



Universidad de Concepción
Facultad de Ciencias Químicas
Concepción - Chile



Tesis Para Optar al Grado de
Doctor en Ciencias con Mención en Química

“Inmovilización de Proteínas con Actividad Peroxidasa en Nanoestructuras y sus
Aplicaciones Sobre Reacciones de Epoxidación de Olefinas”

Sr. Sergio Andrés Águila Puentes

Marzo 2010



Resumen

Las enzimas son ampliamente utilizadas para la obtención de compuestos intermediarios quirales, tales como los derivados epoxidados que son necesarios para la industria farmacéutica, perfumes y química fina, entre otras. En particular, las peroxidases han sido empleadas en la obtención de epóxidos. Sin embargo la eficiencia de estas reacciones se ve severamente limitada ya que estas enzimas pierden su actividad durante la catálisis.

En esta tesis se han explorado dos maneras de aumentar la actividad y estabilidad enzimática, la primera mediante el uso de variantes obtenidas a partir de mutaciones dirigidas y la segunda por medio de la inmovilización de las enzimas nativas en soportes inertes.

El efecto de algunas mutaciones sobre la actividad peroxidasa en estireno fue estudiada en variantes de iso-1-citocromo c. Estudios de Dinámica Molecular han permitido racionalizar los resultados en términos de los cambios conformacionales asociados a las mutaciones. Además, se ha desarrollado un modelo estructural que permitió estudiar los posibles mecanismos de activación enzimática con H_2O_2 y la oxidación estireno. Los estudios de los mecanismos de activación y oxidación se realizaron a nivel químico-cuántico empleando el método semiempírico PM6.

Los efectos de la inmovilización sobre la actividad catalítica y estabilidad de las enzimas fueron estudiados mediante la inmovilización de iso-1-citocromo c de *S. cerevisiae* y cloroperoxidasa de *C. fumago* en los soportes nanoestructurados MCM-41, SBA-15 y MCF y su reacción con los siguientes monoterpenos: R-limoneno, S-limoneno y R-carvona. Se observó que el grado de inmovilización en los soportes nanoestructurados depende del diámetro de poro y que hay un aumento de actividad debido a la inmovilización. También la inmovilización mejora la estabilidad de las enzimas frente al aumento de solvente orgánico en el medio de reacción.

Summary

Enzymes are extensively used to obtain chiral intermediate compounds, such as epoxide derivatives. These compounds are necessary for the pharmaceuticals, perfumes, fine chemistry and other industries. Particularly, peroxidases have been used to obtain epoxide derivatives. However, the efficiency of the reactions has been highly limited because these enzymes lost activity during catalysis.

In this thesis two of the ways for increasing enzymatic activity and stability have been explored. The first is through directed mutations and the second by immobilization in inert support.

The effects of some mutations on peroxidase activity toward styrene from iso-1-cytochrome c variants were studied. Molecular dynamics have helped to rationalize the results in terms of conformational changes associated with mutations. Also, a structural model that allowed to study the feasible mechanisms has been developed for the enzymatic activation by H₂O₂ and the oxidation of styrene. Studies of activation and oxidation mechanisms were carried out using PM6 semiempirical quantum chemical method.

The effects of immobilization on the catalytic activity and stability of enzymes were studied. Iso-1-cytochrome c from *S. cerevisiae* and chloroperoxidase from *C. fumago* were immobilized in MCM-41, SBA-15 and MCF. Also, reactions of R-(+)-limonene, S-(-)-limonene and R-(-)-carvone were studied with free enzymes. It was observed that the degree of immobilization in nanostructured supports depends on the pore diameter. There is an activity increase as a result of immobilization. Immobilization also improves the stability of enzymes against increased organic solvent in the reaction media.