical characterization of folding intermediates in the a subunit of tryptophan synthase from *E. coli*. Tesis Doctoral. Universidad Estatal de Pennsylvania, Estados Unidos.
- Saito, Y. and Wada, A.** (1983). Comparative study of GuHCl denaturation of globular proteins. I. Spectroscopic and chromatographic analysis of the denaturation curves of ribonuclease A, cytochrome c, and pepsinogen. *Biopolymers* 22:2105-2122.

- Schejter, A., Luntz, T. L., Koshy, T. I., and Margoliash, E.** (1992). Relationship between local and global stabilities of proteins: site-directed mutants and chemically-modified derivatives of cytochrome *c*. *Biochemistry* 31:8336-8343.
- Setti, L., Rossi, M., Lanzarini, G., and Pifferi, P. G.** (1992). The effect of *n*-alkanes in the degradation of dibenzothiophene and of organic sulfur-compounds in heavy oil by a *Pseudomonas* sp. *Biotechnol. Lett.* 14:515-520.
- Slade, D.** Fluid-bed reactor designated chemical landmark. *C&EN*. November 23, 1998. 51-51.
- Speight, J. G. and Moschopedis, S. E.** (1981). *Chemistry of Asphaltenes*. J. W. Bunger and N. C. Li, Eds. Washington, DC. p. 1.
- Srivastava, R. A. K.** (1991). Studies on stabilization of amylase by covalent coupling to soluble polysaccharides. *Enzyme Microb. Technol.* 13:164-170.
- St. Clair, N. L. and Navia, M. A.** (1992). Cross-linked enzyme crystals as robust biocatalysts. *J. Am. Chem. Soc.* 114:7314-7316.
- Strausz, O.P., Mojelsky, T.W., and Lown, E. M.** (1992). The molecular structure of asphaltene: an unfolding story. *Fuel* 71:1355-1363.
- Stucki, G. and Alexander, M.** (1987). Role of dissolution rate and solubility in biodegradation of aromatic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:292-297.
- Tanford, C.** (1968). Protein denaturation. *Adv. Protein. Chem.* 23:121-282.
- Tasaki, K.** (1996). Poly(oxyethylene)-water interactions: a molecular dynamics study. *J. Am. Chem. Soc.* 118:8459-8469.
- Tinoco, R. and Vazquez-Duhalt, R.** (1998). Chemical modification of cytochrome *c* improves their catalytic properties in oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Enzyme Microb. Technol.* 22:8-12.
- Torres, E., Sandoval, J. V., Rosell, F. I., Mauk, G., and Vazquez-Duhalt, R.** (1995). Site-directed mutagenesis improves biocatalytic activity of iso-1-cytochrome *c* in polycyclic hydrocarbon oxidation. *Enzyme Microb. Technol.* 17:1014-1020.

- Torres, E., Tinoco, R., and Vazquez-Duhalt, R.** (1996). Solvent hydrophobicity predicts biocatalytic behaviour of lignin peroxidase and cytochrome *c* in aqueous solution of water-miscible organic solvents. *J. Biotechnol.* 49:59-67.
- Torres, E., Tinoco, R., and Vazquez-Duhalt, R.** (1997). Biocatalytic oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons in media containing organic solvents. *Wat. Sci. Tech.* 36:37-44.
- Torres, E., Siminovich, B., Barzana, E., and Vazquez-Duhalt, R.** (1998). Thermodynamic hydrophobicity of a queous mixtures of water-miscible solvents predicts peroxidase activity. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* 4:155-159.
- Torres, E. and Vazquez-Duhalt, R.** (2000). Chemical modification of hemoglobin improves biocatalytic oxidation of PAHs. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 273:820-823.
- Tsong, T. Y.** (1973). The Trp-59 fluorescence of ferricytochrome *c* as a sensitive measure of the over-all protein conformation. *J. Biol. Chem.* 249:1988-1990.
- Ugarova, N. N., Rozhkova, G. D., and Berezin, I. V.** (1979). Chemical modification of the ϵ -amino groups of lysine residues in horseradish peroxidase and its effect on the catalytic properties and thermostability of the enzyme. *Biochim. Biophys. Acta* 570:31-42.
- Vanzi, F., Madan, B., and Sharp, K.** (1998). Effect of the protein denaturants urea and guanidinium on water structure: A structural and thermodynamics study. *J. Am. Chem. Soc.* 120:10748-10753.
- Varalakshmi, P., Lathika, K. M., Raghavan, K. G., and Singh, B. B.** (1995). Altered physicochemical characteristics of polyethylene glycol linked beet stem oxalate oxidase. *Biotech. Bioeng.* 46:254-257.
- Vazquez-Duhalt, R., Fedorak, P. M., and Westlake, D. W. S.** (1992). Role of enzyme hydrophobicity in biocatalysis in organic solvents. *Enzyme Microb. Technol.* 14:837-841.
- Vazquez-Duhalt, R., Westlake, D. W. S., and Fedorak, P. M.** (1993). Cytochrome *c* as biocatalyst for the oxidation of thiophenes and organosulfides. *Enzyme Microb. Technol.* 15:494-499.

- Vazquez-Duhalt, R., Westlake, D. W. S., and Fedorak, P. M.** (1994). Lignin peroxidase oxidation of aromatic compounds in systems containing organic solvents. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:459-466.
- Vazquez-Duhalt, R., Westlake, D. W. S., and Fedorak, P. M.** (1995). Kinetic of chemically modified lignin peroxidase and enzymatic oxidation of aromatic nitrogen-containing compounds. *App. Microbiol. Biotechnol.* 42:675-681.
- Vazquez-Duhalt, R.** (1998). Hemoproteins as biocatalyst for the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons. In *Advances in bioprocess engineering II*. E. Galindo and O. T. Ramírez, Eds. The Netherlands. pp. 183-207.
- Vazquez-Duhalt, R.** (1999). Cytochrome c as biocatalyst. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* 7:241-249.
- Vazquez-Duhalt, R., Torres, E., Valderrama, B., and Le Borgne, S.** (2002). Will enzymatic catalysis impact the petroleum refining industry? *Energy and Fuels.* 16:1239-1250.
- Venkatesh, R. and Sundaram, P. V.** (1998). Modulation of stability properties of bovine tripsin after *in vitro* structural changes with a variety of chemical modifiers. *Protein Eng.* 11:691-698.
- Wang, Y. F., Yakovlevsky, K., Zhang, B., and Margolin, A. L.** (1997a). Cross-linked enzyme crystals (CLEC) of subtilisin: a versatile catalyst for organic synthesis. *J. Org. Chem.* 32:3488-3495.
- Wang, P., Sergeeva, M. V., Lim, L., and Dordick, J. S.** (1997b). Biocatalytic plastics as active and stable materials for biotransformation. *Nature Biotechnol.* 15:789-793.
- Wong, S. S. and Wong, C. L. J.** (1992). Chemical crosslinking and the stabilization of protein and enzymes. *Enzyme Microb. Technol.* 14:866-874.
- Woody, R. W.** (1995). Circular Dichroism. *Methods Enzymol.* 246:34-71.
- Wright, J. R., Hendrickson, W. A., Dorli, S., and James, G. T.** (1986). Circular Dichroism (CD) and Magnetic Circular Dichroism (MCD). In *Physical Methods for Inorganic Biochemistry*. J. R. Wright et al. Eds. New York. pp. 311 -328.

- Xie, G. and Timasheff, S. N.** (1997). Mechanism of the stabilization of ribonuclease A by sorbitol: preferential hydration is greater for the denatured than for the native protein. *Protein Sci.* 6:211-221.
- Xu, Y., Mayne, L., and Englander, W.** (1998). Evidence for an unfolding and refolding pathway in cytochrome *c*. *Nature Struct. Biol.* 5:774-778.
- Yang, Z. W. D. and Russell, A. J.** (1995). Synthesis of protein-containing polymers in organic solvents. *Biotech. Bioeng.* 45:10-17.
- Yomo, T., Urabe, I., and Okada, H.** (1992). PEG-coupled semisynthetic oxidases. In *Poly(ethylene glycol) chemistry. Biotechnical and biomedical applications*. J. M. Harris, Ed. New York. pp. 115-126.
- Yoshinaga, k., Ishida, H., Sagawa, T., and Ohkubo, K.** (1992). PEG-modified protein hybrid catalyst. In *Poly(ethylene glycol) chemistry. Biotechnical and biomedical applications*. J. M. Harris, Ed. New York. pp. 103-115.
- Zhu, Y., Li, J., and Dong, S.** (1998). Dimerization of hydroxylated species of *m*-aminophenol by cytochrome *c* with hydrogen peroxide. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* 5:475-482.

