



Universidad Nacional Autónoma
de México

Facultad de Estudios Superiores
Zaragoza

Purificación parcial y caracterización de la nitrilasa de
Rhodococcus pyridinovorans V51B

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
PRESENTA

RAMIRO ANTONIO ANAYA AGUAS





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

A mis padres...

Lourdes y Ramiro, porque a pesar de todo siguieron confiando en mi y brindándome su apoyo; por las desveladas y madrugadas, lágrimas y risas que compartimos.

A Araceli...

Porque a pesar de todas las etapas que vivimos seguiste apoyándome y buscando el respeto de nuestra hija para mí...

A Sandy...

Porque te tocó sufrir la ausencia y la soportaste estoicamente, sin perderme el respeto ni el cariño; porque cuando tenía el deseo de abandonar pensaba en ti y la esperanza de ser un buen ejemplo siempre fue mayor...

A Tania...

Porque tu llegada marcó un nuevo punto de partida y fue un estímulo sublime para seguir adelante...

A mis hermanos...

Carlos, Marcos, Miriam y Lourdes, porque siempre estuvieron allí cuando los necesité, sin importarles cuanto hubiéramos peleado en el pasado...

Al Dr. Mario Calcagno...

Quien me abrió las puertas en el laboratorio y me enseñó que la investigación brinda mejores resultados cuando se acompaña de humildad, amistad y afecto.

Al Dr. Ignacio Regla...

Quien confió en mí, me brindó el apoyo y fue el enlace para llegar al laboratorio de fisicoquímica e ingeniería de proteínas...

A todos los integrantes del laboratorio de fisicoquímica e ingeniería de proteínas...

Porque gracias a ellos el ambiente de trabajo resulta grato, porque siempre que necesito apoyo lo encuentro y porque aunque la duda sea infame siempre hay una respuesta acertada.

ÍNDICE

	Pág.
Introducción.	2
I. Antecedentes.	5
A. Características del género <i>Rhodococcus</i> .	5
B. Enzimas y energía de activación.	7
1. Energía libre de activación.	9
2. Velocidad de reacción.	9
3. Estructura del sitio activo.	10
C. Biocatálisis.	11
D. El metabolismo de los nitrilos.	11
1. Distribución de los sistemas enzimáticos capaces de degradar los nitrilos.	12
2. Nitrilasa.	19
a. Clasificación por especificidad.	20
b. Mecanismo de acción.	21
3. Nitrilo hidratasa.	22
G. Importancia de la biocatálisis en la hidrólisis de los nitrilos.	24
II. Planteamiento del problema.	26
III. Objetivos.	29
IV. Hipótesis.	30
V. Equipos.	31
VI. Materiales y reactivos.	32
VII. Metodología.	36
A. Cultivo.	36
1. Obtención de biomasa en medio LBm.	36
2. Obtención de biomasa en medio TNm.	37
B. Obtención del extracto enzimático.	37
C. Purificación parcial.	38
D. Ensayo de actividad.	39
1. Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).	39
2. Ensayos acoplados.	41
a. Glucosamina 6-fosfato desaminasa.	41

b. L- Glutamato deshidrogenasa bovina.	43
c. Ensayo acoplado L-GDH _b - Nitrilasa.	46
3. Ensayo potenciométrico.	47
VIII. Resultados.	48
A. Optimización del cultivo.	48
B. Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).	50
C. Ensayos acoplados.	53
1. Glucosamina 6-fosfato desaminasa.	53
2. L-Glutamato deshidrogenasa bovina.	54
D. Ensayo potenciométrico.	59
IX. Discusión de resultados.	62
X. Conclusiones.	64
XI. Perspectivas.	65
XII. Referencias bibliográficas.	66

Introducción

La industria química hace uso extenso de varios nitrilos para fabricar una gran variedad de polímeros y otros productos químicos. Es el caso del acrilonitrilo y el adiponitrilo que se emplean en la producción de poliacrilonitrilo y monómeros del nylon. En general, se usan diferentes nitrilos como disolventes, intermediarios en la síntesis de fármacos, pesticidas, etc. También, son intermediarios importantes en la síntesis de aminas, amidas, ácidos carboxílicos, ésteres, aldehídos, cetonas y compuestos heterocíclicos[1].

La mayoría de los nitrilos son altamente tóxicos y carcinógenos. En la especie humana, los efectos tóxicos de estos compuestos se manifiestan como padecimientos gástricos, náuseas, vómitos, irritación bronquial, trastornos respiratorios, convulsiones y coma. Los nitrilos inactivan el sistema respiratorio mediante una fuerte unión a la citocromo *c* oxidasa. La degradación microbiológica se ha considerado como una alternativa eficiente para la eliminación de estos compuestos cuando se encuentran como contaminantes en la naturaleza. Numerosos microorganismos (hongos y bacterias) y algunas plantas llevan a cabo esta degradación: su metabolismo incluye hidrólisis (amidasa, nitrilasa), oxidación (oxigenasa) y reducción (nitrogenasa). En general la reacción catalizada es la transformación del grupo ciano (-CN) del nitrilo a ácido carboxílico (-COOH), ya sea de manera directa (nitrilasa) o bien con un intermediario amida (-CONH₂) y su posterior transformación de amida a ácido carboxílico, en el caso del sistema *N*-hidratasa - amidasa.

Desde el punto de vista sintético, las nitrilasas representan una opción importante en la hidrólisis biocatalítica quimio-selectiva de nitrilos, sobre todo porque se lleva a cabo en condiciones menos agresivas que las que se requieren para lograr esas transformaciones por medios químicos. El uso de nitrilasas obtenidas a partir de *Rhodococcus* N-774, *Pseudomonas chlororaphis* B23 y *Rhodococcus rhodochrous* J1 en la producción de acrilamida y en la síntesis de ácido nicotínico y nicotinamida a partir de 3-cianopiridina demuestran la viabilidad comercial de estas enzimas.

