

DISEÑO RACIONAL DE LA INMOVILIZACIÓN DE PROTEÍNAS: APLICACIONES EN CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD Y BIOCONVERSIÓN ENZIMÁTICA

Rational design of protein immobilization: applications on affinity chromatography and enzymatic bioconversion

Alberto del Monte-Martínez, Bessy Cutiño-Avila, Jorge González-Bacero, María de los
Ángeles Chávez Planes y Joaquín Díaz Brito⁵

Resumen

La inmovilización es una de las tecnologías dirigidas a enfrentar las limitaciones de uso práctico de las enzimas en esferas como la industria. Entre las ventajas que confiere la inmovilización se encuentran: la posibilidad de recuperar la enzima del medio de reacción, la obtención de un producto no contaminado con la enzima, y el incremento de la estabilidad operacional del biocatalizador. Tradicionalmente, la optimización de los procesos de inmovilización se ha realizado de manera empírica, con la consiguiente pérdida de recursos y tiempo que implica este método. Por esta razón, hemos desarrollado una estrategia para el diseño racional de derivados de proteínas inmovilizadas en soportes sólidos mediante interacciones covalentes, iónicas o hidrofóbicas, en función de la aplicación práctica del derivado inmovilizado. Dicha estrategia incluye la generación de algoritmos matemáticos y herramientas bioinformáticas que permiten: (i) obtener información teórica sobre algunas propiedades de la proteína y del soporte que son relevantes para la optimización de la inmovilización, (ii) predecir la carga máxima de proteína necesaria para obtener un derivado inmovilizado con propiedades funcionales óptimas, y (iii) predecir las configuraciones más probables del sistema proteína-soporte en función del pH. Esta nueva metodología se validó mediante la comparación entre los valores de los parámetros de inmovilización predichos y los determinados experimentalmente en nuestro grupo u otros laboratorios. Mediante la aplicación de esta estrategia a enzimas de relevancia industrial, hemos obtenido derivados inmovilizados catalíticamente competentes y funcionalmente eficientes, aptos para su uso en procesos de cromatografía de afinidad y bioconversión enzimática. En esta revisión se presenta la consolidación de nuestras actividades de investigación entre 2006 y 2014 en el diseño racional de la inmovilización de proteínas. Los resultados obtenidos fueron acreedores de un Premio Anual de la Academia de Ciencias de Cuba en 2012.

Palabras clave: Inmovilización de proteínas, diseño racional, algoritmos matemáticos, bioinformática, cromatografía de afinidad, bioconversión enzimática.

Abstract

Immobilization is one of the technologies directed to overcome the limitations of practical use of enzymes in fields such as industry. Among the advantages that immobilization confers are:

the possibility of enzyme recovery from reaction medium, the obtainment of a non enzyme-contaminated product, and the increase of the biocatalyst operational stability. Usually, the optimization of immobilization processes has been made in an empirical way, causing the loss of money and time. For this reason, we have developed a strategy for the rational design of derivatives of proteins immobilized on solid supports by covalent, ionic or hydrophobic interactions, in function of the practical application of the immobilized derivative. This strategy includes the generation of mathematical algorithms and bioinformatics tools that allow: (i) to obtain theoretical information about some properties of the protein and the support, which are relevant to optimize the immobilization, (ii) to predict the maximal protein load that is necessary to obtain an immobilized derivative with optimal functional properties, and (iii) to predict the most probable configurations of the protein-support system in function of pH. This novel methodology was validated comparing the predicted values of the immobilization parameters with the ones determined experimentally in our group or other laboratories. Through the application of this strategy to enzymes of industrial relevance, we have obtained immobilized derivatives which are catalytically competent and functionally efficient, suitable for their use in processes of affinity chromatography and enzymatic bioconversion. This review presents the consolidation of our research activities between 2006 and 2014 in the field of rational design of protein immobilization. The obtained results were recognized with an Annual Prize of the Cuban Academy of Sciences in 2012.

Keywords: Protein immobilization, rational design, mathematical algorithms, bioinformatics, affinity chromatography, enzymatic bioconversion.

Introducción

La inmovilización de proteínas es el proceso que permite limitar la movilidad de estas biomoléculas mediante su confinamiento en el espacio o unión a una superficie sólida. Esta tecnología es una de las más empleadas para aumentar la estabilidad operacional de las proteínas y potenciar su uso en la síntesis de matrices de afinidad, biocatalizadores para la bioconversión enzimática y otras aplicaciones analíticas y biomédicas [1-3]. Entre las principales industrias que utilizan enzimas inmovilizadas se encuentran la Química, Farmacéutica, Alimentaria y de tratamiento de aguas residuales [4]. Debido al alto costo de las proteínas y los soportes, y la necesidad de aumentar la eficiencia operacional de los derivados inmovilizados, es necesario racionalizar y optimizar los procesos de obtención de estos derivados, sobre la base de sus características físico-químicas y aplicaciones.

Los métodos comunes de inmovilización conducen frecuentemente a bajas actividades biológicas de las proteínas, debido a la destrucción o bloqueo de sus sitios activos por la unión al soporte. A pesar de ello, prácticamente no se han realizado estudios dirigidos a diseñar racionalmente el proceso de inmovilización de proteínas. En su lugar, las condiciones de inmovilización (tiempo, pH, temperatura, aditivos, fuerza iónica y carga proteica) y las propiedades del soporte (forma, tamaño de poro, tamaño de partícula) se han optimizado tradicionalmente de una manera empírica [5]. Otras estrategias, basadas en la Ingeniería de Proteínas, son la evolución dirigida y la mutagénesis específica de sitio. Esta última permite controlar la orientación de la proteína durante la unión covalente al soporte [6]. Sin embargo, estos abordajes de prueba y error tiene el inconveniente de consumir recursos y tiempo, además de la dificultad de discernir entre las distintas variables que afectan el sistema.