10. ANEXO

High Temperature Biocatalysis by Chemically Modified Cytochrome *c*

Humberto García-Arellano, Brenda Valderrama, Gloria Saab-Rincón, and Rafael Vazquez-Duhalt*

Instituto de Biotecnología, UNAM, Apartado Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos, CP 62250 México

Received June 20, 2002; Revised Manuscript Received August 19, 2002

Chemically modified cytochrome *c* with poly(ethylene glycol) (PEG) showed activity at temperatures higher than 100 °C and to be highly thermostable. The molecular size of PEG moieties and the coupling site affected the thermal stabilization. An optimal PEG/protein mass ratio of 2.8 was found, producing a fully thermostable biocatalyst at 80 °C. Site-directed mutagenesis on yeast cytochrome *c* showed an increased thermostabilization when lysine 79 residue, localized at the edge of the active site, was replaced by a nonreactive residue. Tertiary, secondary, and active-site structures were analyzed by fluorescence, CD, and UV/visible spectroscopies. Besides its disordered structure, the pegylated protein showed a lower unfolding rate at the active-site than the unmodified ones. A shell-like structure seems to protect the heme environment, in which PEG is coiled on the protein surface with a primary shield of rigid water molecules solvating the hydrophilic region of bound-PEG, and the PEG hydrophobic regions interacting with the hydrophobic clusters on protein surface.

INTRODUCTION

Enzymatic catalysis is increasingly used as an alternative to traditional chemical synthesis. The driving force behind this change is the necessity to innovate products and to establish new ecoefficient processes (*1*). However, in many cases the industrial application of enzymes is hampered by the instability of the biocatalyst under process conditions, which may involve extreme pH, high temperature, the presence of organic solvents, and other denaturing agents. The generation of robust biocatalysts can be accomplished by genetic and biochemical approaches, and progress will continue after the systematic identification of novel sources of enzymes with unusual properties, e.g., from extremophile microorganisms.

Any enhancement of the thermal stability of an enzyme would confer significant operational advantages such as higher reaction rates, increased substrate solubility in lower viscosity media, productive shifts in thermodynamic equilibrium, and reduced risks of microbial contamination. Genetic approaches have yielded significant results in obtaining more thermostable enzymes, with higher temperature optima through directed evolution (*2–4*). A combination of rational and random mutagenesis has been used to obtain a fungal peroxidase 174-times more thermostable than the wild-type protein (*5*). However, although directed evolution seems to be a powerful tool to enhance biocatalytic performance, its main drawback is that the knowledge of the properties gained during site-directed mutagenesis or evolution processes cannot be used as a general method to be applied to other proteins. On the other hand, chemical modification seems to be a more general method to improve intrinsic properties of proteins such as stability and activity without a deeper knowledge of the gene or protein structure. Several chemical methods have been employed to obtain more stable protein derivatives, including plastic conjugates (*6, 7*), cross-linked enzyme

crystals (CLECs) (*8–10*), attachment to polysaccharides (*11–12*), and chemical modification with amphiphilic polymers (*13–15*).

It is well-known that the modification with PEG or polysaccharides may confer certain thermostability to the enzymes at a temperature range from 50 to 70 °C (*15, 16*). Stabilization of proteins was explained by the solvation of PEG-bound molecules, which restricted the molecular mobility, thus decreasing the unfolding rate of the protein.

Catalytically active and stable enzymes at temperatures higher than 80 °C are considered hyperthermophilic enzymes. Only two enzymatic preparations have been shown to be active and stable at temperatures higher than 100 °C in aqueous systems, both hydrolytic enzymes: a pegylated trypsin (*13*) and a dextran-glycosylated amylase (*12*). The thermal protective effect of PEG on trypsin was attributable to the presence of the polymer, which may change the microenvironment through the formation of a hydrogen-bond network around the protein (*13*). The higher the molecular mass of PEG, the higher the thermostability of trypsin. The effect of the size of the polymer on the thermostability of amylolytic enzymes has also been reported by Lenders et al. (*11*). The increased thermal stability of the dextran-protein conjugate was mainly due to the formation of multiple covalent links between the enzyme and the polymer leading to the formation of a more rigid conformation of the protein. It was also shown that the stability decreased when the number of linkages between the enzyme and the carbohydrate was lower. Only two peroxidases have been shown to be stable at temperatures higher than 80 °C in their native form: soybean (*17*) and palm oil (*18*) peroxidases, and this stability does not necessarily mean activity at high temperatures. However, no information is available on chemically modified peroxidases showing activity and stability at hyperthermophilic conditions (80 to ≥ 100 °C) in aqueous systems.

As a novel source of biocatalysts, we are exploring the peroxidase activity of nonenzymatic hemoproteins, such

* Corresponding author. Fax: (52) 777-317-2388. E-mail: vazquduh@ibt.unam.mx.

as cytochrome *c* (19–23) and hemoglobin (24, 25), with emphasis on the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). The catalytic properties of these hemo-proteins have been significantly improved by site-directed mutagenesis (21, 22) and chemical modification (22, 23). In addition, rational design methods have been used to obtain cytochrome *c* variants with higher stability against inactivation by hydrogen peroxide (26). In this work, we present the enhanced peroxidase catalytic performance of a chemically modified cytochrome *c* at temperatures above 80 °C, and we discuss the possible mechanism of thermoprotection.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Chemicals. Horse heart cytochrome *c*, *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome *c*, methoxypoly(ethylene glycol) (MW 350, 750, and 2000 Da), cyanuric chloride-activated monomethoxypoly(ethylene glycol) (MW 5000 Da), hydrogen peroxide (30%), and cyanuric chloride (2,4,6 trichloro-1,3,5-triazine) were obtained from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO). Pyrene, anthracene, benzo[a]pyrene, thianthrene, dibenzothiophene, and phenyl disulfide were obtained from Aldrich (Milwaukee, WI). Organic solvents (HPLC grade) were purchased from Fisher Scientific (Fairlawn, NJ). Ultrapure guanidine hydrochloride (GuHCl) was from Gibco BRL (Rockville, MD). All DNA restriction and modification reagents were from New England Biolabs (Beverly, MA). All other reagents were analytical grade.

Methoxypoly(ethylene glycol) (PEG) Activation. Activation of PEG species of different molecular sizes (350, 750, or 2000 Da) was carried out by a modification of the method reported by Abuchowski et al. (27). PEG aliquots (10 mmol) were dissolved in 40 mL of dry toluene containing 1 g of sodium carbonate. Cyanuric chloride (30 mmol) was added, and the resulting mixture was stirred overnight at room temperature. The solution was filtered, and the activated PEG fraction was recovered by adding the filtrate to 80 mL of cold petroleum ether followed by a 10 min centrifugation at 12100g. The resulting precipitate was separated and washed with cold petroleum ether until it was free of residual cyanuric chloride as detected by UV spectrometry. The chlorine content in activated PEGs was determined by titration with silver nitrate (0.02 N) after overnight hydrolysis in 50 mM sodium carbonate buffer, pH 10.0.

Chemical Modification of Cytochrome *c*. Poly-(ethylene glycol)-modified horse heart cytochrome *c* (Cyt-PEG) was produced according to the method reported by Gaertner and Puigserver (13). Cytochrome *c* (9 mg) was dissolved in 5 mL of 40 mM borate buffer pH 10.0, and then a five molar excess in a free amino group basis of cyanuric chloride-activated monomethoxypoly(ethylene glycol) (MW 5000 Da) was added. The mixture was stirred for 1 h at room temperature and then diluted to 100 mL with 60 mM sodium phosphate buffer pH 6.1 and dialyzed extensively against the same buffer. The Cyt-PEG conjugate solution was concentrated using an Amicon ultrafiltration cell (Millipore, Bedford, MA) using a 10 kDa cutoff membrane. Yeast cytochrome *c* conjugates were obtained by the same procedure. The degree of protein modification was estimated by titration of the residual free amino groups with trinitrobenzenesulfonic acid (28).