Los nitrilos, las amidas y los ácidos carboxílicos, particularmente los enantiómeros puros de los compuestos quirales, tienen un uso importante tanto en la industria química como en la industria farmacéutica. En síntesis orgánica, la adición de un grupo nitrilo representa la incorporación de un átomo de carbono en la molécula, y su sucesiva hidrólisis a la amida o al ácido carboxílico correspondientes reviste una gran importancia. La hidrólisis química de los nitrilos suele requerir condiciones drásticas de reacción, por ejemplo ácido sulfúrico 20 a 30 % v/v, a reflujo por varias horas, lo que involucra elevados consumos energéticos, la formación de productos no deseados y la generación de grandes cantidades de residuos y productos colaterales. Un hecho de suma importancia, es que la hidrólisis química no es enantioespecífica y las condiciones de reacción pueden producir la racemización de los reactivos. En este contexto, la hidrólisis biocatalítica de nitrilos, por su inherente enantioselectividad, representa una alternativa valiosa a la hidrólisis química convencional, al poder realizarse a temperatura ambiente y a valores de pH cercanos a la neutralidad y sin la producción de residuos contaminantes[1], en algunos casos, la hidrólisis enzimática de nitrilos es capaz de llevar a cabo conversiones 100% enantioselectivas. Los microorganismos presentan dos sistemas para la transformación de nitrilos, la nitrilasa (EC 3.5.5.1) o bien un sistema de dos enzimas nitrilhidratasa (EC 4.2.1.84) amidasa (EC 3.5.1.4).

Rhodococcus pyridinovorans V51B es una bacteria perteneciente a la familia de las nocardáceas, aerobio, de crecimiento relativamente lento. Tiene la capacidad de degradar el benzonitrilo y el valeronitrilo utilizándolos como única fuente de carbono y de nitrógeno, característica que fue descubierta por el Dr. Regla al aislar la cepa de muestras de suelos en 2003[2]. En *R. pyridinovorans* V51B se encuentra una proteína que ha sido identificada como nitrilasa ya que transforma nitrilos en ácidos carboxílicos sin liberar amida intermedia. La medida de la actividad de esta enzima no ha sido bien resuelta, lo que ha estimulado la búsqueda de nuevas opciones para realizar el seguimiento de la actividad. Un método de ensayo adecuado permitiría el desarrollo de un protocolo de purificación y la posterior caracterización cinética

de la enzima, explorando los posibles sustratos y las constantes cinéticas para cada uno de ellos.

I. ANTECEDENTES

A. Características del género *Rhodococcus*

Los organismos del género *Rhodococcus* son habitantes frecuentes y abundantes de áreas contaminadas con compuestos orgánicos. Los integrantes de este grupo fueron incluidos en un principio en el género *Corynebacterium* y clasificados dentro de la familia *corynebacteriaceae*. El nombre para este género fue propuesto en un estudio de clasificación basado en taxonomía numérica. *R. rhodochrous* fue propuesto como la especie tipo[3]. El género lo integran además: *R. bronchialis*, *R. coprophilus*, *R. corallinus*, *R. erythropolis*, *R. equi*, *R. rhodnii*, *R. ruber*, *R. rubropertinctus*, *R. fascians*, *R. pyridinovorans*, y *R. térrea*, de los anteriores *R. equi*, *R. erythropolis*, *R. fascinas* y *R. rhodochrous* han sido hallados en muestras de pacientes humanos; *R. equi* es un patógeno habitual en caballos. Estas bacterias exhiben un amplio rango de actividades metabólicas[4]. Algunas de ellas tienen la capacidad de degradar una variedad de compuestos orgánicos, incluyendo xenobióticos como bifenilos policlorados, mientras otras son capaces de degradar numerosos hidrocarburos alifáticos, alifáticos ramificados y aromáticos[5-9], están presentes en suelos contaminados con hidrocarburos provenientes del petróleo y fábricas de productos químicos y pinturas. Estas bacterias cumplen un rol importante en la biorremediación ambiental[7].

Los *Rhodococcus* son cocobacilos, aerobios estrictos. Crecen sin dificultad entre 30 y 37 °C en medios no selectivos. A las 24 h de incubación, las colonias son pequeñas, menores de 2 mm, e indiferenciables, necesitan 48-72 h para adquirir un tamaño comprendido entre 2-4 mm y su aspecto característico (Fig. 1). En agar sangre y agar soya tripticasa con 5% de sangre bovina forman colonias redondas e irregulares, lisas, semitransparentes, brillantes, mucosas y coalescentes, que pueden confluir entre sí aparentando un tamaño mayor. No obstante, pueden coexistir con otros tipos de colonias pequeñas, de tamaño inferior o igual a 1 mm, no mucosas y presentes en una proporción mucho más

baja que las descritas anteriormente. Los cultivos pueden tener un olor a tierra húmeda.



Fig. 1. Aspecto de las colonias de *Rhodococcus pyridinovorans* V51B. Cultivo de 72 horas en agar Luria Bertani modificado (LBm).

El pigmento característico que dio origen a su nombre (*Rhodococcus* = coco de color rosa) no suele apreciarse en los cultivos antes de cuatro días; transcurrido este tiempo, las colonias pueden aparecer de color salmón, ligeramente rojas, amarillo pálido o incluso carecer de pigmento. En los cultivos viejos, las colonias se ven secas, rugosas y de color rojo-anaranjado, revertiendo a su aspecto original al realizar un nuevo subcultivo.

Desde el punto de vista de su morfología microscópica, *Rhodococcus* es un cocobacilo Gram positivo pleomórfico, de forma cocoide o bacilar, lo que depende de las condiciones de cultivo y la fase en que éste se encuentre. En los medios sólidos y en las muestras clínicas purulentas es más frecuente la morfología cocoide, mientras que en los medios líquidos, especialmente en cultivos jóvenes, puede aparecer como bacilos largos o filamentos cortos con ramificaciones pequeñas. *Rhodococcus* es un organismo ácido-alcohol resistente con la tinción de Ziehl-Neelsen. Sin embargo, esta característica es variable y depende fundamentalmente de la edad del cultivo, el medio de crecimiento y de la

realización de la técnica. También, se ha documentado la observación ocasional de gránulos metacromáticos.

