

CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA NITRILASA INMOVILIZADA DE *RHODOCOCCLUS SP V51B*

Georgina Garza-Ramos Martínez, Daniel Romero Martínez, Laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de Proteínas, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM, CDMX, 04510, daniel.rom.mar@gmail.com

Palabras clave: Nitrilasa, inmovilización, actividad enzimática.

Introducción. Las enzimas son los catalizadores más eficientes que existen. Sin embargo, sus aplicaciones industriales se han limitado por su falta de estabilidad. Una forma de conseguirlo es mediante inmovilización, que se define como el confinamiento físico de una enzima, sin que esta pierda su actividad catalítica (1). Las nitrilasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de nitrilos a ácidos carboxílicos y amonio (2). La nitrilasa mutante Nit Δ C328 de *Rhodococcus* sp V51B es un modelo interesante de estudio debido a su aumentada actividad y estabilidad con respecto a la enzima silvestre, así como su amplio rango de sustratos (3).

El objetivo de este trabajo fue caracterizar la actividad enzimática de filamentos catalíticos inmovilizados de la nitrilasa de *R. sp V51B*.

Metodología. La proteína se sobreexpresó en *E. coli* BL21 (DE3) pLysS con IPTG a 22°C por 8 h y se purificó por filtración en gel. Para su inmovilización se empleó dextranpolialdehído (DPA) de 150 kDa como agente entrecruzante y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como precipitante (4, 5). Una vez inmovilizada, se caracterizó su actividad enzimática, empleando benzonitrilo como sustrato estándar, mediante su reusabilidad, estabilidad térmica y termodinámica, actividad en diferentes rangos de pH y en mezclas agua-disolvente y su actividad con diferentes sustratos. Las cuantificaciones se realizaron por HPLC.

Resultados. Tras la inmovilización, el biocatalizador tuvo 16 reusos (Fig. 1). Además, se aumentó su estabilidad cinética entre 30 y 50°C, así como su estabilidad termodinámica al aumentar 10°C su temperatura de fusión (T_m) (Fig. 2). Por otro lado, la nitrilasa inmovilizada mostró una mayor actividad en los extremos de pH estudiados (Fig. 3), así como una mayor tolerancia en particular a acetona, DMF, *n*-PrOH e *i*PrOH en mezclas binarias con agua (Fig. 4). La especificidad de la enzima se vio alterada tras su inmovilización, cambiando la afinidad por ciertos sustratos (Tabla 1).

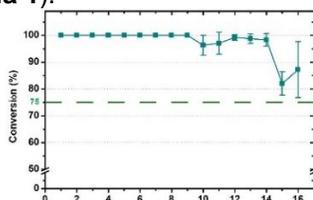


Figura 1. Determinación de reusabilidad de Nit Δ C328 inmovilizada con conversiones mayores al 75%.

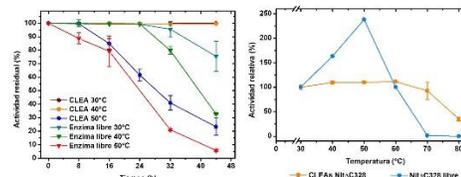


Figura 2. Determinación de estabilidad cinética y termodinámica de Nit Δ C328 libre e inmovilizada.

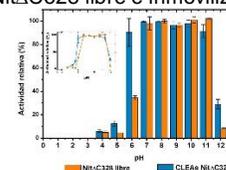


Figura 3. Comparación de la actividad de Nit Δ C328 libre e inmovilizada en diferentes valores de pH.

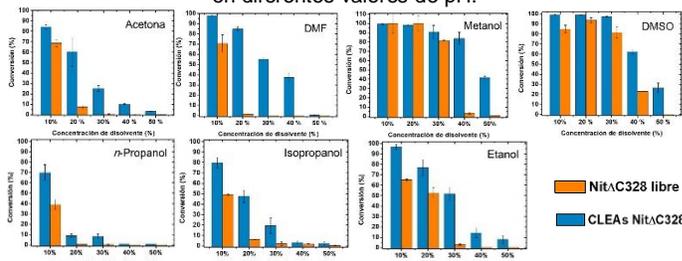


Figura 4. Comparación de la actividad en diferentes mezclas binarias de Nit Δ C328 libre e inmovilizada.

Tabla 1. Cambios en especificidad entre Nit Δ C328 libre e inmovilizada.

Sustrato	Actividad (%)	
	Nit Δ C328 libre	Nit Δ C328 inmovilizada
Benzonitrilo	100	100
<i>p</i> -clorobenzonitrilo	180	93.5
3-fenilpropionitrilo	5.6	18.3
Isonicotinonitrilo	118	91
Acrlonitrilo	37.1	No detectable
Valeronitrilo	8.8	37.3

Conclusiones. La inmovilización de Nit Δ C328 aumentó su estabilidad operacional, cinética y termodinámica, así como su tolerancia a disolventes y alteró su especificidad de sustrato con respecto a la enzima libre.

Agradecimientos. Beca de ayudante de investigador SNI III con expedientes de ayudante y de investigador: 15943/2833

Bibliografía.

- (1) Thuku R *et al.* (2009). *J Appl Microbiol.* 106(3): 703-727.
- (2) Brena B *et al.* (2013). *Methods Mol Biol.* 1051: 15-31.
- (3) Gómez A. (2016). Estructuración y activación de la nitrilasa de *Rhodococcus* sp V51B inducidas por modificaciones en el extremo C-terminal [Tesis de maestría]. UNAM, México.
- (4) Mateo C *et al.* (2004). *Biotechnol Bioeng.* 86(3): 273-276.
- (5) Chmura A *et al.* (2013). *Tetrahedron: Asymmetry.* 24(19): 1225-1232.