Site-Directed Mutagenesis of *S. cerevisiae* *cyt1*. Single and double mutants of *cyt1* (Table 3) were obtained by megaprimer-extension (29) upon the pBTR1 plasmid (30) using the following primers: pf1 5'-

cggtaccggggatccataactaac-3', pr4 5'-aaaagctagcctgtt-tactcagtcgctttttcaagaagtaattaagtc-3', K79A 5'-cccac-caaaggccatcgggtaccaggaatat-3', K27A 5'-gtttggaccac-cgcgatgtggccacc-3'.

All amplifications were performed using the high-fidelity DNA-polymerase Expand from Roche (Mannheim, Germany) following the manufacturer instructions. Megaprimers were obtained by amplification of plasmid pBTR1 with the primer sets pf1-K27A or K79A and purified from the gel. Extension of the megaprimers was performed upon plasmid pBTR1 using primer pr4. The extension products were purified from the gel, restricted with BamHI and NheI and ligated onto pBTR1 restricted with the same enzymes and harboring *cyt3* coding for the cytochrome *c*-heme lyase (30). The nucleotide sequence of all clones was confirmed twice using the Big dye Terminator kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) in an ABI Prism 377 System (Applied Biosystems).

Overexpression and Purification of Mutant Cytochrome *c* Proteins. Transcription of *cyt1* and *cyt3* is driven from a low-constitutive *tet* promoter located upstream from the BamHI restriction site in plasmid pBTR1 and in all the derivatives here described. All plasmids were transformed into the *E. coli* strain JM101 and maintained in Luria-Bertani (LB) rich medium (31) supplemented with ampicillin (100 µg/mL). Accumulated expression of cytochrome *c* was achieved by growing each recombinant *E. coli* strain in a 2 L New Brunswick (Edison, NJ) fermenter in 1.5 L LB rich medium supplemented with ampicillin for 30 h. Typical cell yield was 2.5 g wet weight per fermenter. Cell pellets (5 g per strain) were resuspended in 50 mL of cold breaking buffer (20 mM sodium phosphate, pH 6.1, 25% sucrose, 10 mM EDTA, 0.2 mM DTT, 50 µg/mL lysozyme) and incubated in ice for 10 min. The cell suspension was then supplemented with 5 mg/mL Brij 35, 0.01 mM MgCl₂, 20 µg/mL RNase, 100 µg/mL DNase, 1 mM PMSF, and incubated at 37 °C for 10 min. Cells were disrupted by two 1 min pulses in a Sonicator (Sonics and Materials Inc., Danbury, CT). Cell debris was removed by centrifugation. Cell extracts were precipitated with one volume of saturated ammonium sulfate, and the supernatants were recovered and dialyzed overnight against 80 volumes of cold 20 mM sodium phosphate buffer, pH 6.1. Enriched extracts were subjected to cation-exchange chromatography using a Macro-Prep High S support (BioRad, Hercules, CA) packed column and the Econo System purification system from BioRad using a linear NaCl gradient. The chromatography was followed by absorbance at 280 and 410 nm. The cytochrome *c*-enriched peak was collected, concentrated by ultrafiltration in an Amicon system (Millipore, Bedford, MA) fitted with a 10 kDa cutoff membrane, and dialyzed overnight against 4 L of cold 20 mM sodium phosphate buffer, pH 6.1. All proteins were purified to homogeneity as assessed by SDS-PAGE and silver staining of the gel. Typical *R_s* values ranged from 4.8 to 5.4.

Protein Concentration. Cytochrome preparations were dissolved in 60 mM sodium phosphate buffer, pH 6.1. Unmodified cytochrome concentration was estimated in the reduced state using an extinction coefficient $\epsilon = 29.5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 550 nm (32). The absorption spectrum of Cyt-PEG was altered as a result of the chemical modification, the typical 550 nm band observed in the reduced state was lost, and the Soret band maximum was UV-shifted. Ahmad, et al. (33) reported a ϵ value of $1.061 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 410 nm for the oxidized state of cytochrome *c*. We applied the same value to estimate the concentration of Cyt-PEG in the oxidized state using the

absorbance of the 402 nm Soret band. To confirm the concentration, Cyt-PEG samples were digested and iron was estimated by atomic absorption. The predicted Cyt-PEG concentration, obtained with each of the methods described above, gave a correlation of 0.994.

Activity Assays. Cytochrome *c* reaction mixtures contained 15% acetonitrile, 20 μM polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) or organosulfur compounds as substrate and 0.5–3.5 μM of unmodified or chemically modified cytochrome in 1 mL of 60 mM sodium phosphate buffer, pH 6.1. Reactions were carried out in individual sealed vessels and started by the addition of 5 μL of 200 mM H_2O_2 (1 mM final concentration) and stopped by adding 1 mL of acetonitrile. The extent of the reaction was followed by substrate consumption on a HPLC (Perkin-Elmer, Norwalk, CT) equipped with a reverse phase C_{18} 5 μm column (15 \times 3.9 mm). Specific activity was determined by measuring the moles of substrate oxidized per mole of cytochrome preparation in 1 min and expressed as min^{-1} . All reactions were performed in triplicate.

Activity vs Temperature Profile. Cytochrome *c* reactions were assayed from 20 $^{\circ}\text{C}$ to 120 $^{\circ}\text{C}$ in 4 mL glass vials sealed with Teflon septa. Reaction mixtures contained 15% acetonitrile, 20 μM pyrene, and 0.5–4.6 μM cytochrome preparation in 1 mL 60 mM sodium phosphate buffer, pH 6.1. Complete mixtures were kept at the desired temperature for 5 min before starting the reactions by the addition of H_2O_2 (1 μmol). Reaction extent was followed by the decrease in absorbance at 335 nm. Residual pyrene was estimated using the extinction coefficient $\epsilon = 32.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 336 nm (34). Specific activity is expressed as min^{-1} .

Stability Assays. The horse-heart cytochrome *c* thermal stability was determined by estimating the specific activity after different incubation times at 80 $^{\circ}\text{C}$ in the absence or presence of substrate. Inactivation constants were determined by fitting the experimental data to the first-order equation ($A = A_0 e^{-kt}$). Yeast cytochrome *c* thermal stability was assayed after 5 h at 70 $^{\circ}\text{C}$ using pyrene as substrate.

Circular Dichroism Measurements. CD measurements were performed on an AVIV 62Ds spectropolarimeter (Lakewood, NJ). Unmodified or modified cytochrome *c* samples (20 μM) were dissolved in 10 mM phosphate buffer, pH 6.1. Blank tests with buffer and controls containing 5 mM PEG (MW 5000 Da) in the same buffer were conducted, and the reference signals were subtracted from the sample signals. CD scans were performed from 180 to 260 nm and from 350 to 450 nm under the following conditions: bandwidth 1 nm, scan step 1 nm, and average time 1 s. For each sample, an average of three repetitions is given. For the assays at 7 or 24 h, incubations were carried out in a water bath previously equilibrated at 80 $^{\circ}\text{C}$. Samples were contained in sealed vials to avoid evaporation. At the specified times, samples were removed from the water bath and placed in the quartz cell. Samples were equilibrated at the scan temperature for at least 10 min. Temperature in the cell compartment was controlled by a Peltier module. Protein concentration was determined before and after each assay.