B. Enzimas y energía de activación

Hasta finales del siglo XIX, estaba aceptado universalmente que los procesos de la vida eran el resultado directo de una fuerza vital y que ocurrían exclusivamente en las células. En el verano de 1896, esta doctrina llamada vitalismo (parte de las ideas de la generación espontánea) fue desacreditada por el experimento que dio origen al nacimiento de la Bioquímica. M Hahn, un científico alemán, trataba de separar proteínas de las levaduras moliéndolas en un mortero con arena muy fina y tierra de diatomeas. El extracto de levadura se filtraba en un paño muy fino, pero desafortunadamente para Hahn, era muy difícil de preservar. Hans Buchner, colega de Hahn le recordó que la fruta se conserva agregándole azúcares, haciendo una mermelada; le sugirió agregar sacarosa al extracto de levaduras. El experimento lo realizó Eduard Buchner, hermano de Hans y que visitaba el laboratorio para experimentar precisamente con los extractos de levadura. Cuando agregó la sacarosa al extracto, observó que de la solución emergían burbujas. Eduard concluyó que la fermentación, proceso descrito por Louis Pasteur como la *vida sin aire*, estaba ocurriendo. Actualmente, esta observación tal vez no sería particularmente importante para nosotros, pero Buchner había demostrado que los procesos de la vida (la fermentación en este caso), podían ocurrir fuera de las células vivas.

La hipótesis de Buchner consistió en que la fermentación resulta de la actividad de una enzima, que él llamó *zimasa*. Actualmente llamamos a este proceso, glucólisis del griego *glycos*: dulce + *lysis*: ruptura. Los sistemas vivientes están formados por una enorme variedad de reacciones bioquímicas, la inmensa mayoría de las cuales se llevan a cabo por entidades proteicas con actividad catalítica conocidas como enzimas.

Las enzimas son proteínas que catalizan a las reacciones químicas, incrementando su velocidad. En el proceso las enzimas no resultan modificadas.

El mecanismo de acción de una enzima se puede entender por lo tanto, desde dos perspectivas. La primera trata a la catálisis desde el punto de vista de los cambios en energía que ocurren durante la reacción; las enzimas proveen una vía alterna, energéticamente favorable que es diferente de la reacción no catalizada. La segunda describe cómo el sitio activo facilita químicamente la catálisis de la enzima.

Prácticamente todas las reacciones químicas tienen una barrera energética que separa a los reactivos, reactantes o sustratos, de los productos. Esta barrera se denomina energía libre de activación que es la diferencia en energía que existe entre los reactivos y los productos. El lugar donde la energía libre de activación es máxima, se denomina estado de transición. En la Fig. 2 se ejemplifica la transformación del reactivo A en el producto B a través del estado de transición T*.

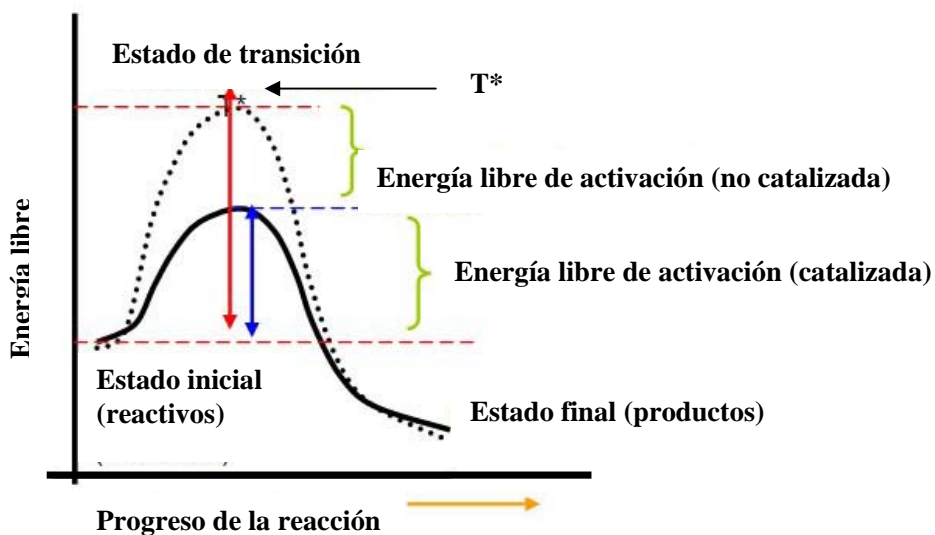


Fig. 2. Representación del cambio en la energía libre de una reacción catalizada enzimáticamente (línea continua) y la misma no catalizada (línea punteada).

1. Energía libre de activación.

Este máximo de energía representa el estado de transición en el cual se forma el intermediario rico en energía durante la conversión de los reactivos en los productos. Debido a la gran energía de activación que separa a los reactivos de los productos, a menudo la misma reacción es más lenta o no es detectable si no es catalizada enzimáticamente.

2. Velocidad de reacción.

Las moléculas que reaccionarán en un evento químico, deben contener suficiente energía para superar la energía de activación del estado de transición en su camino para transformarse en los productos. En ausencia de la enzima, solo una pequeña porción de la población de estas moléculas posee la energía suficiente para realizar la transición hacia los productos. La velocidad de la reacción estará determinada por el número de moléculas que se encuentren en ese estado energético particular. En general, al disminuir la energía de activación, la mayoría de las moléculas tienen energía suficiente para pasar sobre el estado de transición y por tanto aumenta la velocidad de la reacción. Una enzima permite que una reacción se lleve a cabo rápidamente bajo las condiciones que reinan en la célula. Lo anterior se realiza al disminuir la energía de activación. La enzima no modifica la energía contenida en los reactivos o productos; de la misma forma, no altera el equilibrio de la reacción.

