

Sumario

19103

páginas

<u>Resumen</u>	1
1- <u>Capítulo 1: "Generalidades sobre la inmovilización de enzimas"</u>	2-16
1.1- Introducción	2
1.2- ¿Porqué inmovilizar enzimas?	2
1.3- Inmovilización de enzimas	3
1.3.1- El soporte	3
1.3.1.1- Soportes inorgánicos	5
1.3.1.2- Polimeros naturales como soportes	5
1.3.1.3- Polimeros sintéticos como soportes	6
1.3.2- Métodos de inmovilización	6
1.3.2.1- Adsorción	7
1.3.2.2- Inclusión en geles	7
1.3.2.3- Retención por membrana	8
1.3.2.4- Unión covalente	8
1.3.2.5- Entrecruzamiento	9
1.4- Aplicaciones de los biocatalizadores inmovilizados	9
1.4.1- Aplicación a nivel industrial	11
1.4.2- Aplicaciones analíticas	12
1.4.3- Aplicaciones médicas	14
1.5- Importancia del desarrollo de nuevos métodos de inmovilización de enzimas	16
<u>Objetivos generales de la presente tesis</u>	17
2- <u>Capítulo 2: "Obtención de un nuevo soporte epóxido parcialmente sustituido con grupos tiol reactivos"</u>	18-47
2.1- Introducción	18
2.1.1- Uso de soportes epóxido para la inmovilización covalente de enzimas	18
2.1.2- Inmovilización enzimática en soportes epóxido monofuncionales e hidrofóbicos	19

2.1.3-	Estabilización enzimática por unión covalente multipuntual en soportes epóxido	20
2.1.4-	Soportes epóxido multifuncionales para la inmovilización de proteínas	21
2.1.5-	¿Por qué la necesidad de la inmovilización orientada de proteínas?	22
2.1.6-	Un nuevo soporte epóxido bifuncional para la inmovilización orientada de proteínas	23
2.2-	Objetivos específicos del presente capítulo	25
2.3-	Materiales	26
2.4-	Métodos	26
2.5-	Resultados y Discusión	33
2.5.1-	Tiolación parcial de los grupos epóxido del soporte	33
2.5.2-	Etapa de inmovilización covalente reversible	36
2.5.3-	Etapa de inmovilización covalente irreversible "intramolecular"	39
2.5.4-	Estabilidad térmica de los derivados enzimáticos	44
2.6-	Conclusiones	47
3-	Capítulo 3: "Obtención de grupos tiol en proteínas por reducción de disulfuros nativos"	48-68
3.1-	Introducción	48
3.1.1-	Reducción de disulfuros por reacciones de intercambio tiol-disulfuro	48
3.1.1.1-	Uso de agentes reductores solubles	48
3.1.1.2-	Uso de agentes reductores insolubles	49
3.2-	Objetivos específicos del presente capítulo	52
3.3-	Materiales	53
3.4-	Métodos	53
3.5-	Resultados y Discusión	56
3.5.1-	Estudio comparativo de la reducción de proteínas con DTT y tiopropil-agarosa	56
3.5.1.1-	Reducción de β -lactoglobulina	56
3.5.1.2-	Reducción de β -galactosidasa de <i>K. lactis</i>	58
3.5.1.3-	Reducción de la fracción γ -globulina de suero bovino	59
3.5.2-	Estudio de la estabilidad de los grupos sulfhidrilo generados por reducción	65
3.5.2.1-	Estabilidad de los grupos sulfhidrilo de β -lactoglobulina reducida	65

3.5.2.2-	Estabilidad de los grupos sulfhidrilo de β -galactosidasa reducida	66
3.5.2.3-	Estabilidad de los grupos sulfhidrilo de γ -globulinas reducidas	66
3.6-	Conclusiones	68
4-	<u>Capítulo 4: "Introducción de grupos tiol en posiciones precisas de la superficie proteica por mutagénesis dirigida"</u>	69-87
4.1-	Introducción	69
4.2-	Objetivos específicos del presente capítulo	71
4.3-	Materiales	72
4.4-	Métodos	72
4.5-	Resultados y Discusión	75
4.5.1-	Análisis de la superficie de la PGA	75
4.5.2-	Simulación por dinámica molecular de enfriamiento lento	76
4.5.2.1-	Validación del protocolo de dinámica molecular	77
4.5.2.2-	Aplicación del protocolo de dinámica molecular optimizado a la PGA mutada	80
4.5.3-	Obtención de PGA mutada	85
4.6-	Conclusiones	87
5-	<u>Conclusiones generales</u>	88
6-	<u>Proyecciones de esta tesis</u>	91
6.1-	Inmovilización orientada y simultánea estabilización de proteínas recombinantes	91
6.1.1-	Inmovilización de PGA de <i>E. coli</i> recombinante por distintas zonas de su superficie y su efecto en la estabilidad enzimática.	91
6.1.2-	Diseño de biotransformaciones catalizadas por lipasas inmovilizadas en medio acuoso (hidrólisis enantioselectiva de ésteres quirales)	92
7-	<u>Agradecimientos</u>	94
8-	<u>Bibliografía</u>	96