Fluorescence Measurements. Fluorescence spectra were performed on a Perkin-Elmer LS-50B luminiscence spectrometer (Norwalk, CT). Samples containing 2 μM cytochrome *c* preparations were incubated at different GuHCl concentrations until reaching equilibrium. Afterward, each sample was excited at 295 nm, and three emission spectra from 300 to 500 nm were recorded and

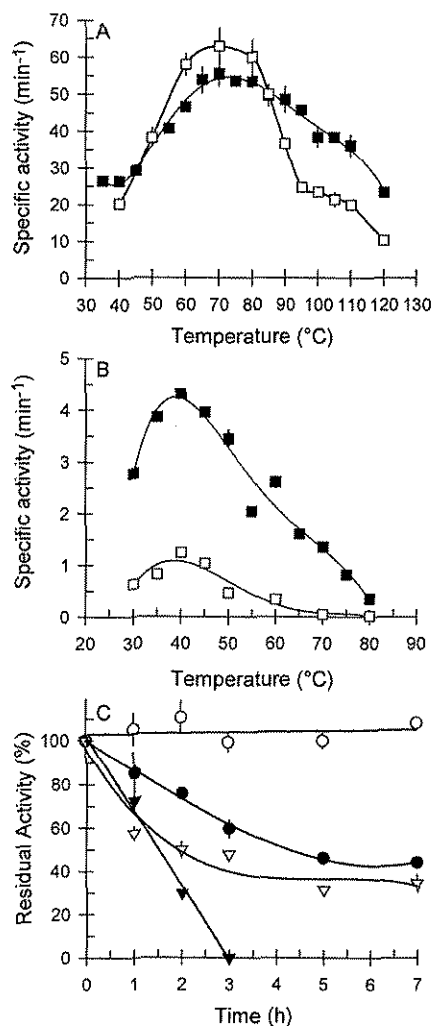


Figure 1. Biocatalytic oxidation of (A) pinacyanol chloride and (B) pyrene by unmodified (\square) and chemically modified (\blacksquare) cytochrome *c* at different temperatures. (C) Thermal stability of unmodified and chemically modified cytochrome *c* incubated at 80 $^{\circ}\text{C}$ with or without the presence of substrate (pinacyanol chloride). The reaction was started by the addition of hydrogen peroxide, and the residual activity was measured at 80 $^{\circ}\text{C}$. (\circ) Cyt-PEG₅₀₀₀ incubated with substrate, (\bullet) Cyt-PEG₅₀₀₀ incubated without substrate, (∇) Cyt incubated with substrate, (\blacktriangledown) Cyt incubated without substrate.

averaged. Data analyses were carried out using the center of mass obtained from each recorded spectrum.

Data Analysis. Unfolding profiles were simultaneously fit by global analysis of the data obtained by fluorescence and CD. The thermodynamic and spectroscopic features were optimized in global fits by nonlinear least-squares analysis using an in-house version of Savuka 5.0 software package (35).

RESULTS AND DISCUSSION

Cytochrome *c* (Cyt) is a compact globular protein with an unusual intrinsic stability provided by a complex hydrogen-bond network (36, 37). This stability leads Cyt to a remarkable catalytic performance as a peroxidase at temperatures as high as 120 $^{\circ}\text{C}$ (hyperthermophilic conditions), with maximal activity between 70 $^{\circ}\text{C}$ and 80 $^{\circ}\text{C}$ (Figure 1a). Horse heart cytochrome *c* was modified with PEG of 5000 Da MW (Cyt-PEG₅₀₀₀). Chemical modification did not alter the specific activity nor the

Table 1. Specific Activities of Unmodified and Chemically Modified Horse Heart Cytochrome c on PAHs and Organosulfur Compounds in 15% Acetonitrile

substrate	specific activity (min ⁻¹)			
	30 °C		80 °C	
	Cyt	Cyt-PEG ₅₀₀₀	Cyt	Cyt-PEG ₅₀₀₀
pyrene	0.63 (± 0.02)	2.78 (± 0.08)	0.01 (± 0.001)	0.35 (± 0.01)
anthracene	0.96 (± 0.1)	3.34 (± 0.1)	0.12 (± 0.002)	0.54 (± 0.01)
benzo[<i>a</i>]pyrene	0.75 (± 0.1)	2.6 (± 0.4)	0.49 (± 0.05)	1.2 (± 0.03)
thianthrene	5.83 (± 0.2)	11.6 (± 0.6)	0.63 (± 0.04)	2.6 (± 0.3)
dibenzothiophene	1.91 (± 0.03)	5.12 (± 0.8)	0.13 (± 0.003)	1.0 (± 0.01)
phenyl disulfide	1.24 (± 0.1)	3.9 (± 0.2)	0.08 (± 0.002)	0.7 (± 0.01)

temperature profile of cytochrome *c* when hydrophilic substrates are used, as in the case of pinacyanol chloride (Figure 1a). However, when the hydrophobic substrate pyrene is used, the Cyt-PEG₅₀₀₀ preparation showed higher specific activity than the unmodified Cyt (Figure 1b). Surprisingly, the maximal activity temperature was displaced from 70 °C with pinacyanol to 40 °C with pyrene for both preparations. Chemical modification with PEG produces an increase of the overall hydrophobicity of the protein (38, 39) and an increased enzyme solubility in organic solvents with little loss of activity (40), facilitating homogeneous catalysis. Pinacyanol chloride is a relatively hydrophilic substrate; thus the activity toward this molecule was expected to be independent of the biocatalyst modification. On the other hand, the activity toward more hydrophobic molecules, such as polycyclic aromatic hydrocarbons and organosulfur compounds, would be especially increased by PEG modification of the enzyme, following a more favorable partition of the substrate from the solvent toward the active site (22, 41).

Chemical modification dramatically increased the thermostability of the protein (Figure 1c). While Cyt lost all detectable activity after 3 h of incubation at 80 °C, Cyt-PEG₅₀₀₀ retained 45% of the initial activity after 7 h of incubation. In the presence of substrate (pinacyanol chloride), the intrinsic stability of both preparations was improved. In the case of Cyt-PEG₅₀₀₀, the presence of substrate resulted in a stable catalyst, retaining 100% of the initial activity after 7 h of incubation at 80 °C. Poly(ethylene glycol) (PEG) is an amphiphilic polymer with the capability of binding water molecules (42) which might form an intricate hydrogen-bond lattice between the protein and the polymer. Chemical modification with PEG has been used to enhance the stability of several enzymes such as trypsin (13), horseradish peroxidase (14), chymotrypsin (16), and *C. rugosa* lipase (15, 16). In this work, 80% of the surface lysine residues of the Cyt-PEG₅₀₀₀ were modified by PEG after the reaction, resulting in a biocatalyst with a predicted molecular weight of 94.7 kDa in which only 13% of the mass is protein. SDS-PAGE electrophoresis and gel filtration chromatography failed to confirm the average molecular weight of this preparation possibly due to the low motility of the polymer in gels (43) or to an increase in the hydrodynamic volume of the protein (38). The modified preparation was analyzed by electrospray mass spectrometry. The mass spectrum showed the presence of a variety of species; however, by deconvolution treatment the main species showed 94367 Da. Beside the complexity of the protein preparation and the limitations of the technique, the mass spectrum data showed that the chemical modification was extensive. The assumption of the complex hydrogen lattice as a stabilizing element suggests that it might contribute not only to enhance the tolerance of Cyt-PEG₅₀₀₀ to high temperatures, but also to stabilize

the protein, which is in fact the case, as can be seen in Figure 1c.

Polycyclic aromatic compounds and organosulfur compounds were tested with cytochrome preparations at high temperature (Table 1). As expected, Cyt-PEG₅₀₀₀ showed higher activity against all substrates tested than the unmodified protein. This effect might be caused by the higher surface hydrophobicity of Cyt-PEG₅₀₀₀ active site, which in turn may be reflected in a more favorable partition of the hydrophobic substrate to the active site. The increased surface hydrophobicity has been reported to result in up to 9-fold increase in the overall catalytic efficiency of the biocatalyst (22).

The thermal stability of PEG-modified trypsin has been directly correlated to the molecular mass of the PEG moiety (13). To evaluate the effect of PEG sizes upon Cyt stability, we modified the protein with different methoxy-poly(ethylene glycol)s previously activated with cyanuric chloride. Activation of low molecular weight PEG (350 Da) resulted in two batch preparations: PEG₃₅₀ in which only one molecule of polymer was coupled to one molecule of 2,4,6 trichloro-1,3,5-triazine, and other, bisPEG₃₅₀, with two coupled molecules of polymer per molecule of activating reagent. The cyanuric chloride coupling with higher molecular weight polymers yielded mainly the mono derivatives. Incorporation of PEG₃₅₀ and bisPEG₃₅₀ into Cyt resulted in preparations with low degree of modification (20% to 30%), while modification with polymers of higher molecular masses produced biocatalysts with more than 70% modification (Table 2). A threshold value of the size of the polymer for the activity of the modified protein was found, independent of the temperature tested (Table 2). The specific activity increased as the polymer size and PEG/protein mass ratio increased up to values of 750 Da and 1.03, respectively. Then, the specific activity decreased as the polymer size and PEG/protein ratio increased. This effect might be the result of the steric hindrance of the active site by the polymer. In particular, PEG₂₀₀₀ and PEG₅₀₀₀ are molecules with a large exclusion volume that might prevent the interaction of substrates and the active site.