3. Estructura del sitio activo.

El sitio activo de las enzimas no es un receptáculo pasivo para la unión del sustrato, por el contrario es una maquinaria molecular muy compleja que emplea una amplia diversidad de mecanismos químicos que facilitan la interconversión de los sustratos y los productos. Dentro de los factores que están relacionados con la eficiencia catalítica de las enzimas están los siguientes:

a) **Estabilización del estado de transición.** El sitio activo de la enzima a menudo actúa como un molde molecular flexible en donde el sustrato se une de forma geoméricamente adecuada para transformarse en el estado de transición de la molécula. Al estabilizar al sustrato en el estado de transición, la enzima aumenta de manera considerable la concentración de este intermediario reactivo que puede ser transformado en el (los) producto(s) y, por tanto, acelerar la reacción. El sitio activo está formado por las cadenas laterales de residuos específicos, lo que ocasiona que tenga un arreglo tridimensional particular, diferente al resto de la proteína. Este sitio es afín por la estructura tridimensional del sustrato (Fig. 3).

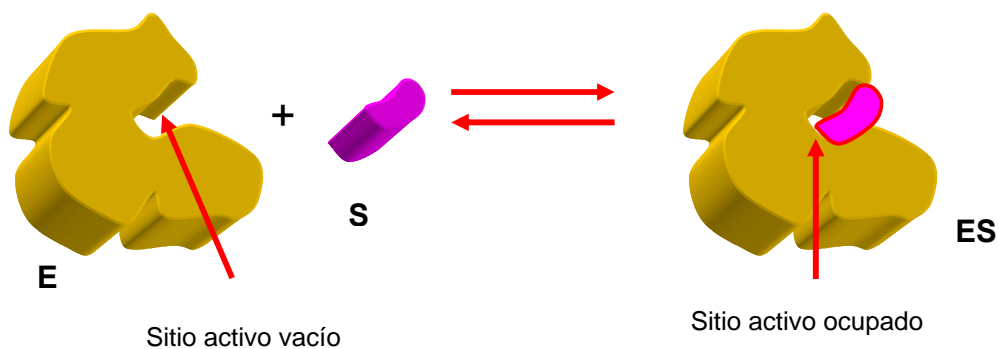


Fig.. 3. Representación de la formación del complejo enzima-sustrato. El sitio activo la enzima (E) une al sustrato (S) formando un complejo enzima-sustrato (ES). En el complejo ES, E transforma a S en él o los productos, formando el complejo enzima-producto, finalmente la enzima libera del sitio activo el producto, regenerándose.

b) **Otros factores.** El sitio activo posee grupos catalíticos que incrementan la probabilidad de que se forme el estado de transición. En algunas enzimas, estos grupos pueden participar en una catálisis tipo ácido-base en la cual algunos residuos de aminoácidos proveen o aceptan protones. En otras enzimas, la catálisis involucra la formación temporal de un complejo covalente enzima-sustrato.

C. Biocatálisis

Las proteínas juegan un papel central en todos los procesos biológicos. Las enzimas, en particular, constituyen un grupo particularmente importante de proteínas, por la diversidad e importancia de sus funciones catalíticas, que conducen casi todas las transformaciones químicas en los seres vivos, así como por su aplicación en la industria química, en el área conocida como biocatálisis.

La capacidad catalítica de los sistemas vivos supera con amplio margen la que ha logrado la industria química. Actualmente los productos químicos se producen mediante reacciones que utilizan toda clase de condiciones de temperatura, presión, uso de disolventes, etc. En contraste, los seres vivos realizan también toda clase de reacciones químicas y producen toda clase de sustancias y materiales, pero siempre a temperaturas moderadas y en solución acuosa. Por este motivo, cada vez más se trata de utilizar estrategias y materiales similares a los biológicos para realizar las transformaciones químicas que nos interesan, en particular, los sistemas biocatalizadores de la hidrólisis de nitrilos.

D. Metabolismo de los nitrilos

Los nitrilos son compuestos orgánicos que contienen un triple enlace carbono-nitrógeno, son intermediarios de la ruta metabólica del cianuro en plantas, animales y microorganismos. Se encuentran en el medio ambiente como cianoglucósidos (amigdalina, prunasina, prulaurasina, sambunigria) los cuales son producidos por las plantas (Fig. 4). Éstas, además producen otros nitrilos como los cianolípidos y el fenilacetónitrilo (Fig. 5) entre otros.

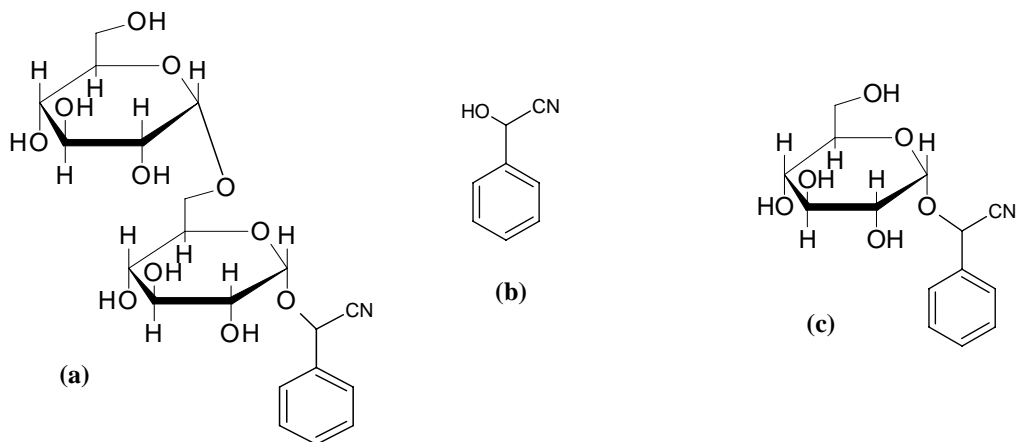


Fig. 4. Se muestra la estructura de la amigdalina (a) (Genociobiósido de (S)-mandelonitrilo). Se encuentra presente en la almendra amarga. El mandelonitrilo (b) (2-hidroxi-fenilacetnitrilo) es un grupo constante en los cianoglucósidos. La prunasina (c) es el glucósido del D-mandelonitrilo, se encuentra presente en la hoja de laurel cerezo. La prulaurasina es el glucósido de D (R, S) mandelonitrilo. Por último la sambunigria es el glucósido de (R)-mandelonitrilo.