En este trabajo se compendian los resultados obtenidos por nuestro grupo de investigación durante nueve años (2006-2014) en el Diseño Racional de Derivados Inmovilizados (DRDI). Esta novedosa estrategia parte del conocimiento previo acumulado en la síntesis de derivados inmovilizados y sus aplicaciones, y se basa en la combinación de algoritmos matemáticos y herramientas bioinformáticas que permiten el diseño de procesos de inmovilización optimizados, mediante la predicción *in silico* de las condiciones más apropiadas para inmovilizar en un soporte dado una proteína concreta para una aplicación específica. Dichas predicciones se han validado experimentalmente mediante la inmovilización de 46 proteínas en nuestro laboratorio y en otros, tanto en Cuba como en el extranjero. El método desarrollado es extensivo a la inmovilización de otras partículas como esporas y células completas. En nuestra estrategia de DRDI convergen diferentes disciplinas como la Ingeniería de Proteínas, Ingeniería Química, Química de Polímeros, Enzimología, Química de Proteínas y Biología Computacional. Entre las aplicaciones más relevantes de los derivados inmovilizados obtenidos por esta estrategia destacan la purificación de moléculas mediante cromatografía de afinidad y la obtención de principios activos mediante bioconversión enzimática.

Implementación de la estrategia de DRDI mediante el programa computacional *RDID*_{1.0}

La estrategia de DRDI permite integrar toda la información estructural sobre la proteína, el soporte y la interacción entre ambos para predecir las condiciones óptimas de

inmovilización, con el objetivo de obtener un derivado inmovilizado funcional (Fig. 1). Las características estructurales y funcionales de las proteínas utilizadas se obtuvieron de las bases de datos UniProt Knowledgebase (<http://www.uniprot.org/>) y RCSB Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb>). Los valores de pKa de los grupos ionizables de las proteínas se calcularon utilizando los servidores en línea PROPKA (<http://propka.ki.ku.dk> y <http://nova.colombo58.unimi.it/propka.htm>). Para la visualización de los archivos con extensiones “.pdb” o “.ent”, y para la representación gráfica de las estructuras de las proteínas se empleó el visor molecular PyMOL (DeLano Scientific LLC) [7-13].

En la estrategia de DRDI se desarrollaron por primera vez algoritmos matemáticos para: i) estimar el diámetro de una proteína, ii) calcular la cantidad máxima de partícula (proteínas y células) a inmovilizar por unidad de soporte (estudios de carga), iii) predecir las configuraciones más probables del sistema proteína-soporte en el derivado inmovilizado obtenido por interacciones covalentes, iónicas o hidrofóbicas, y iv) predecir la competencia catalítica y la actividad residual del derivado inmovilizado obtenido a partir de una enzima. Los algoritmos para los estudios de carga tienen varias especificidades, en dependencia del material empleado como soporte (sólidos porosos o nanopartículas) y del tipo de ligando a inmovilizar (proteínas, células, esporas).

Para estimar el diámetro (d) de una proteína de estructura tridimensional desconocida o no modelada, se desarrolló una ecuación exponencial de ajuste (EEA), construida relacionando los d y las masas molares (MW) de más de 500 proteínas de estructuras conocidas [13] (Fig. 2A). Además se desarrolló un algoritmo matemático para calcular la cantidad máxima teórica de proteína a inmovilizar (tMQ) por gramo de soporte, teniendo en cuenta el d y la MW de la proteína y el área superficial del soporte. Para ello se considera la proyección de la proteína sobre el soporte como un círculo, y se asume que toda la superficie del soporte está cubierta por moléculas proteicas. Sin embargo, para un soporte sólido poroso el parámetro tMQ se refiere a una situación ideal, en la que no se tienen en cuenta las afectaciones que sufre la inmovilización con las restricciones difusionales [7-13].

Por esta razón se definió la cantidad máxima estimada de proteína a inmovilizar (eMQ), que representa una corrección del parámetro tMQ en la que se considera la relación entre d y el diámetro de poro (PD) del soporte. Para ello se inmovilizaron 15 proteínas de diferentes MWs en el soporte Glyoxyl-Sepharose CL 4B, y para cada una se obtuvo el parámetro experimental cantidad máxima práctica de proteína inmovilizada (pMQ). Posteriormente, se determinó la función que relaciona los cocientes d/PD y pMQ/tMQ, este último denominado coeficiente de efectividad operacional (OEC) (Fig. 2B). Con esta función, y conociendo el cociente d/PD, se puede calcular el término OEC, y finalmente eMQ, para una proteína problema a inmovilizar [7-10, 12, 13]. La relación d/PD óptima para minimizar las restricciones difusionales se considera 1/20 [14], la que corresponde a un OEC de 0,45. A partir de este valor, la función comienza a alejarse de la linealidad (Fig. 2B). Cuando el OEC es inferior a 0,45 se recomienda cambiar el soporte para realizar una inmovilización óptima [13].