The thermal inactivation process for the Cyt-PEG preparations at 80 °C in all cases followed a first order kinetics. Surprisingly no loss in activity was found for Cyt-PEG₂₀₀₀ after 7 h at 80 °C in the absence of substrate, whereas the calculated half-lives for Cyt-PEG₇₅₀ and Cyt-PEG₅₀₀₀ were 27 and 14 h, respectively (Table 2). The assumption of the protective effect of PEG upon the protein thermal stability through a shell-like structure suggested that the larger the PEG/Cyt ratio, the more stable would be the protein. This assumption was shown to be correct up to a threshold mass ratio of 2.8, while the preparation with larger value (PEG₅₀₀₀) presented reduced stability. Thus, our results show that there is an optimal polymer/protein ratio for thermal stability of cytochrome *c*. The lower stability obtained at

Table 2. Modification Degree and Specific Activity of Modified Horse Heart Cytochrome *c* with PEG of Different Molecular Weights

preparation	modification g PEG/g Cyt	specific activity (min ⁻¹) ^a		residual activity after 7 h at 80 °C (%)
		30 °C	80 °C	
unmodified	-----	0.63 (± 0.2)	0.015 (± 0.001)	nd ^b
Cyt-PEG ₃₅₀	0.25	0.88 (± 0.01)	0.05 (± 0.001)	nd
Cyt-bisPEG ₃₅₀	0.30	1.45 (± 0.1)	0.03 (± 0.001)	nd
Cyt-PEG ₇₅₀	1.03	4.58 (± 0.1)	1.54 (± 0.03)	80
Cyt-PEG ₂₀₀₀	2.79	3.65 (± 0.02)	1.44 (± 0.03)	102.3
Cyt-PEG ₅₀₀₀	6.76	2.77 (± 0.1)	0.35 (± 0.002)	66.2

^a Specific activity was estimated using 20 μM pyrene as substrate in 15% acetonitrile. ^b nd: not determined due to the low activity found at 80 °C.

Table 3. Activity and Stability in the Absence of Substrate of Chemically Modified Mutant Yeast Cytochromes *c*

cytochrome	g PEG/g Cyt	specific activity (min ⁻¹)		residual activity after 5 h at 70 °C (%) ^b
		30 °C	70 °C	
parental Cyt-PEG ₅₀₀₀ ^a	4.05	2.17 (± 0.02)	0.73 (± 0.01)	69 (± 1.5)
(K27A)-PEG ₅₀₀₀	4.54	2.12 (± 0.13)	0.66 (± 0.01)	54 (± 0.3)
(K79A)-PEG ₅₀₀₀	4.11	2.15 (± 0.04)	0.47 (± 0.01)	113 (± 2.4)
(K27A, K79A)-PEG ₅₀₀₀	3.84	2.06 (± 0.05)	0.56 (± 0.01)	113 (± 10.3)

^a Parental γ -cytochrome *c* contains the following mutations: T-5A, Y97F, C102T. ^b Residual activity was measured against pyrene and expressed as relative to initial activity values at 70 °C.

both sides of the optimal ratio may be attributable at two different factors: (a) in the case of low ratios, a less structured hydrogen-bonded network caused by few polymer molecules on the protein surface, and (b) in the case of high ratios, an steric effect may occur with molecules having high exclusion volumes, which could distort the protein conformation.

The crystal structure of yeast cytochrome *c* (γ -Cyt) (36) shows only two lysine residues close to the active site, Lys 27 and Lys 79. One of them, Lys79, is located at the edge of the active site and it is H-bonded with Ser 47 in yeast or Thr 47 in horse heart cytochrome *c*. Under reducing conditions, this H-bond results in the closure of the active site. The other lysine, Lys27, is part of a reversed γ -turn. This unusual structure is maintained by three main-chain H-bonds between Lys27, Gly29, and Cys17 and by one H-bond involving side-chain and main-chain atoms (Lys27 to Leu15). Substitution at this position with other residues makes the protein unable to form the last interaction, yielding a less stable protein (36). Despite the high homology between yeast and horse heart cytochromes, thermal and chemical denaturation studies had shown that yeast cytochrome *c* is less stable than those from mammalian sources (44). With the aim of clearing the polymer from the active site surface of cytochrome, Lys27 and Lys79 residues in γ -Cyt were substituted by alanine, which has a nonreactive side-chain. Yeast cytochrome *c* has only 16 lysine residues, while horse heart cytochrome *c* has 19 lysine residues. Thus, it was expected a lower PEG/protein mass ratio for pegylated γ -Cyt than that of horse heart cytochrome *c* preparations. We were unable to detect any activity in the yeast unmodified protein at temperatures above 70 °C (data not shown). Nevertheless, chemical modification with PEG₅₀₀₀ significantly increased the activity and stability of these preparations (Table 3). Our results indicate that (K27A)-PEG₅₀₀₀ retained only 54% of initial activity, while (K79A)-PEG₅₀₀₀ showed activity above 100% of the initial activity at 70 °C, both in the absence of substrate. On the other hand, the presence of the K27A substitution did not suppress the effect of K79A, as could be seen in the double mutant (K27A, K79A)-PEG₅₀₀₀ which showed the same residual activity as the single mutant. Our results suggest that in order to obtain higher stability, chemical modification of Lys27 is required and, at the same time, PEG must be excluded from

Lys79. Four structural units have been described in horse heart cytochrome *c* (37). The fourth unit, reported as the less stable (37), is formed by the loop joining the 60–70 helix to the C-terminal helix and comprises the heme group axial coordinating side-chain Met80. It is reasonable to consider that the introduction of a very large molecule on the amino acid 79 would cause loop distortion and disruption of the Met80-heme ligation, which in turn would yield a less stable protein. On the other hand, the second unit contains the other proximal heme ligand, His18, being the second more stable unit within Cyt (37). Lys27 is located in this unit, leading its amino reactive group exposed to the solvent; thus it was expected that modification of Lys 27 would have no effect on the structural features of this unit.

To get a deeper understanding of the structural basis underlying PEG-induced thermal stabilization, we focused on the spectroscopic properties of horse heart Cyt-PEG₅₀₀₀ preparations. CD ellipticities at 222 nm have been widely used as an estimate of the α -helical content in proteins (45–47). Cytochrome *c* is a compact single domain protein of 104 amino acids with an α -helical content of about 30% (33). The changes in helical content of both Cyt and Cyt-PEG₅₀₀₀ after incubation at 80 °C are shown in Figure 2. A sharp decrease in ellipticity at 222 nm was observed for Cyt, when it was incubated at 80 °C for 24 h, indicating a complete loss of the protein secondary structure. Its noteworthy the increased noise in the Cyt-PEG₅₀₀₀ spectra. Control experiments in the presence of 5 mM of free PEG₅₀₀₀ did not show a significant signal in the wavelength range where the spectra were collected, discarding a contribution of the polymer to the signal. Thus, the increase in the noise is only attributable to the scattering produced by the chemical modification of cytochrome with PEG. Interestingly the signal minimum observed in Cyt-PEG₅₀₀₀ was displaced from 222 to 210 nm, suggesting that the chemical modification was enough to disturb the secondary structure. This fact is also confirmed by the lower mean residual ellipticity at 222 nm of the native Cyt-PEG as compared to Cyt (Figure 2). However, even if the initial structure of Cyt-PEG₅₀₀₀ was probably altered, with respect to the unmodified Cyt, its overall CD spectral features suffer a small decrement in CD signal at 222 nm during the first 10 min of incubation at 80 °C, after which remain unchanged even after extensive

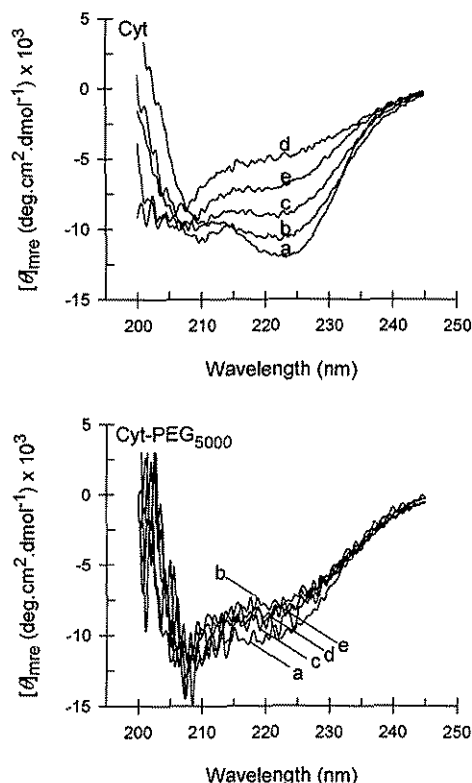


Figure 2. Mean residual ellipticity of cytochrome *c* preparations. Scans were obtained after samples were incubated under following conditions: (a) 30 °C, 10 min; (b) 80 °C, 10 min; (c) 80 °C, 7 h; (d) 80 °C, 24 h; (e) 80 °C, 24 h followed by cooling to 30 °C.

incubation at 80 °C (Figure 2). This result suggested a more conserved residual structure in Cyt-PEG₅₀₀₀, which in turn could be the responsible for the thermotolerant activity found.

