

## Resumen

Durante este proyecto de tesis se ha desarrollado un novedoso soporte bifuncional para la inmovilización de proteínas, que permite combinar las ventajas de la unión sitio específica con las de la inmovilización covalente multipuntual. El mismo contiene: i) una pequeña proporción de grupos tiol-reactivos, y ii) un alto número de grupos epóxidos. La optimización de su síntesis se llevó a cabo utilizando ditioneitol o sulfuro sódico como agentes tiolantes, y resinas acrílicas (Eupergit C, EP-Sepabeads) como matrices epoxiactivadas.

La inmovilización en este tipo de soportes es un proceso en dos etapas. Primero la proteína es inmovilizada en forma reversible a través de un intercambio tiol-disulfuro entre los grupos tiol de la enzima y los grupos tiol-reactivos del soporte bajo condiciones suaves de temperatura (24 °C) y pH (7.0). Luego, en una segunda etapa los grupos epóxido remanentes del soporte son capaces de formar uniones irreversibles intramoleculares con los grupos nucleofílicos superficiales de la enzima (principalmente residuos de lisina), debido a su proximidad. Este mecanismo en dos etapas fue verificado por medio del estudio del proceso de inmovilización de proteínas modelo: i) que presentan naturalmente grupos tiol superficiales ( $\beta$ -galactosidasa de *Escherichia coli*), y ii) cuyos grupos tiol necesitan ser generados por reducción de disulfuros nativos ( $\beta$ -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis*) o por tiolación con SPDP (penicilina G acilasa de *E. coli* y lipasa de *Rhizomucor miehei*). A su vez, estudios de inactivación térmica demostraron que las uniones adicionales multipuntuales que se establecen durante la segunda etapa de la inmovilización, son las responsables de un incremento en la estabilidad de las enzimas inmovilizadas con respecto a las enzimas solubles o a las inmovilizadas únicamente a través de enlaces disulfuros.

Dado que la presencia de grupos sulfhidrilo en la superficie de la estructura proteica es una condición esencial para el uso de este nuevo soporte mixto, en el desarrollo de esta tesis se estudiaron en forma complementaria dos estrategias para la generación de grupos tiol: i) por reducción de puentes disulfuros, y ii) por mutagénesis dirigida. Es así que por un lado, se evaluó el uso de tiopropil-agarosa, para la obtención de grupos sulfhidrilo por reducción de disulfuros proteicos, como una alternativa al uso de reductores solubles. A su vez, con el fin de poder controlar totalmente la orientación proteica sobre los soportes desarrollados, se estudió la viabilidad de introducir residuos de cisteína en la PGA de *E. coli* por medio de mutagénesis dirigida. Si bien los resultados obtenidos son muy preliminares, los mismos alientan a la realización de investigaciones que permitan estudiar el efecto que podría tener en la estabilidad enzimática, el inmovilizar la PGA por distintas zonas de su superficie en los soportes desarrollados.