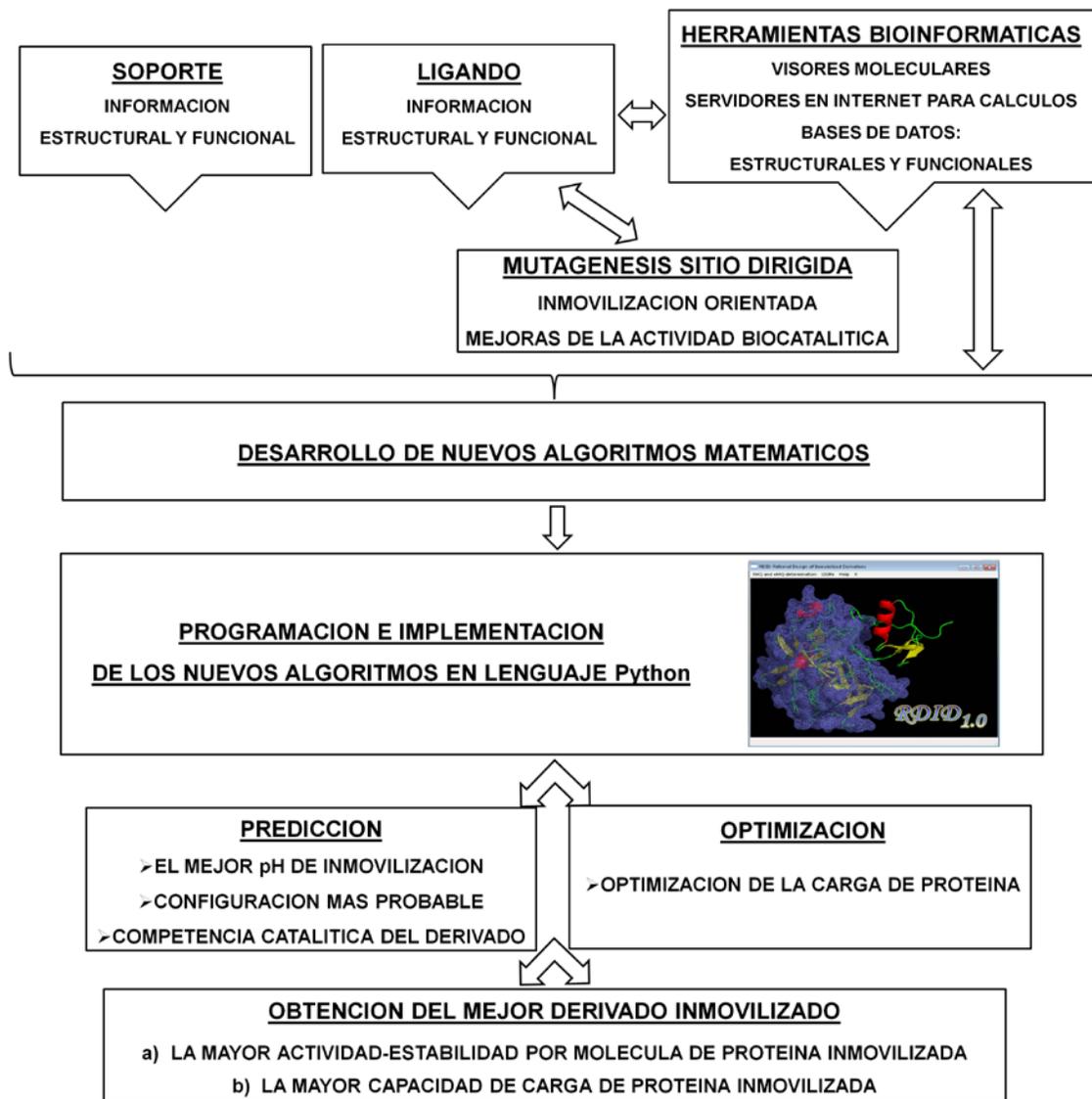


Fig. 1. Representación esquemática de la Estrategia para el Diseño Racional de Derivados Inmovilizados. [12, 13]

También se desarrollaron algoritmos de carga para la inmovilización de células y esporas en soportes porosos [9], y de proteínas en nanopartículas (soportes sólidos no porosos). En este último caso se tuvo en cuenta que los d de las nanopartículas y las proteínas son comparables, por lo que su interacción no puede considerarse proteína - superficie plana [15].

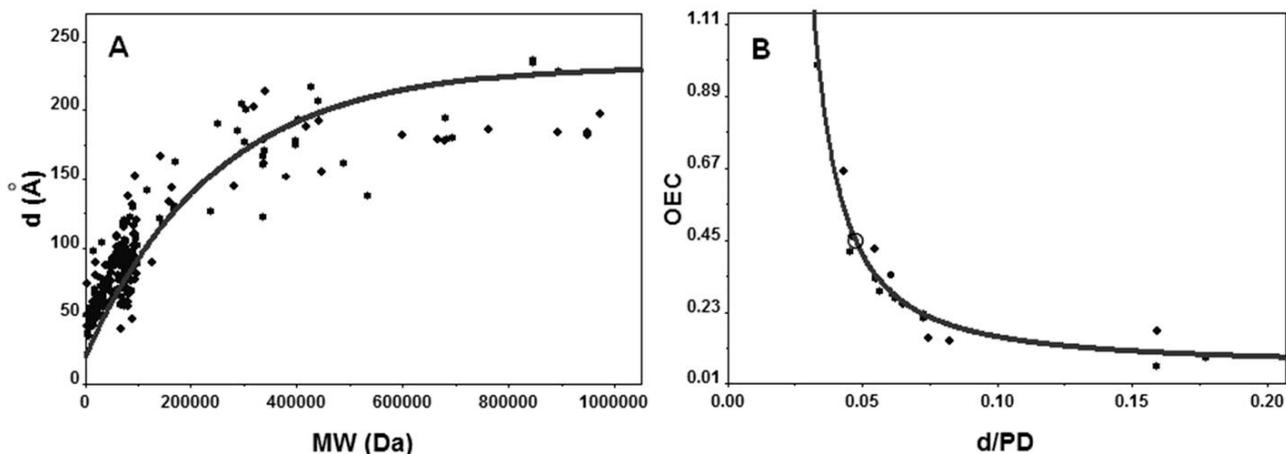


Fig. 2. A) Ecuación exponencial de ajuste para estimar el diámetro (d) de una proteína a partir de su masa molar (MW). **B)** Correlación entre el coeficiente de efectividad operacional (OEC) y la relación d / diámetro de poro (PD) del soporte. El punto señalado con (o) corresponde a la relación óptima d /PD. [13]