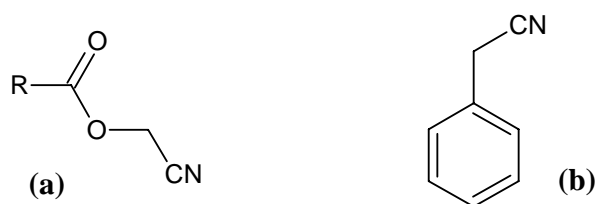


Fig. 5. Estructura de los cianolípidos (a) donde R es una cadena alifática. (b) Fenilacetnitrilo.

1. Distribución de los sistemas enzimáticos capaces de degradar los nitrilos

Las enzimas que permiten la degradación de los nitrilos son poco frecuentes en la naturaleza. La existencia de este tipo de enzimas en sólo tres de la totalidad de familias de plantas (Gramineae, Cruciferae, y Musaceae)[10] y un limitado número de hongos (*Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*)[11] indica la relativa rareza de este sistema.

La actividad de degradación de nitrilos es más frecuente en las bacterias (de los géneros *Acinetobacter*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Nocardia* y, *Rhodococcus*, entre otros), en estos microorganismos se conoce la capacidad de aprovechar los nitrilos como única fuente de carbono y de nitrógeno.

En el caso de las plantas[12] esta actividad se relaciona con el metabolismo de los glucosinolatos, particularmente con la degradación y en la síntesis de ácido indolacético[13]. En algunas plantas superiores la actividad de degradación de nitrilos se requiere para la eliminación de cianuros[14]. Aun cuando el papel funcional de estas enzimas en los microorganismos no se ha establecido con certeza se ha relacionado con la actividad de algunas otras enzimas, particularmente con la aldoxima deshidratasa que es la responsable de la formación de los nitrilos a partir de las aldoximas[15].

Las nitrilasas catalizan la transformación de los nitrilos orgánicos en sus correspondientes ácidos carboxílicos e ion amonio. Las nitrilo hidratatas catalizan a transformación de los nitrilos a sus correspondientes amidas, que a su vez se transforman en ácidos carboxílicos y amonio mediante una amidasa. El ácido cianhídrico (HCN) formado a partir de cianuros metálicos se metaboliza por la acción de varias enzimas, por ejemplo la cianasa que produce dióxido de carbono y amonio[16]. La cianuro hidratasa transforma el grupo nitrilo en formamida[17] y la cianuro dihidratasa produce ácido fórmico y amonio[18]. Muchas plantas utilizan oxigenasas para transformar los nitrilos en cianhidrinas (α -hidroxinitrilos) con la posterior conversión a aldehidos y ácido cianhídrico por la acción de las oxinitrilasas (hidroxinitrilo liasas)[19]. Este último sistema es aún desconocido en microorganismos. Un hongo, *Trichoderma sp* es capaz de degradar el diaminomandelonitrilo, con la liberación de ácido cianhídrico[20]. Las nitrogenasas presentes en los organismos fijadores de nitrógeno son capaces de reducir los nitrilos a sus correspondientes hidrocarburos y amonio[21]. En la Fig. 6 se muestran diferentes rutas metabólicas utilizadas para la degradación de los nitrilos

en los diferentes organismos.

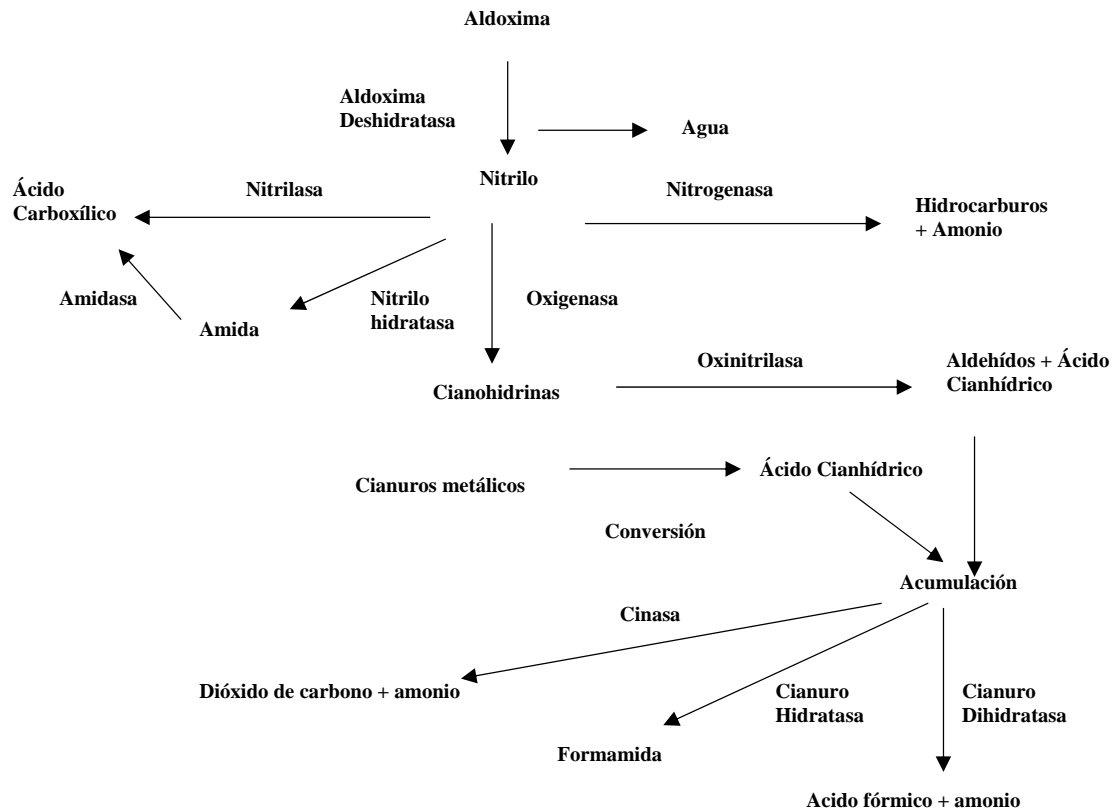


Fig. 6. Diferentes rutas metabólicas para la degradación de los nitrilos, en general los productos de la degradación de los nitrilos son amidas o bien ácidos carboxílicos y amonio.