Urea denaturation studies of Cyt have shown that the unfolding proceeds through at least two intermediate states (48) while guanidine hydrochloride (GuHCl) denaturation has been considered as a two-state transition (49). Additionally, at least three intermediate states have been reported on unfolding of horse heart cytochrome *c*, which result from the cooperative unfolding of one or more of four known structural units (37). In this work we carried out the chemical denaturation of unmodified and modified cytochrome *c* with GuHCl and monitored the unfolding process through fluorescence and CD (Figure 3). For both preparations unfolding was found to be fully reversible. Denaturation data of Cyt fit into a two-state model, showing a highly cooperative transition between 1.6 and 2.8 M GuHCl. On the other hand, Cyt-PEG denaturation fit into a three-state model and the unfolding was less cooperative, showing a first transition

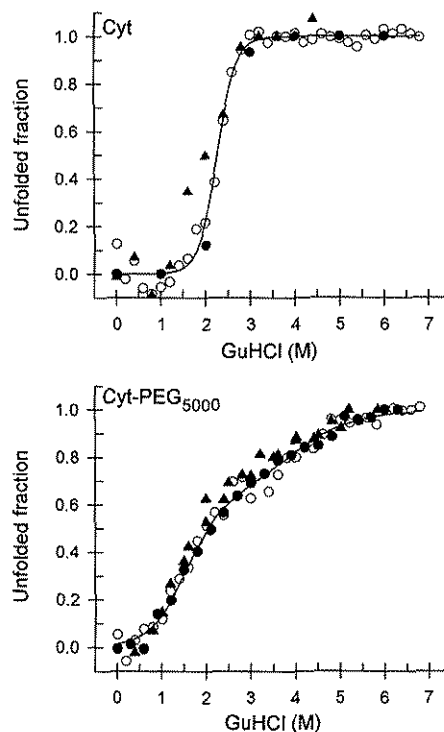


Figure 3. Equilibrium unfolding of Cyt and Cyt-PEG₅₀₀₀ after chemical denaturation by guanidine hydrochloride. Experimental data were fitted to a two-state model for Cyt and to a three-state model for Cyt-PEG₅₀₀₀. Unfolding was followed by (○) fluorescence, (●) circular dichroism, and (▲) specific activity; (—) fit to a two-state model for Cyt and to a three-state model for Cyt-PEG₅₀₀₀.

between 0.6 and 2.2 M GuHCl and a second one between 3.4 and 4.8 M GuHCl. It is important to note that the loss of activity precede the loss of structure in the unmodified cytochrome and is less cooperative, while in the PEG-modified protein the activity is strongly associated to the loss of structure. The appearance of the intermediate state may explain the activity found at high temperature in the case of Cyt-PEG₅₀₀₀.

The thermodynamic parameters for the unfolding of Cyt and Cyt-PEG₅₀₀₀ presented in Table 4 were calculated by fitting experimental data to the corresponding unfolding models (see Figure 3). The global unfolding free-energy for Cyt was estimated to be 6.4 kcal/mol which is close to the reported value of 7.27 kcal/mol (50, 51). The calculated $\Delta(\Delta G)_{25^\circ\text{C}}$ between the unmodified and the chemically modified preparations was 1.36 kcal/mol, indicating a reduced thermodynamic stability for Cyt-PEG₅₀₀₀, which is contradictory to the higher stability conferred by the chemical modification on cytochrome activity. A striking difference between the denaturation profiles of Cyt and Cyt-PEG₅₀₀₀ is the absence of a well-

Table 4. Thermodynamic Unfolding Parameters of Cyt and Cyt-PEG₅₀₀₀ at 25 °C

parameter	Cyt ^a	parameter	Cyt-PEG ^b
ΔG_{nu} (kcal/mol)	6.4 (\pm 0.8)	ΔG_{n1} (kcal/mol)	2.19 (\pm 0.15)
m_{nu} (kcal/mol/M)	2.83 (\pm 0.34)	m_{n1} (kcal/mol/M)	1.45 (\pm 0.14)
$[\text{GuHCl}]_{1/2m_{\text{nu}}}$ (M)	2.27	ΔG_{n2} (kcal/mol)	2.85 (\pm 0.55)
		m_{n2} (kcal/mol/M)	0.76 (\pm 0.09)
		Z parameter	0.58 (\pm 0.08)
		global $\Delta G_{25^\circ\text{C}}$ (kcal/mol)	5.04 (\pm 0.6)
		$[\text{GuHCl}]_{1/2m_{\text{n1}}}$ (M)	1.51
		$[\text{GuHCl}]_{1/2m_{\text{n2}}}$ (M)	3.75

^a Data were calculated using a two-state model. ^b Data were calculated using a three-state model.

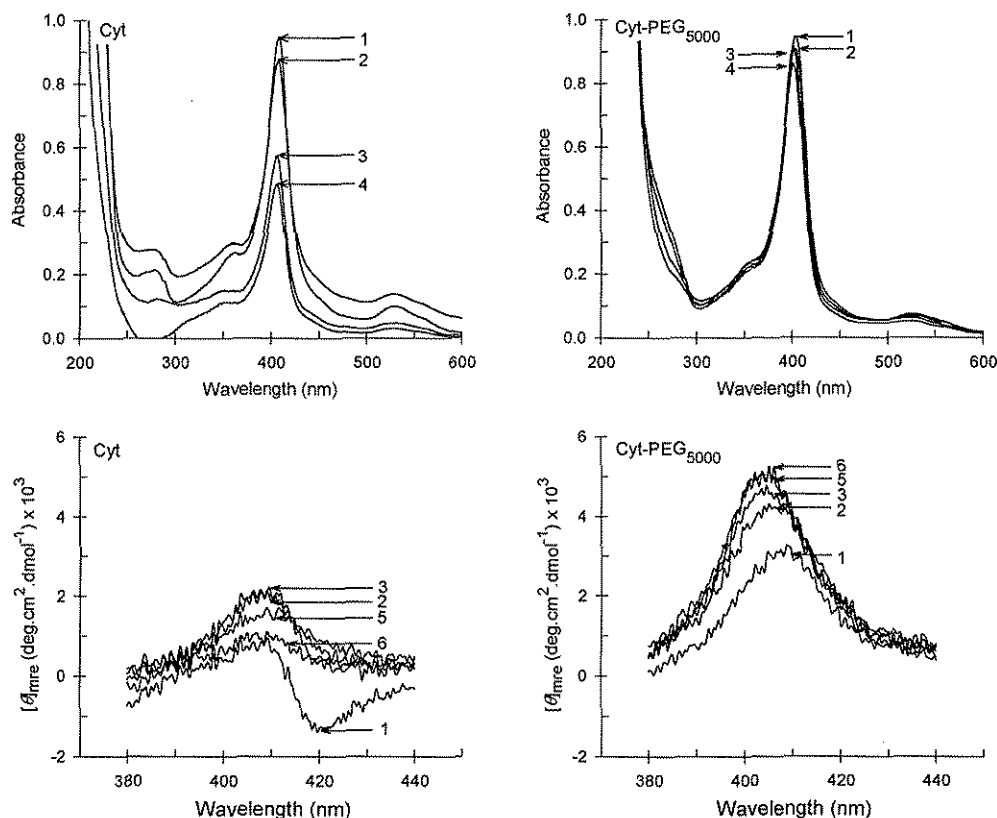


Figure 4. UV-visible (top panels) and CD (bottom panels) spectra of cytochrome *c* and Cyt-PEG₅₀₀₀ preparations. Scans were obtained after samples were incubated under following conditions: (1) 10 min at 30 °C; (2) 10 min at 80 °C; (3) 7 h at 80 °C; (4) 7 h at 80 °C and cooling to 30 °C; (5) 24 h at 80 °C; (6) 24 h at 80 °C and cooling to 30 °C.

defined native baseline in the latter. This feature can be interpreted as an altered initial structure, attributable to the chemical modification, and in agreement with the lower mean residual ellipticity observed at 222 nm.