Otros algoritmos permiten establecer un orden de reactividad de los grupos ionizables superficiales de una proteína para la inmovilización covalente [7, 8, 10-13], o la probabilidad de interacción de estos grupos para la inmovilización mediante adsorción iónica [9, 10, 12]. En ambos casos es posible predecir el pH óptimo para la inmovilización, en función de la orientación deseada para la proteína inmovilizada. También es posible calcular la fortaleza de la interacción hidrofóbica entre el soporte y una determinada región de la proteína inmovilizada según este principio, teniendo en cuenta los índices de hidrofobicidad y las áreas relativas expuestas al solvente de los aminoácidos presentes en esa zona [12]. Es posible predecir también la probabilidad de enlace covalente multipuntual (factor esencial para incrementar la estabilidad operacional de los derivados inmovilizados), determinando el número de grupos reactivos en el área de interacción proteína-soporte, y asumiendo que dicha área constituye el 10% de la superficie de una proteína esférica [7, 8, 10, 12, 13].

Todos estos algoritmos posibilitan predecir la configuración más probable del sistema proteína-soporte en el derivado inmovilizado (importante para garantizar una interacción ligando-efector bioespecífica) [7-10, 12, 13]. Otro algoritmo desarrollado permite calcular la competencia catalítica del soporte (Supp.CC) para una enzima inmovilizada, teniendo en cuenta la posición relativa de la entrada del centro activo respecto a su posición óptima (totalmente orientada hacia el lumen del poro). Esto permite determinar la actividad residual teórica (tRA, expresada en $U \cdot g^{-1}$ de soporte), si se conoce la actividad específica de la enzima soluble [10].

Los algoritmos mencionados se implementaron en el programa computacional *RDID*_{1.0} (©2010 Enzyme Technology Group), desarrollado en lenguaje de programación wxPython, el cual es compatible con los sistemas operativos Windows y Linux. Este "software" proporciona un ambiente gráfico agradable y sencillo de operar, y constituye el primero desarrollado en el campo de la tecnología enzimática para la optimización de la inmovilización de proteínas [8-13]. Actualmente el programa *RDID*_{1.0} se utiliza en diferentes

centros de investigación a niveles nacional e internacional. También se aplica en la docencia de pre y posgrado en la Facultad de Biología de la Universidad de La Habana, específicamente en las asignaturas Ingeniería de Proteínas (carrera de Bioquímica y Biología Molecular), Métodos Biotecnológicos (Biología), Ingeniería Bioquímica (Microbiología y Virología), y Biotecnología (mención Biotecnología de la Maestría en Bioquímica).

Validación de la estrategia de DRDI con resultados experimentales

Con el objetivo de validar la estrategia de DRDI se predijeron las configuraciones más probables de los sistemas proteína-soporte para tres proteínas diferentes a inmovilizar mediante distintos métodos: (i) la fosfolipasa A₂ del veneno de la cobra india *Naja naja naja* a inmovilizar covalentemente al soporte Eupergit C, (ii) la fosfolipasa A₂ del veneno de la abeja *Apis mellifera* a inmovilizar mediante adsorción iónica al soporte AMBERLITE™ IRA900 Cl, y (iii) la lipasa tipo VII de la levadura *Candida rugosa* a inmovilizar mediante interacciones hidrofóbicas en el soporte Octyl-Sepharose CL 4B. Para los dos primeros casos, dichas estimaciones implicaron la predicción de los pHs óptimos de inmovilización, cuyos valores son 10 y 7, respectivamente. Por su parte, para la inmovilización mediante interacciones hidrofóbicas el pH se fijó en 8. Las probabilidades de las configuraciones seleccionadas son de 70, 50 y 41%, respectivamente (Fig. 3). Posteriormente, se desarrollaron en el laboratorio los protocolos de inmovilización optimizados, y se obtuvieron los correspondientes derivados inmovilizados, los cuales resultaron funcionales en la hidrólisis de fosfatidil-colina de soya (para las fosfolipasas) y de trioleína (actividad lipasa) [12].

