



# XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



## EFFECTO DE LA CARGA ENZIMÁTICA SOBRE LA CAPACIDAD DE REACTIVACIÓN DE CATALIZADORES DE PENICILINA G ACILASA

Erick Araya, Zaida Cabrera, Andrés Illanes, Lorena Wilson\*

Escuela de Ingeniería Bioquímica, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, CHILE

\*[lwilson@ucv.cl](mailto:lwilson@ucv.cl)

*Palabras clave: reactivación, carga enzimática, enzimas.*

**Introducción.** La inactivación enzimática es de gran importancia en sistemas productivos que utilizan medios de reacción denaturantes como los solventes orgánicos. Si bien muchos trabajos se han orientado a mejorar la estabilidad de las enzimas mediante inmovilización, sólo unos pocos muestran que es posible incrementar aún más la eficiencia de uso de estos catalizadores mediante un proceso relativamente simple de reactivación[1,2]. En el presente trabajo se estudia el proceso de reactivación de catalizadores enzimáticos evaluando el efecto de la carga enzimática sobre su capacidad de reactivación.

**Metodología.** Penicilina G acilasa (PGA) de *E. coli* con  $687 \pm 25$  UI/mL y  $26 \pm 2$  mg/mL de proteína fue inmovilizada en soporte de glioxil agarosa[3]. La actividad hidrolítica de la PGA fue determinada usando pHstato (Mettler Toledo, DL50) que titula el ácido fenil acético producido por la hidrólisis de penicilina G. La unidad de actividad hidrolítica (UI) de la PGA fue definida como la cantidad de enzima que hidroliza un  $\mu\text{mol}$  de PenicilinaG-K por minuto de una solución 10 mM PenicilinaG-K en tampón fosfato de sodio 0.1 M, pH 7.8 a 30°C.

Los biocatalizadores fueron inactivados hasta 75%, 50% y 25% de actividad residual en 70% (v/v) de dioxano a 5°C y posteriormente reactivados en medio acuoso (tampón fosfato 5mM pH 7.8 at 40°C). El rendimiento de reactivación se define como la razón entre la actividad recuperada después del proceso de reactivación y la actividad inicial del catalizador (previo a la inactivación).

**Resultados.** En la Tabla 1 se presentan las cargas de cada uno de los catalizadores preparados.

**Tabla 1.** Catalizadores y sus cargas enzimáticas

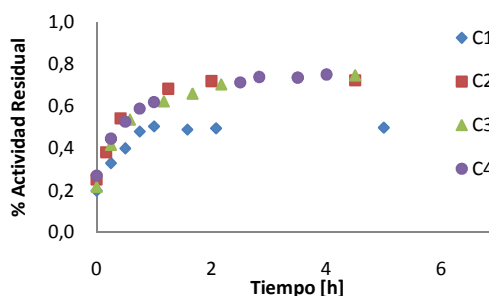
Catalizador	C1	C2	C3	C4
Carga enzimática [UI/g]	460,4	374,2	252,3	109,8
Proteína inmovilizada[mg/g]	29,1	22,0	14,3	6,4

Respecto a estabilidad, los cuatro catalizadores presentaron una cinética de inactivación similar, obteniéndose un tiempo de vida media de  $4 \pm 0.6$  [h].

Los resultados obtenidos con los diferentes catalizadores inactivados hasta diferentes niveles de actividad residual y posteriormente reactivados se presentan en la Tabla 2. En la Fig.1 se presenta, a modo de ejemplo, la cinética de reactivación para una de las condiciones estudiadas.

**Tabla 2.** Rendimientos de reactivación de catalizadores inactivados

Catalizador	Rendimiento de reactivación		
	Inactivado hasta $\pm 75\%$ act. residual	Inactivado hasta $\pm 50\%$ act. residual	Inactivado hasta $\pm 25\%$ act. residual
C1	0,721	0,784	0,496
C2	0,742	0,965	0,721
C3	0,763	0,971	0,762
C4	0,981	1	0,743



**Fig. 1.** Cinética de reactivación de catalizadores inactivados hasta un  $\pm 25\%$  de actividad residual

### Conclusiones.

-Existe un claro efecto de la carga enzimática sobre la capacidad de reactivación de los catalizadores de PGA, debido a que cuando la proteína es desplegada, su volumen molar aumenta considerablemente, lo que puede ocasionar interacciones entre las moléculas de proteína que impiden su correcto repliegamiento

-Los catalizadores menos cargados favorecen el proceso de reactivación (cuando son inactivados hasta un  $\pm 75\%$  y  $\pm 50\%$ ); sin embargo, la baja actividad específica de estos catalizadores dificultaría su posible utilización industrial.

**Agradecimiento.** Proyecto FONDECYT 1100323

### Bibliografía.

- [1] Romero O, Vergara J, Fernández-LaFuente R, Guisán JM, Illanes A, Wilson L. (2009) *Biotechnol Bioeng.* 103(3):472-479.
- [2] Guisán JM, Bastida A, Blanco RM, Cuesta C, Rodríguez V, Fernández-Lafuente R. (1992). Insolubilized Enzyme derivatives in organic solvents: mechanisms of inactivation and strategies for reactivation. En *Biocatalysis in Non-Conventional Media*. Tramper J, Vermue MH, Berrfink HH, Elsevier, Amsterdam. 221-228.
- [3] Alvaro G, Fernandez-Lafuente R, Blanco R, Guisan JM (1990) *Appl. Biochem. Biotechnol.* 26:181-195