To investigate the structural implications of the chemical modification upon Cyt activity, we performed the spectrometric study of the tertiary structure around the active site. The absorption signal at 695 nm has been associated to the heme-iron coordination state and can be used to follow coupled reactions, such as Met80-heme coordination, opening of the heme crevice, and global unfolding (52). As reported previously (53), none of our Cyt-PEG₅₀₀₀ preparations presented the 695 nm band, which may be the result of the loss of the Met80-heme sixth ligand. The spectrometric analysis of Cyt at the Soret region (350–450 nm) provides a mean to probe the active site conformation (52) in a nondisruptive manner. This analysis yielded additional evidence of the intrinsic active site distortion due to the chemical modification: (a) the analysis of the active site through CD showed that the negative signal at 420 nm is lost upon Cyt chemical modification (Figure 4, bottom panels); this band reflects the heme-polypeptide interactions and can be used to measure the integrity of heme crevice (45). On the other hand, this band is irreversibly lost during heating of the unmodified cytochrome, (b) the CD spectra of Cyt-PEG₅₀₀₀ showed an enhancement of the 410 nm signal during the first 10 min at 80 °C, after which the spectra remain unchanged, suggesting a more conserved secondary structure around the heme pocket, and (c) the Soret band of the Cyt-PEG₅₀₀₀ shifted from the 410 nm maximum to 402 nm, indicating a more hydrophobic heme microenvironment. As expected, our results showed that the Soret band of Cyt disappeared irreversibly after

incubation at 80 °C, indicating the total disruption of the active site (Figure 4, top panels). On the other hand, the Soret band of Cyt-PEG₅₀₀₀ remained basically unaltered after the same treatment, reflecting the stable conformation of the active site (Figure 4). This more conserved structure around the heme could be responsible for the thermostable activity. The kinetics of unfolding of the active site was also evaluated by following the loss of the Soret band of cytochrome preparations. The results obtained indicated a half-life of 167 h for Cyt-PEG₅₀₀₀ at 80 °C, while for Cyt it was only 42 h under the same conditions. Thus, our results suggest that PEG acts as a cage in which the destabilized structure of Cyt-PEG₅₀₀₀ is trapped. In other words, the polymer works as a kinetic trap stabilizing an intermediate state upon unfolding of the modified protein. This catalytically active intermediate state may arise from a more conserved structure around the active site and seems to be responsible for the activity found after long periods of incubation at high temperature.

The conformation of PEG in aqueous solutions ranges from a random coil to a helix in which oxygen acts as an anchor for hydrogen bond formation. In fact, it has been demonstrated that each residue of ethylene in PEG is able to hydrogen-bond from two to three water molecules (42, 54). It has also been found that PEG is flexible in nonpolar solvents and rigid in aqueous solutions. This entropy loss is explained by an increase in the water structure around the hydrophilic region of PEG and to a lesser extent in the hydrophobic region (55). Thus, the mechanism of stabilization of poly(ethylene glycol) seems to be due to the adduct amphiphilicity (16). A primary shield of rigid water molecules solvate the hydrophilic region of bound PEG, helping to maintain the structure

of the protein, whereas the hydrophobic regions in PEG interact with the hydrophobic clusters on protein surface. Those sets of interactions would produce a shell-like structure in which PEG is coiled on the protein surface avoiding direct contact with water molecules in the solvent and producing a more conserved structure around heme. The global effect of those interactions is a decreased unfolding rate of the active site as confirmed by UV-visible spectroscopy and CD.

CONCLUSIONS

Chemical modification with PEG has shown to be an interesting tool to enhance the kinetic stabilization of proteins and to obtain catalytic activity at very high temperatures. The polymer/protein ratio and the modification sites seem to be determinant factors on the protein stabilization. The absence of polymer near the active site is desirable in order to achieve higher stability. Contrary to what we expected, the overall effect of chemical modification was a thermodynamic destabilization of the protein conformation. However, the polymer also works as a cage in which the destabilized structure is trapped. This cage increases the activation barrier, and thus the resulting structure can stand longer times under destabilizing conditions. Our results suggest that the peroxidase activity found for Cyt-PEG₅₀₀₀ at hyperthermophilic conditions might be the result of two factors, a more conserved structure of the heme pocket and a decreased unfolding rate of the active site. A thermostable biocatalyst obtained by chemical modification of cytochrome *c* and with enhanced activity on hydrophobic substrates may have potential industrial applications.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Prof. Michael A. Pickard for the critical reading and discussion on protein thermostabilization, and Dr. Cesar Ferreira for the mass spectroscopy analysis. This work was supported by a grant from the Mexican Oil Institute (FIES 98-110-VI) and by the National Council for Science and Technology of México (grant 3361 I-U). We acknowledge Eugenio López Bustos and Paul Gaytán for their assistance in oligonucleotide synthesis.

LITERATURE CITED

- DeSimone, L. D., and Popoff, F. (1997) *Eco-efficiency: The Business Link to Sustainable Development*, MIT Press, Cambridge, MA.
- Akanuma, S., Yamagishi, A., Tanaka, N., and Oshima, T. (1998) Serial increase in the thermal stability of 3-isopropylmalate dehydrogenase from *Bacillus subtilis* by experimental evolution. *Protein Sci.* 7, 698–705.
- Giver, L., Gershenson, A., Freskgard, P. O., and Arnold, F. H. (1998) Laboratory evolution of a thermostable enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 12809–12813.
- Zhao, H., and Arnold, F. H. (1999) Directed evolution converts subtilisin E into a functional equivalent of thermolysin. *Protein Eng.* 12, 47–52.
- Cherry, J. R., Lamsa, M. H., Schneider, P., Vind, J., Sevendsen, A., Jones, A., and Pedersen, A. H. (1999) Directed evolution of a fungal peroxidase. *Nature Biotechnol.* 17, 379–384.
- Aksoy, S., Tumturk, H., and Hasirci, N. (1998) Stability of α -amylase immobilized on poly(methyl methacrylate-acrylic acid) microspheres. *J. Biotechnol.* 60, 37–46.
- Wang, P., Sergeeva, M. V., Lim, L., and Dordick, J. S. (1997) Biocatalytic plastics as active and stable materials for biotransformations. *Nature Biotechnol.* 15, 789–793.
- Govardhan, C. P. (1999) Cross-linking of enzymes for improved stability and performance. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10, 331–335.
- St Clair, N. L., and Navia, M. A. (1992) Cross-linked enzyme crystals as robust biocatalysts. *J. Am. Chem. Soc.* 114, 7314–7316.
- Wong, S. S., and Wong, C. L. J. (1992) Chemical cross-linking and the stabilization of protein and enzymes. *Enzyme Microb. Technol.* 14, 866–874.
- Lenders, J. P., and Crichton, R. R. (1984) Thermal stabilization of amylolytic enzymes by covalent coupling to soluble polysaccharides. *Biotechnol. Bioeng.* 26, 1343–1351.
- Srivastava, R. A. K. (1991) Studies on stabilization of amylase by covalent coupling to soluble polysaccharides. *Enzyme Microb. Technol.* 13, 164–170.
- Gaertner, H. F., and Puigserver, A. J. (1992) Increased activity and stability of poly(ethylene glycol)-modified trypsin. *Enzyme Microb. Technol.* 14, 150–155.
- García, D., Ortéga, F., and Marty, J. L. (1998) Kinetics of thermal inactivation of horseradish peroxidase: stabilizing effects of methoxypoly(ethylene glycol). *Biotechnol. Appl. Biochem.* 27, 49–54.
- Hernández, M. J., Sánchez-Montero, J. M., and Sinisterra, J. V. (1999) Modification of purified lipases from *Candida rugosa* with poly(ethylene glycol): a systematic study. *Enzyme Microb. Technol.* 24, 181–190.
- Longo, M. A., and Combes, D. (1999) Thermostability of modified enzymes: a detailed study. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 74, 25–32.
- McEldoon, J. P., and Dordick, J. S. (1996) Unusual thermal stability of soybean peroxidase. *Biotechnol. Prog.* 12, 555–558.
- Sakharov, I. Y., Vesga, M. K., Galaev, I. Y., Sakharova I. V., and Pletjushkina O. Y. (2001) Peroxidase from leaves of royal palm tree *Roystonea regia*: purification and some properties. *Plant Sci.* 161, 853–860.
- Vazquez-Duhalt, R., Westlake, D. W. S., and Fedorak, P. M. (1993) Cytochrome *c* as biocatalyst for the oxidation of thiophenes and organosulfides. *Enzyme Microb. Technol.* 15, 494–499.
- Vazquez-Duhalt, R., Semple, K. M., Westlake, D. W. S., and Fedorak, P. M. (1993) Effect of water-miscible organic solvents on the catalytic activity of cytochrome *c*. *Enzyme Microb. Technol.* 15, 936–943.
- Torres, E., Sandoval, J. V., Rosell, F. I., Mauk, G., and Vazquez-Duhalt, R. (1995) Site-directed mutagenesis improves biocatalytic activity of iso-1-cytochrome *c* in polycyclic hydrocarbon oxidation. *Enzyme Microb. Technol.* 17, 1014–1020.
- Tinoco, R., and Vazquez-Duhalt, R. (1998) Chemical modification of cytochrome *c* improves their catalytic properties in oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Enzyme Microb. Technol.* 22, 8–12.
- Vazquez-Duhalt, R. (1999) Cytochrome *c* as biocatalyst. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* 7, 241–249.
- Ortiz-Leon, M., Velasco, L., and Vazquez-Duhalt, R. (1995) Biocatalytic oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by hemoglobin and hydrogen peroxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 215, 968–973.
- Torres, E. and Vazquez-Duhalt, R. (2000) Chemical modification of hemoglobin improves biocatalytic oxidation of PAHs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273, 820–823.
- Villegas, A., Mauk, G., and Vazquez-Duhalt, R. (2000) A cytochrome *c* variant resistant to heme degradation by hydrogen peroxide. *Chem. Biol.* 7, 237–244.
- Abuchowski, A., van Es, T., Palczuk, N. C., and Davis, F. F. (1977) Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of poly(ethylene glycol). *J. Biol. Chem.* 252, 3578–3581.
- Habeeb, A. F. S. A. (1966) Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzenesulfonic acid. *Anal. Biochem.* 14, 328–336.
- Horton, R. M., and Pease, L. R. (1991) Recombination and mutagenesis of DNA sequences using PCR. *Directed mutagenesis. A practical approach*, McPherson, M. J., Ed.; pp 217–247. IRL Press, Oxford, UK.