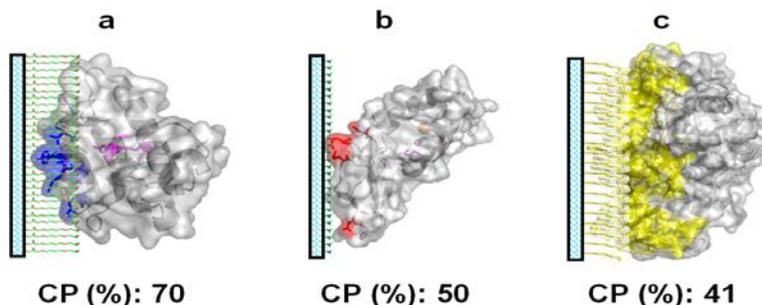


Fig. 3. Configuraciones más probables de los siguientes sistemas proteína-soporte: a) Fosfolipasa A₂ del veneno de la cobra india *Naja naja naja* (código PDB: 2WQ5; [16]) a inmovilizar covalentemente al soporte Eupergit C (activado con grupos epóxido) a pH 10 (pH estimado como óptimo para la inmovilización). Se destacan en azul los residuos aminoacídicos con mayor probabilidad de interacción con el soporte (amino terminal, lisina, tirosina y cisteína). b) Fosfolipasa A₂ del veneno de la abeja *Apis mellifera* (código PDB: 1POC; [17]) a inmovilizar mediante adsorción iónica al soporte AMBERLITE™ IRA900 Cl (grupos funcionales trimetil amonio) a pH 7 (pH estimado como óptimo para la inmovilización). Se destacan en rojo los residuos aminoacídicos con mayor probabilidad de interacción con el soporte (carboxilo terminal, aspartato, glutamato y cisteína). c) Lipasa tipo VII de la levadura *Candida rugosa* (código PDB: 1LPN; [18]) a inmovilizar mediante interacciones hidrofóbicas en el soporte Octyl-Sepharose CL 4B (grupos funcionales octilo) a pH 8. Se destacan en amarillo todos los aminoácidos presentes en el área de interacción proteína-soporte porque todos exhiben carácter hidrofóbico de acuerdo a la escala de Miyazawa-Jernigan [19]. CP: Probabilidad de la configuración seleccionada expresada en porcentaje. [12]

Como parte de la validación de la estrategia de DRDI se predijeron además las configuraciones más probables (a los pHs óptimos de inmovilización) y los valores de Supp.CC para 11 enzimas inmovilizadas por otros autores. Los resultados obtenidos se compararon con los valores informados de porcentaje de actividad recobrada en los derivados inmovilizados (Tabla I). Todas las predicciones se acercan a los valores experimentales, con un 10% de confianza para el 71% de los casos.

Tabla I. Comparación entre los valores de Supp.CC calculados mediante el programa *RDID_{1.0}* y los valores experimentales de porcentaje de actividad recobrada después de la inmovilización.

Enzima	Soporte	Act. ^a	Supp.CC ^b	Referencia
L-Asparaginasa de <i>Escherichia coli</i>	Glut-Sepharose CL 4B	90%	83%	[20]
Penicilino G Acilasa de <i>Escherichia coli</i>	Eupergit C	85%	78%	[21]
Carboxipeptidasa A de páncreas bovino	Glyoxyl-Sepharose CL 6B	86%	79%	[22]
Alcalasa comercial de Novo Nordisk A/S (Bagsvaerd, Denmark)	Glyoxyl-Sepharose CL 6B	88%	80%	[23]
Uridin nucleósido fosforilasa de <i>Bacillus subtilis</i>	Eupergit C	12%	8,8%	[24]
	Glyoxyl-Sepharose CL 4B	0%	2,3%	
Formato deshidrogenasa de <i>Pseudomonas</i> sp.	Sepabeads	30%	24%	[25]
	Glyoxyl-Sepharose CL 10B	80%	74%	
Ciclodextrina glicosil transferasa de <i>Bacillus circulans</i>	Eupergit C	7%	4,5%	[26]
	Glyoxyl-Sepharose CL 6B	70%	62%	
Glutamato deshidrogenasa de <i>Thermus thermophilus</i>	Glyoxyl-Sepharose CL 6B	90%	81%	[5]
D-aminoácido oxidasa de <i>Trigonopsis variabilis</i>	Sepabeads EC-EP	50%	47%	[27]
β -Glucosidasa de <i>Metschnikowia pulcherrima</i>	MANA-Sepharose CL 6B	95%	86%	[28]
Esterol esterasa de <i>Ophiostoma piceae</i>	Dilbeads TM TA	20%	18%	[29]

^aPorcentaje de actividad recuperada en el derivado inmovilizado respecto a la actividad inicial de la muestra soluble. ^bCompetencia catalítica del soporte.

Es notable que los valores predichos sean ligeramente inferiores a los experimentales. Esto se debe a que las configuraciones proteína-soporte que presentan la posición de la entrada del centro activo formando un ángulo mayor de 90° con la posición óptima se consideran catalíticamente incompetentes. Este presupuesto implica cierto grado de subestimación de la Supp.CC, ya que sustratos pequeños pueden tener acceso a los centros activos, aun cuando las entradas de los mismos estén orientadas en alguna medida hacia la superficie del soporte o hacia moléculas de enzima vecinas. Por otra parte, las moléculas de proteínas inmovilizadas no se distribuyen homogéneamente en toda la superficie del soporte. La mayoría de ellas queda confinada en una capa superficial de 10,5 μ m de espesor, debido a que las restricciones difusionales, la tortuosidad de los poros y los impedimentos estéricos causados por las moléculas proteicas inmovilizadas en las capas más externas dificultan el acceso al interior de las perlas del soporte. Este efecto se ha demostrado

experimentalmente para la inmovilización de tripsina en perlas de metacrilato [30], y mediante estudios de microscopía confocal para la enzima esteroesterasa inmovilizada en el soporte DilbeadsTM TA activado con grupos epóxido [29].

Aplicaciones del DRDI en cromatografía de afinidad

La cromatografía de afinidad es uno de los métodos más eficientes para la separación y purificación de proteínas. Esta técnica ha sido ampliamente utilizada para la separación de enzimas proteolíticas (empleando sustratos, sus análogos o inhibidores como ligandos) y el aislamiento de inhibidores de proteasas (usando proteasas inmovilizadas como ligandos) [31]. Muchas proteasas desempeñan funciones biológicas cruciales en los seres vivos, y las variaciones en su actividad se relacionan con diversas condiciones patológicas. Por su parte, los inhibidores de proteasas están ampliamente distribuidos en la naturaleza, y son responsables en gran medida de la regulación de la actividad proteolítica. Por estas y otras razones, la obtención de estas moléculas en forma pura es de particular importancia para la Biotecnología y la Biomedicina [32].