Las nitrilasas son un tipo de enzimas pertenecientes a un conjunto de mercapto-enzimas relacionadas estructuralmente, al que se ha llamado la “superfamilia de las nitrilasas”[22]. Las enzimas pertenecientes a esta superfamilia (Tabla 1) son responsables de una variedad de reacciones hidrolíticas de enlaces no peptídicos carbono-nitrógeno en plantas, animales y hongos. Se han descubierto genes de nitrilasa en humanos, moscas y nemátodos[23]. En las plantas, las nitrilasas producen auxinas, biotina, β -alanina y otros productos naturales. Muchas bacterias y arqueas, particularmente aquéllas con una relación ecológica con plantas y animales, contienen representantes de la superfamilia de las nitrilasas y utilizan estas enzimas en reacciones químicamente similares a las

de hidrólisis de los nitrilos o las amidas.

. Los miembros de esta superfamilia son responsables de una variedad de reacciones hidrolíticas de enlaces no peptídicos carbono-nitrógeno. Su clasificación en trece grupos distintos, basada en análisis de secuencias y en la especificidad de la reacción, muestra que sólo una de las ramas presenta realmente actividad de nitrilasa, mientras que las otras restantes, tienen actividades de amidasa, carbamoilasa y *N*-aciltransferasa principalmente [22].

Los datos estructurales y de secuencia de dos miembros de esta superfamilia, una *N*-carbamil-D-amino amidohidrolasa de *Agrobacterium*[24] (28) y la proteína NitFhit de *Caenorhabditis* (10) sugieren que las enzimas de este grupo

Tabla 1. Resumen de la superfamilia de las Nitrilasas. (Brenner and Pace 2001).

Grupo de nitrilasa	Actividad					
	Nitrilasa	Amidasa		Amidasa reversa	Carbamilasa	Actividad sobre proteínas
	R-CN	R-CO-NH ₂	R-CO-NH-R'		R-NH-CO-NH ₂	
1. Nitrilasa	SI					
2. Amidasa alifática		SI				
3. Amidasa Amino terminal		SI				SI
4. Biotinidasa		SI	SI			Algunas veces
5. β-Ureidopropionasa		SI			SI	
6. Carbamoilasa		SI			SI	
7. NAD sintetasa procariota		Prevista				
8. NAD sintetasa eucariótica		Prevista				
9. N-Aciltransferasa			SI	SI		SI
10. Nit y NitFhit						
11. NB11						
12. NB12						Prevista
13. Grupo divergente						

estructural poseen una tríada catalítica particular Glu-Lys-Cys (Fig. 7) que

comprende una cisteína cuyo tiolato inicia el mecanismo de la hidrólisis de nitrilos o amidas por el ataque nucleofílico al carbono del grupo ciano; estas enzimas contienen un motivo estructural único formado por cuatro capas α - β - β - α (α - β - β - α “sándwich”)[25].

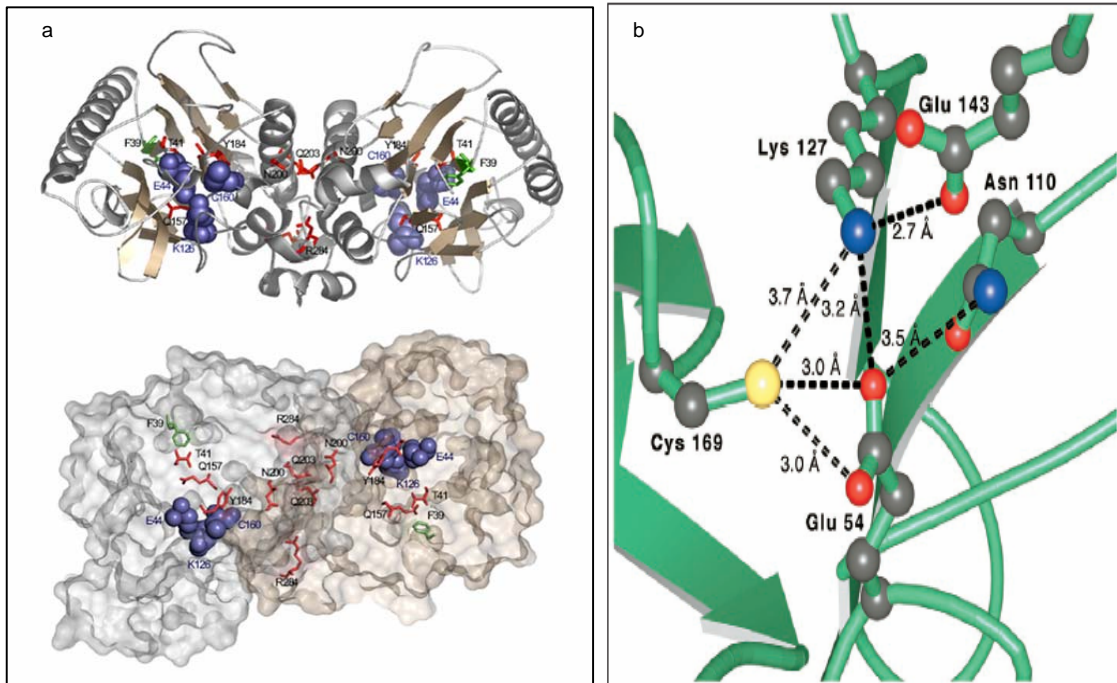


Fig. 7. a. Dímero de NitFhit de *Caenorhabditis elegans* donde se ubica (en azul) la triada Glu-Lys-Cis. Imagen superior (Cartoons). Imagen inferior (Superficie molecular) (Brener and Pace 2001). b. Acercamiento del sitio activo de la NitFhit de *Caenorhabditis elegans*, puede observarse las características de la triada Glu-Lys-Cis (Brener and Pace 2001).