- (30) Pollock, W. B., Rosell, F. I., Twitchett, M., Dumont, M., and Mauk, A. G. (1998) Bacterial expression of a mitochondrial cytochrome *c*. Trimethylation of Lys72 in yeast iso-cytochrome *c* and the alkaline transition. *Biochemistry* 37, 6124–6131.
- (31) Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K. (1999) *Short protocols in molecular biology*, Wiley & Sons, Inc., New York.
- (32) Margoliash, E., and Schejter, A. (1966) Cytochrome *c*. *Adv. Protein. Chem.* 21, 113–286.
- (33) Ahmad, A., Madhusudanan, K. P., and Bhakuni, V. (2000) Trichloroacetic acid and trifluoroacetic acid-induced unfolding of cytochrome *c*: stabilization of a natively folded intermediate. *Biochim. Biophys. Acta* 1480, 201–210.
- (34) Vazquez-Duhalt, R., Westlake, D. W. S., and Fedorak, P. M. (1994) Lignin peroxidase oxidation of aromatic compounds in systems containing organic solvents. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 459–466.
- (35) Ionescu, R., Smith, V. F., O'Neill, J. C., Jr., and Mathews, R. (2000) Multistate equilibrium unfolding of *Escherichia coli* dihydrofolate reductase: thermodynamic and spectroscopic description of the native, intermediate, and unfolded ensembles. *Biochemistry* 39, 9540–9550.
- (36) Louie, G. V., and Brayer, G. D. (1990) High-resolution refinement of yeast iso-1-cytochrome *c* and comparisons with other eukaryotic cytochromes *c*. *J. Mol. Biol.* 214, 527–555.
- (37) Xu, Y., Mayne, L., and Englander, W. (1998) Evidence for an unfolding and refolding pathway in cytochrome *c*. *Nature Struct. Biol.* 5, 774–778.
- (38) Longo, M. A., and Combes, D. (1997) Influence of surface hydrophilic/hydrophobic balance on enzyme properties. *J. Biotechnol.* 58, 21–32.
- (39) Vazquez-Duhalt, R., Fedorak, P. M., and Westlake, D. W. S. (1992) Role of enzyme hydrophobicity in biocatalysis in organic solvents. *Enzyme Microb. Technol.* 14, 837–841.
- (40) Inada, Y., Takahashi, K., Yoshimoto, T., Ajima, A., Matsushima, A., and Saito, Y. (1986) Application of poly(ethylene glycol)-modified enzymes in biotechnological processes: organic solvents-soluble enzymes. *Trends Biotechnol.* 4, 190–194.
- (41) Torres, E., Tinoco, R., and Vazquez-Duhalt, R. (1996) Solvent hydrophobicity predicts biocatalytic behaviour of lignin peroxidase and cytochrome *c* in aqueous solution of water-miscible organic solvents. *J. Biotechnol.* 49, 59–67.
- (42) Liu, K. J., and Parsons, J. L. (1969) Solvents effects on the preferred conformation of poly(ethylene glycols). *Macromolecules* 2, 529–533.
- (43) Varalakshmi, P., Lathika, K. M., Raghavan, K. G., and Singh, B. B. (1995) Altered physicochemical characteristics of polyethylene glycol linked beet stem oxalate oxidase. *Biotechnol. Bioeng.* 46, 254–257.
- (44) Endo, S., Nagayama, K., and Wada, A. (1985) Probing stability and dynamics of proteins by protease digestion I: comparison of protease susceptibility and thermal stability of cytochromes *c*. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 3, 409–421.
- (45) Myer, Y. P. (1978) Circular dichroism spectroscopy of hemoproteins. *Methods Enzymol.* 54, 249–17.
- (46) Woody, R. W. (1995) Circular Dichroism. *Methods Enzymol.* 246, 34–71.
- (47) Greenfield, N. J. (1996) Methods to estimate the conformation of proteins and polypeptides from circular dichroism data. *Anal. Biochem.* 235, 1–10.
- (48) Myer, Y. P., McDonald, L. H., Verma, B. C., and Pande, A. (1980) Urea denaturation of horse heart ferricytochrome *c*. Equilibrium studies and characterization of intermediate forms. *Biochemistry* 19, 199–207.
- (49) Puetz, D. (1973) The equilibrium unfolding parameters of horse and sperm whale myoglobin. Effects of guanidine hydrochloride, urea and acid. *J. Biol. Chem.* 248, 4623–4634.
- (50) Knapp, J. A., and Pace, C. N. (1974) Guanidine hydrochloride and acid denaturation of horse, cow, and *Candida krusei* cytochromes *c*. *Biochemistry* 13, 1289–1294.
- (51) Saito, Y., and Wada, A. (1983) Comparative study of GuHCl denaturation of globular proteins. I. Spectroscopic and chromatographic analysis of the denaturation curves of ribonuclease A, cytochrome *c*, and pepsinogen. *Biopolymers* 22, 2105–2122.
- (52) Nall, B. T. (1996) Cytochrome *c* folding and stability. *Cytochrome c*. A multidisciplinary approach (Scott, R. A., and Mauk, G., Eds.) pp 167–200, University Science Books, Sausalito, CA.
- (53) Busi, E., Howes, B. D., Pogni, R., Basosi, R., Tinoco, R., and Vazquez-Duhalt, R. (1999) Modified cytochrome *c*/H₂O₂ system: spectroscopic EPR investigation of the biocatalytic behaviour. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic.* 9, 39–48.
- (54) Donato, I. D., Magazú, S., Maisano, G., Majolino, D., Migliardo, P., and Pollicino, A. (1996) Hydration phenomena and hydrogen bond connectivity in polymeric aqueous solutions. *Mol. Phys.* 87, 1463–1469.
- (55) Tasaki, K. (1996) Poly(oxyethylene)-water interactions: a molecular dynamics study. *J. Am. Chem. Soc.* 118, 8459–8469.

BC025561P