Aplicando la estrategia de DRDI obtuvimos matrices altamente eficientes para cromatografía de afinidad con las siguientes proteínas inmovilizadas:

1) Toxoide tetánico (TT) inmovilizado en Glyoxyl-Sepharose CL 4B para la purificación de anticuerpos policlonales. El desarrollo de vacunas contra el tétanos se basa en el uso de dos antígenos principales: TT y los polisacáridos capsulares (PC) de la bacteria *Clostridium tetani*, agente causal de la enfermedad [33]. Nuestro sistema cromatográfico permitió separar los anticuerpos anti-TT de los anti-PC a partir de una fracción de anticuerpos IgG de conejo, lo que representa una contribución importante para superar uno de los principales inconvenientes tecnológicos en este campo. La eficiencia de este derivado inmovilizado se demostró mediante la técnica de ELISA, que permitió comprobar que el 100% de los anticuerpos anti-TT se adsorbieron a la columna cromatográfica [7].

2) Bromelina y **3)** Papaína inmovilizadas en Glyoxyl-Sepharose CL 4B para la purificación de inhibidores de proteasas de tipo cisteínico. La inhibición de esta clase de enzimas es crucial para el control de diferentes procesos patológicos en humanos, como el cáncer, la neurodegeneración y enfermedades cardiovasculares [34]. Las predicciones efectuadas mediante la estrategia de DRDI plantean que, a los pHs óptimos de inmovilización, las configuraciones obtenidas son catalíticamente competentes y las cargas de ligando alcanzadas aseguran la minimización de las restricciones difusionales durante el proceso de inmovilización [8].

Aplicaciones del DRDI en bioconversión enzimática

La aplicación de la estrategia de DRDI permitió la optimización de procesos de inmovilización que condujeron a la síntesis de derivados de enzimas inmovilizadas con propiedades adecuadas para su uso como biocatalizadores. Entre las enzimas utilizadas se encuentran las siguientes.

1) Lipasas y fosfolipasas: i) La lipasas A y B del hongo *Aspergillus niger*, enzima con alto potencial para aplicaciones industriales debido a su elevada estéreo-selectividad por las posiciones *sn*-1 y *sn*-3 de los triacilglicéridos sustratos. ii) Dos fosfolipasas aisladas de la anémona marina *Stichodactyla helianthus* [12], las cuales se han aplicado a reacciones de hidrólisis de ésteres de interés para las industrias química y químico-farmacéutica [15].

2) Xilanasas, inulinasas y fructosiltransferasas [10]: enzimas más empleadas en la síntesis de prebióticos. Los prebióticos son alimentos funcionales beneficiosos que estimulan el crecimiento y/o la actividad de algunas bacterias de la microbiota intestinal [35].

3) Lacasas de los hongos *Trametes maxima*, *Trametes versicolor*, *Myceliophthora thermophila* y *Pleurotus ostreatus*. Estos biocatalizadores pueden utilizarse para la degradación enzimática de colorantes efluentes de la industria textil, con el consiguiente beneficio ambiental. Los porcentajes de degradación (95%) duplican los obtenidos con las enzimas comerciales más empleadas [36].

4) Bromelina y papaína inmovilizadas en Glyoxyl-Sepharose CL 4B. Estas enzimas son cisteíno proteasas con potencialidades reconocidas para diversas aplicaciones industriales [37]. Los derivados obtenidos mostraron propiedades adecuadas para la biocatálisis a nivel industrial, tales como: i) elevada estabilidad frente al pH (95 y 100% de actividad residual a pH 7.0 y 8.0, para bromelina y papaína, respectivamente; y ii) elevada estabilidad térmica (90% de actividad residual a 30°C para ambas enzimas). En ambos casos se utilizó el sustrato sintético *N*α-Benzoil-(D,L)-arginina-*p*-nitroanilida (BAPA) [8].

Conclusiones

Los procesos biológicos que funcionan adecuadamente en el laboratorio deben ser cuidadosamente escalados para mantener su efectividad a nivel industrial. El diseño de procesos biocatalíticos óptimos permite incrementar la eficiencia de obtención de productos químicos relevantes, como fármacos, aditivos alimentarios y antibióticos, al igual que en el tratamiento de las emisiones industriales y domésticas. Probablemente, los sistemas inmovilizados tendrán en el futuro un papel protagónico en la biocatálisis industrial. Por tanto, la inmovilización de proteínas continuará siendo de gran interés, y crecerá la demanda de biocatalizadores inmovilizados más robustos, capaces de operar en condiciones extremas, características de los procesos industriales. Cada vez serán más importantes las consideraciones sobre el costo de las proteínas, el tipo y la forma de la matriz utilizada, las condiciones de inmovilización, el diseño del reactor y la purificación del producto. Los procesos más económicos y eficientes serán los mediados por los sistemas inmovilizados con mayor grado de optimización. En este sentido, la estrategia de DRDI constituye una herramienta muy valiosa, ya que permite seleccionar la vía más apropiada para sintetizar derivados inmovilizados más efectivos en procesos de cromatografía de afinidad, bioconversión enzimática y otras aplicaciones analíticas y biomédicas.

Agradecimientos

Los autores desean expresar su agradecimiento a INFORMATICA ddm, Bergamo, Italia; al Instituto de Catálisis y Petroleoquímica, CSIC, Madrid, España; a la Universidad de La

Habana; y la Red Temática CYTED (2008): Red iberoamericana para la extracción y transformación enzimática de ingredientes funcionales y nutracéuticos de plantas y agro-residuos regionales (ENZNUT) (108RT0346), por el apoyo financiero para la realización de este proyecto.

