

RESUMEN

Muchos de los procesos en los cuales sería conveniente el uso de enzimas requieren condiciones de trabajo que generalmente son adversas para la estabilidad de las mismas. Además el alto costo y la dificultad para regenerarlas condicionan sus posibilidades de aplicación. Los estudios realizados en esta tesis se orientaron hacia la búsqueda y caracterización de estrategias de estabilización de enzimas mediante procesos de ingeniería enzimática en fase sólida. En particular se estudió la influencia de los siguientes factores: i) inmovilización de la enzima; ii) modificación post-inmovilización de la superficie del soporte; iii) recubrimiento de la enzima inmovilizada con polímeros hidrofílicos. Se determinaron los parámetros de inmovilización de todos los derivados obtenidos, y se hicieron estudios de estabilidad térmica y estabilidad en presencia de sistemas de co-solventes orgánicos, con cada uno de ellos. Como enzimas modelo se utilizaron tres β -galactosidasas de diferentes orígenes (*E. coli*, *K. lactis* y *A. oryzae*).

Se estudiaron dos químicas de inmovilización distintas: en glutaraldehído (Glut)-agarosa, elegida como método de referencia por ser convencional y ampliamente estudiado; y en tiolsulfonato (TSI)-agarosa, que es un método relativamente nuevo, desarrollado y estudiado en nuestro laboratorio, que utiliza condiciones de inmovilización suaves. En general, los derivados obtenidos con la química del TSI tuvieron rendimientos de inmovilización mayores, y sus K_M fueron menos afectadas que las de los derivados obtenidos con la química del glutaraldehído. Sin embargo, estos últimos exhibieron mejores propiedades de estabilidad térmica y frente a solventes, lo que los hace más adecuados para biocatálisis bajo condiciones agresivas. Estos resultados demostraron la relevancia de la química de inmovilización en el diseño del biocatalizador.

Para modificar las características de la superficie del soporte TSI-agarosa, luego de la inmovilización de la enzima se hizo reaccionar el exceso de grupos TSI con cuatro tiol-compuestos. De esta manera se consiguió construir en el entorno de la enzima, cinco nano-ambientes con características diferentes. El comportamiento diferencial de los derivados obtenidos en los estudios de estabilidad térmica y frente a solventes orgánicos, sugiere que cada nano-ambiente contribuye de forma distinta a la estabilidad de la enzima, dependiendo de las condiciones de desnaturalización. Es decir que resulta posible modelar las características de la superficie del soporte, con el fin de maximizar la estabilidad de la enzima para usarla en una aplicación en particular.

La inmovilización en Glut-agarosa demostró ser efectiva para alcanzar estabilización térmica, aún a altas temperaturas; sin embargo no siempre resultó efectiva frente al aumento de la concentración de los co-solventes. La hidrofiliación de los derivados inmovilizados en Glut-agarosa con polímeros de polialdehído-dextrano y poliamina-dextrano, permitió una importante estabilización frente a concentraciones altas de co-solventes; no obstante, la estabilización alcanzada frente al aumento de la temperatura fue menor. Uno de los resultados más destacables fue el aumento de la vida media del derivado hiper-hidrofiliado de la enzima de *A. oryzae*, en presencia de 50% v/v de acetona, en un factor de 25 respecto al derivado sin modificar. Los resultados obtenidos muestran el potencial de esta estrategia de hidrofiliación como una herramienta útil para alcanzar estabilización adicional de las enzimas inmovilizadas, frente a condiciones drásticas de concentración de co-solventes.

Los estudios realizados en esta tesis permiten afirmar que es posible el diseño orientado de biocatalizadores en función de sus aplicaciones, mediante diversos procesos de ingeniería de la enzima en fase sólida.