Las nitrilasas bacterianas, 137 identificadas por tamizado funcional de bibliotecas de DNA ambiental y 10 de especies cultivadas, han sido clasificadas recientemente, en 6 subfamilias. Este estudio reveló que el perfil catalítico (químico y regioespecificidad) de las diferentes nitrilasas se correlaciona con la clasificación en subfamilias y en algunos casos con la biogeografía y ecología de los organismos[26]. De hecho, ya se habían observado un gran número de correlaciones entre las propiedades bioquímicas de las nitrilasas microbianas y su clasificación filogenética. La pérdida o ganancia de distintas actividades o “switches de enantioselectividad” coinciden con los eventos evolutivos que

llevaron a la formación de las principales subfamilias[25]. El hecho de que las diferencias en sus propiedades enzimáticas se correlacionen con cada una de las subfamilias de genes sugiere con fuerza que las nitrilasas han divergido funcionalmente, desempeñando diferentes funciones biológicas en las poblaciones microbianas que ocupan una gran variedad de nichos ecológicos. Una clasificación más reciente[27] donde se incorporan secuencias de genomas recientemente liberadas, añade una subfamilia más. Los autores realizan un análisis genómico y bioquímico de la familia de las nitrilasas microbianas tratando de entender los eventos evolutivos que han dado forma a la organización de sus genomas y saber si la función de las nitrilasas depende de la naturaleza de los genes que la flanquean. En el caso particular de los genes de las 7 subfamilias de las nitrilasas, se encontró que sólo un grupo de la subfamilia 1 está agrupado en una especie de operón formado por 7 genes, bastante conservado, no existe evidencia experimental a favor de la participación de este operón en alguna función biológica[27].

Existe una gran variedad de organismos capaces de producir enzimas que actúan sobre los nitrilos (Tabla 2); en su gran mayoría son procariotes (y de éstos muchos pertenecen al género *Rhodococcus*); sin embargo existen algunos hongos y plantas que también presentan sistemas enzimáticos con acción sobre estos compuestos.

Tabla 2. Algunos organismos con capacidad transformante de nitrilos. (M Mylerová V. and Martínková L., 2003).

Organismo	Actividad enzimática	Sustratos
Procaríotes		
<i>Acidovorax facilis</i> ATCC 55746	Nitrilasa	alquilnitrilos, benzonitrilo
<i>Agrobacterium</i> sp. DSM 6336	Nitrilasa	nitrilos heterocíclicos
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> D3 (DSM 9674)	Nitrilo hidratasa	arilnitrilos, alquilnitrilos
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> B-261	Nitrilo hidratasa	indol-3-acetonitrilo
<i>Alcaligenes faecalis</i> DSM 6335	Nitrilasa	nitrilos heterocíclicos
<i>Bacillus cereus</i>	Nitrilo hidratasa	acrilonitrilo
<i>Bacillus</i> sp. BR449	Nitrilo hidratasa	acrilonitrilo
<i>Bacillus</i> sp. RAPc8 a, b	Nitrilo hidratasa	cicloalquilnitrilos
<i>Bacillus pallidus</i> Dac521	Nitrilasa, NHasa	alquilnitrilos, arilnitrilos, nitrilos heterocíclicos
<i>Bacillus smithii</i> SC-J05-1 a, b	Nitrilo hidratasa	alquilnitrilos
<i>Brevibacterium imperialis</i> CBS 489-74	Nitrilo hidratasa	acrilonitrilo
<i>Comamonas testosteroni</i> ATCC 55744	Nitrilo hidratasa	alquilnitrilos
<i>Comamonas testosteroni</i>	Nitrilasa	alquilnitrilos
<i>Gordona terrae</i> FERM BP-4535	Nitrilasa	alquilnitrilos
<i>Pseudomonas</i> sp. S1	Nitrilasa	alquilnitrilos, arilnitrilos, KCN
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> B23 (FERM BP-187)	Nitrilo hidratasa	alquilnitrilos
<i>Pseudomonas fluorescens</i> DSM 7155	Nitrilasa	alquilnitrilos
<i>Pseudomonas putida</i> NRRL-B-18668	Nitrilo hidratasa	alquilnitrilos
<i>Pseudomonas putida</i>	Nitrilo hidratasa	acetonitrilo, NaCN,
<i>Pseudonocardia thermophila</i> JCM3095	Nitrilo hidratasa	acrilonitrilo
<i>Rhodococcus</i> sp. 409 (NOVO SP 409)	Nitrilo hidratasa	arilnitrilos, nitrilos heterocíclicos, alquilnitrilos, cicloalquilnitrilos
<i>Rhodococcus</i> sp. C3II (DSM 9685)	Nitrilo hidratasa	alquilnitrilos, arilnitrilos
<i>Rhodococcus</i> sp. R312 (CBS 717.73)	Nitrilo hidratasa	alquilnitrilos, benzonitrilo
<i>Rhodococcus</i> sp. YH3-3	Nitrilo hidratasa	alquilnitrilos, arilnitrilos, nitrilos heterocíclicos
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Nitrilo hidratasa	acrilonitrilo
<i>Rhodococcus erythropolis</i> BL1	Nitrilo hidratasa	alquilnitrilos
<i>Rhodococcus erythropolis</i> FZB 53	Nitrilo hidratasa	nitrilos esteroideos
<i>Rhodococcus erythropolis</i> MP50 (DSM 9675)	Nitrilo hidratasa	alquilnitrilos, arilnitrilos,
<i>Rhodococcus equi</i> A4	Nitrilo hidratasa	alquilnitrilos, nitrilos heterocíclicos,
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> LL100-21	NHasa, Nitrilasa	cicloalquilnitrilos, arilnitrilos
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> IFO 15564	Nitrilo hidratasa	alquilnitrilos, arilnitrilos, 3-cianopiridina
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> NCIMB 11216,	Nitrilasas (2), NHasa	cicloalquilnitrilos, nitrilos heterocíclicos, alquilnitrilos
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> AJ270	Nitrilo hidratasa	arilnitrilos, nitrilos heterocíclicos, alquilnitrilos
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> J-1 (FERM BP-1478)	Nitrilo hidratasa, Nitrilasa	cicloalquilnitrilos, arilnitrilos, nitrilos heterocíclicos, alquilnitrilos
<i>Rhodococcus ruber</i>	Nitrilasa	alquilnitrilos, nitrilos heterocíclicos, arilnitrilos
<i>Rhodococcus ruber</i>	Nitrilasa	acrilonitrilo
Eucariotes		
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Nitrilasa	alquilnitrilos,
<i>Candida guilliermondii</i> CCT 7207	Nitrilo hidratasa	cicloalquilnitrilos, arilnitrilos, nitrilos heterocíclicos
<i>Candida famata</i>	Nitrilo hidratasa	alquilnitrilos
<i>Cryptococcus</i> sp. UFMG-Y28	Nitrilo Nidratasa	acetonitrilo, propionitrilo
<i>Cryptococcus flavus</i> UFMG-Y61	Nitrilo hidratasa	isobutironitrilo
<i>Rhodotorula glutinis</i> UFMG-Y5	Nitrilo hidratasa	metacrilonitrilo