Referencias

- [1] Knežević ZD, Šiler-Marinković SS, Mojović LV. Immobilized lipases as practical catalysts. *APTEFF* 2004;35:151-64.
- [2] Wainer IW. Investigation of molecular recognition in biological systems using cellular membrane affinity chromatography. *Chim Oggi*. 2008;26(5 Suppl):19-22.
- [3] Stanescu MD, Fogorasi M, Shaskolskiy BL, Gavrilas S, Lozinsky VI. New potential biocatalysts by laccase immobilization in PVA cryogel type carrier. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2010;160(7):1947-54.
- [4] Felluga F, Baratta W, Fanfoni L, Pitacco G, Rigo P, Benedetti F. Efficient chemoenzymatic synthesis of chiral pincer ligands. *J. Org. Chem.* 2009;74(9):3547-50.
- [5] Bolívar JM, Cava F, Mateo C, Rocha-Martín J, Guisán JM, Berenguer J, *et al.* Immobilization–stabilization of a new recombinant glutamate dehydrogenase from *Thermus thermophilus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2008;80:49-58.
- [6] Cecchini DA, Serra I, Ubiali D, Terreni M, Albertini AM. New active site oriented glyoxyl-agarose derivatives of *Escherichia coli* penicillin G acylase. *BMC Biotechnology* 2007;7:54. doi:10.1186/1472-6750-7-54
- [7] Cutiño-Avila B, Cunill-Semanat E, Gil DF, Chávez MA, Díaz J, del Monte-Martínez A. Synthesis of tetanus toxoid-Sepharose CL 4B derivatives by rational design. En: Folgueras J, Aznielle TY, Calderón CF, Llanusa SB, Castro J, Vega H, *et al.*, eds. IFMBE, Vol. 33, 1st Edition, 800 p., 2011. Softcover, ISBN 978-3-642-21197-3. www.springerlink.com.
- [8] Cutiño-Avila B, Gil D, Aragón C, Fernández-Marrero Y, Hernández M, Salas E, *et al.* Computer-aided design of bromelain and papain covalent immobilization. *Rev. Colomb. Biotec.* (en prensa).
- [9] del Monte-Martínez A, Cutiño-Avila B, Gómez D, Pereda I, Díaz J, Rojas J. Computational mathematic model for the immobilization of cells and proteins on charged solid surfaces by electrostatic interactions. En: Folgueras J, Aznielle TY, Calderón CF, Llanusa SB, Castro J, Vega H, *et al.*, eds. IFMBE, Vol. 33, 1st Edition, 800 p., 2011. Softcover, ISBN 978-3-642-21197-3. www.springerlink.com.
- [10] del Monte-Martínez A, Cutiño-Avila B, Moreno-Castillo E, Martínez de Santelices R, Zuazua B, Plou FJ. Optimización y racionalización *in silico* de la síntesis de biocatalizadores inmovilizados para la obtención de prebióticos. En: Sandoval G, Plou FJ, eds. Obtención enzimática de ingredientes funcionales, compuestos bioactivos y nutraceuticos a partir de recursos naturales iberoamericanos. Editorial CSIC, Biblioteca de Ciencias, 40, 2012:273-92. ISBN 978-84-00-09436-2.
- [11] Torres-Salas P, del Monte-Martínez A, Cutiño-Avila B, Rodríguez-Colinas B, Alcalde M, Ballesteros AO, *et al.* Immobilized biocatalysts: novel approaches and tools for binding enzymes to supports. *Adv. Mater. Deerfield* 2011;23(44):5275-82.
- [12] del Monte-Martínez A, Cutiño-Avila BV. Rational design of immobilized lipases and phospholipases. En: Sandoval G, ed. Lipases and phospholipases: Methods and

protocols. *Methods in Molecular Biology*, Vol. 861. Humana Press, © Springer Science+Business Media, LLC 2012, 2012, Chap. 21. doi:10.1007/978-1-61779-600-5_21

- [13] del Monte A, Cutiño B, Gil DF, Mokarzel L, González J, Pupo M, *et al.* Estrategia de diseño racional en la síntesis de derivados inmovilizados. Su implementación mediante el programa RDID_{1.0}. *Serie Científica Universidad de las Ciencias Informáticas (Cuba)*. 2010;3(3):185-202.
- [14] Salis E, Sanjust V, Solinas M, Monduzzi M. Characterization of Accurel MP1004 polypropylene powder and its use as a support for lipase immobilization. *J. Mol. Cat. B*. 2003;24/25:75-82.
- [15] del Monte-Martínez A, Cutiño-Avila BV, González-Bacerio JO, González-Abradelo D, Figueroa-Espí V, Cao-Vázquez R. Aplicación de enzimas en biocatálisis. Perspectivas de la utilización de nanoarreglos como biocatalizadores. *Rev. Cub. Cienc. Biol.* 2013;2(2):7-23.
- [16] Dalm D, Palm GJ, Aleksandrov A, Simonson T, Hinrichs W. Non-antibiotic properties of tetracyclines: structural basis for inhibition of secretory phospholipase A₂. *J. Mol. Biol.* 2010;398:83-96.
- [17] Scott DL, Otwinowski Z, Gelb MH, Sigler PB. Crystal structure of bee-venom phospholipase A₂ in a complex with a transition-state analogue. *Science* 1990;250(4987):1563-6.
- [18] Grochulski P, Bouthillier F, Kazlauskas RJ, Serreqi AN, Schrag JD, Ziomek E, *et al.* Analogs of reaction intermediates identify a unique substrate binding site in *Candida rugosa* lipase. *Biochem.* 1994;33(12):3494-500.
- [19] Miyazawa S, Jernigan R. Estimation of effective interresidue contact energies from protein crystal structures. Quasi-chemical approximation. *Macromol.* 1985;18:534-52.
- [20] Balcão VM, Mateo C, Fernández-Lafuente R, Malcata FX, Guisán JM. Structural and functional stabilization of L-asparaginase via multisubunit immobilization onto highly activated supports. *Biotechnol. Prog.* 2001;17:537-42.
- [21] Mateo C, Abian O, Fernández-Lorente GF, Pedroche J, Fernández-Lafuente R, Guisán JM. Epoxy Sepabeads: A novel epoxy support for stabilization of industrial enzymes via very intense multipoint covalent attachment. *Biotechnol. Prog.* 2002;18:629-34.
- [22] Tardioli PW, Fernández-Lafuente R, Guisán JM, Giordano RLC. Design of new immobilized-stabilized carboxypeptidase A derivative for production of aromatic free hydrolysates of proteins. *Biotechnol. Prog.* 2003;19:565-74.
- [23] Tardioli PW, Pedroche J, Giordano RLC, Fernández-Lafuente R, Guisán JM. Hydrolysis of proteins by immobilized-stabilized alcalase-glyoxyl agarose. *Biotechnol. Prog.* 2003;19:352-60.
- [24] Rocchietti S, Ubiali D, Terreni M, Albertini AM, Fernández-Lafuente R, Guisán JM, *et al.* Immobilization and stabilization of recombinant multimeric uridine and purine nucleoside phosphorylases from *Bacillus subtilis*. *Biomacromol.* 2004;5:2195-200.

