



## EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD HIDROXINITRILLO LIASA DE CULTIVOS DE CÉLULAS DE CAPULÍN (*Prunus serotina*).

Héctor Luna,<sup>1</sup> Liliana Hernández,<sup>1</sup> Arturo Navarro-Ocaña,<sup>2</sup> María Teresa Olivera Flores<sup>2</sup> (1) Dep. Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana- Xochimilco, A. P. 23/182 México, DF (2) Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México Circuito Exterior Ciudad Universitaria México D. F., 04510 México. [lchm1964@correo.xoc.uam.mx](mailto:lchm1964@correo.xoc.uam.mx).

Palabras clave: Hidroxinitrilo liasa, cultivo de células vegetales, capulín.

### Introducción

Las enzimas hidroxinitrilo liasas (HNLs) han sido ampliamente usadas en la síntesis de cinohidrininas quirales. La hidroxinitrilasa de la almendra (*Prunus amygdalus*, PaHNL) es la más utilizada por que puede obtenerse en grandes cantidades y acepta una gran variedad de sustratos.(1) Otra HNL utilizada es la obtenida del árbol del hule (S-HNL, *Hevea brasiliensis*) la cual ha sido sobreexpresada en *E.coli*.(2) Una alternativa al uso de enzimas aisladas es la utilización de células completas, en particular cultivo de células vegetales. Esta última metodología es de gran interés debido que las plantas poseen las enzimas necesarias para sintetizar una gran cantidad de productos; además de transformar sustratos exógenos. Por lo que las bioconversiones con cultivos de células vegetales solas o en combinación con métodos químicos son una alternativa para producir compuestos de alto valor agregado.(3) En este trabajo se determinó si la actividad HNL presente en hojas de árboles de capulín (4) se conserva en los callos de capulín y estos por tanto pueden llegar a ser una fuente alterna de esta enzima.

**Metodología.** La pureza óptica fue determinada por HPLC usando una columna CHIRACEL OD. Los espectros de RMN<sup>1</sup>H fueron obtenidos en un equipo de 400 MHz, en CDCl<sub>3</sub> usando TMS como referencia. Para el desarrollo de los cultivos de células se utilizó un medio MS. Como agente gelificante se utilizó Gellan a razón de 2.5 g/L<sup>-1</sup>. El medio de cultivo se vertió en frascos, depositando 30 mL en cada uno, se esterilizó en autoclave. Los cultivos se incubaron con un fotoperíodo de 16 horas luz/8 h de oscuridad, una temperatura de 25±2 °C y una intensidad luminosa de 24 W/m. Para la preparación del biocatalizador, el callo de cada explante fue molido en un mortero con N<sub>2</sub> líquido y deshidratado con acetona vía maceración. La evaluación de la actividad se llevó a cabo utilizando la síntesis enantioselectiva de mandelonitrilo (Figura 1) para lo cual en un vial de reacción se colocaron 150 mg cultivo de células vegetales (CCV) deshidratado se adicionaron 4.5 mL de éter isopropílico previamente saturado con buffer de KCN / Ac.

Cítrico (pH 4.5, 1.5 mL extraídos con 1.5 mL x 2) y 1 mmol de benzaldehído. La reacción se agitó por 24 horas, al cabo de las cuales se seca con NaSO<sub>4</sub>, se filtra sobre celita, el disolvente se evapora y se determina el ee por HPLC quiral y el % de conversión por RMN<sup>1</sup>H.

**Resultados y discusión.** Se obtuvieron los cultivos de células vegetales de capulín (*Prunus serotina*) en medio MS sólido para diferentes explantes, como tallo, peciolo, entrenudo y raíz. Se determinó la cinética de crecimiento permitiendo concluir que los callos duplican su masa a las 2 semanas de crecimiento. Los callos se trataron como se describe en la metodología y fueron utilizados como biocatalizadores en la síntesis enantioselectiva de mandelonitrilo (Figura 1).

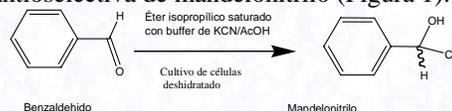


Figura 1

Tabla 1. Resultados de la síntesis de mandelonitrilo para los cultivo de células vegetales.

| Explante                    | % de Conv | % ee |
|-----------------------------|-----------|------|
| tallo                       | 11        | 55   |
| peciolo                     | 24        | 22   |
| entrenudo                   | 39        | 10   |
| raíz                        | 36        | 10   |
| Preparado de hoja de árbol* | 90        | 90   |

\*Utilizado como estándar para comparación.

Estos datos indican que hay actividad HNL en los CCV pero los porcentajes de ee y conversión son bajos comparados con los obtenidos con el preparado enzimático de hoja.(4) Cabe mencionar que en el CCV después de varias resiembras se observa la disminución de los % ee.

**Conclusiones.** Los resultados antes mencionados permiten concluir que existe actividad HNL en los CCV pero no de la misma magnitud que la del material estándar.

### Bibliografía

- Griengl, H.; Schmidt, M. *Topics in Current Chemistry* **1999**, 200, 193-226.
- Gregory, R. *Chemical Reviews* **1999**, 99, 3649-3662.
- Giri, A.; Dhingra, V.; Giri, C. C.; Singh, A.; Ward, O.; Lakshmi, N. *Biothechnology Advances* **2001** 19, 175-189.
- Hernandez, L.; Luna, H.; Solís, A.; Vázquez, A. *Tetrahedron Asymmetry* **2006**, 17, 2813-2816.