- [25] Bolívar JM, Wilson L, Ferrarotti SA, Fernández-Lafuente R, Guisán JM, Mateo C. Stabilization of a formate dehydrogenase by covalent immobilization on highly activated glyoxyl-agarose supports. *Biomacromol.* 2006;7:669-73.
- [26] Ferrarotti SA, Bolivar JM, Mateo C, Wilson L, Guisán JM, Fernández-Lafuente R. Immobilisation stabilization of a cyclodextrin glycosyltransferase by covalent attachment on highly activated glyoxyl-agarose supports. *Biotechnol. Prog.* 2006;22:1140-5.
- [27] Dib I, Nidetzky B. The stabilizing effects of immobilization in D-amino acid oxidase from *Trigonopsis variabilis*. *BMC Biotechnol.* 2008;8:72-83.
- [28] González-Pombo P, Pérez G, Carrau F, Guisán JM, Batista-Viera F, Brena BM. One-step purification and characterization of an intracellular β -glucosidase from *Metschnikowia pulcherrima*. *Biotechnol. Lett.* 2008;30:1469-75.
- [29] Torres P, Datla A, Rajasekar VW, Zambre S, Ashar T, Yates M, *et al.* Characterization and application of a sterol esterase immobilized on polyacrylate epoxy-activated carriers (Dilbeads™). *Cat. Comm.* 2008;9:539-45.
- [30] Malmsten M, Xing KZ, Ljunglof AJ. Confocal microscopy studies of trypsin immobilization on porous glycidyl methacrylate beads. *J. Colloid Interface Sci.* 1999;220(2):436-42.
- [31] García-Fernández R, Salas E, del Monte A, Alonso del Rivero M, Guerra Y, Chávez MA. Micro y nano-biotecnologías en la detección y caracterización de inhibidores de proteasas de interés biomédico. *Rev. Cub. Física* 2009;26(1):76-82.
- [32] Abbenante G, Fairlie DP. Protease inhibitors in the clinic. *Med. Chem.* 2005;1:71-104.
- [33] Inić-Kanada AB, Stojanović MM, Živković IP, Petrušić VŽ, Dimitrijević LA. The monoclonal antibody 26 raised against tetanus toxoid also recognizes tetanus toxin and β_2 -glycoprotein I – its binding properties *in vitro* and potential applications. *J. Serb. Chem. Soc.* 2009;74(3):245-57.
- [34] Turk B, Turk D, Salvesen GS. Regulating cysteine protease activity: essential role of protease inhibitors as guardians and regulators. *Curr. Pharm. Des.* 2002;8:1623-37.
- [35] Gaggia F, Mattarelli P, Biavati B. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *Int. J. Food Microbiol.* 2010;141:15-28.
- [36] Kunamneni A, Cutiño-Avila B, Gil DF, del Monte A, Alcalde M, Ballesteros A, *et al.* Modelling the covalent immobilization of *Myceliophthora thermophila* laccase in Sepabeads® EC-EP3: application of RSM and novel computational analysis. *New Biotech.* 2009;25S:S135.
- [37] Meyer AS, Koser C, Adler-Nissen J. Efficiency of enzymatic and other alternative clarification and fining treatments on turbidity and haze in cherry juice. *J. Agric. Food Chem.* 2001;49:3644-50.

Autores:

MSc. Alberto del Monte-Martínez

Investigador Auxiliar, MCs. *Autor de correspondencia.

Correo electrónico: adelmonte@fbio.uh.cu

Lic. Bessy Cutiño-Avila

Adiestrada,

Correo electrónico: bvcutav.88@gmail.com

MSc. Jorge González-Bacerio

Profesor Asistente

Correo electrónico: jogoba@fbio.uh.cu

Dra.C. María de los Ángeles Chávez Planes

Profesora Titular

Correo electrónico: mchavez@infomed.sld.cu

Dr.C. Joaquín Díaz Brito

Profesor Titular

Correo electrónico: jdiaz@infomed.sld.cu

Laboratorio de Tecnología Enzimática, Centro de Estudio de Proteínas, Facultad de Biología, Universidad de La Habana. Calle 25, No. 455 entre J e I, Vedado, CP. 10400, La Habana, Cuba.
Teléfono: (53-7)832-4830. Fax: (53-7)832-1321.

*Presentado: 20 de junio de 2013
Aprobado para publicación: 29 de mayo de 2014*