2. NITRILASA

La nitrilasa fue descubierta hace más de 40 años, es la primera enzima descrita con la capacidad de degradar compuestos de tipo nitrilo. La enzima obtenida inicialmente de hojas de cebada, cataliza la conversión del 3-indol acetonitrilo a ácido 3-indolacético (una auxina). Esta reacción se observó en extractos obtenidos de diferentes plantas. Posteriormente se observó actividad de nitrilasa en extractos de bacterias del suelo (*Pseudomonas*) que fueron seleccionadas para crecer en un medio rico en un nitrilo natural, la ricina (*N*-metil-3-ciano-4-metoxi-2-piridona), como única fuente de carbono[28]. A la fecha se han caracterizado aproximadamente 10 nitrilasas provenientes de diferentes microorganismos, en su mayoría bacterias y una de planta (*Arabidopsis thaliana*)[29]. Aunque para la mayoría de estas nitrilasas, su caracterización bioquímica no es completa, los datos que arroja la literatura indican que las propiedades bioquímicas varían dependiendo de la especie. Las diferencias más significativas son la especificidad por sus sustratos, su estructura nativa, sus propiedades de agregación y su pH óptimo[28]. Basados en la especificidad por el sustrato las nitrilasas de bacterias se clasifican en tres categorías: aquellas que hidrolizan nitrilos aromáticos o heterocíclicos, las que degradan preferentemente nitrilos alifáticos o arilacetonitrilos y por último las que tienen capacidad de hidrolizar nitrilos, tanto aromáticos como alifáticos[1].

Hasta ahora, se ha encontrado que las nitrilasas no son enzimas constitutivas y requieren de un inductor para su expresión. Se ha reportado que la nitrilasa en *Nocardia sp* se induce por benzonitrilo[30]. El acetonitrilo se ha usado para inducir la expresión de nitrilasa en *Fusarium oxysporum*[31]. En *Rhodococcus rhodochous* J1, la nitrilasa se induce fuertemente por isovaleronitrilo[32] y caprolactama[33].

En general las nitrilasas son enzimas formadas por una cadena polipeptídica de en promedio 40 kDa (32-47 kDa). Las subunidades se asocian en

homooligómeros de diferentes tamaños, entre 6-26 subunidades la forma activa de la enzima[28].

En algunos casos es el propio sustrato el que induce la asociación de los monómeros, activando a la enzima. En presencia de benzonitrilo, los monómeros de la nitrilasa producida por *Nocardia sp* NCIB 11216 se asocian en un dodecámero de 560 kDa, catalíticamente activo[34]. Se ha reportado que la nitrilasa de *Rhodococcus rhodochrous* se transforma en su forma activa por asociación de subunidades cuando se incubaba en presencia del sustrato[35] o en presencia de altas concentraciones de enzima, sales o disolventes orgánicos[33]. La actividad de las nitrilasas, a diferencia de las nitrilo hidratadas no requiere de cofactores metálicos o grupos prostéticos. Se ha reportado la presencia de residuos esenciales de cisteína en o cerca del sitio activo[36, 37].

Pese al gran interés que existe en este grupo de enzimas y en los organismos que las producen, poco se ha progresado en su estudio desde el punto de vista de la estructura y el mecanismo. Se han purificado a homogeneidad las nitrilasas de tres especies: *Rhodococcus rhodochrous* K22 y JI[38, 39], *Alcaligenes faecalis* JM3[33] y *Pseudomonas fluorescens*[40] de las cuales sólo las de *R. rhodochrous* se han caracterizado de forma más detallada. De ninguna de ellas se conoce la estructura tridimensional. No hay hasta ahora, un estudio fisicoquímico y cinético detallado de esta enzima.

a. Clasificación por especificidad

Basados en su especificidad por el sustrato las nitrilasas se han agrupado en tres categorías: aquellas que hidrolizan nitrilos aromáticos o heterocíclicos, las que degradan nitrilos alifáticos o arilacetónitrilos y por último las que tiene capacidad de degradar compuestos tanto aromáticos como alifáticos (Tabla 3).

Tabla 3. Características de algunas nitrilasas de diferentes microorganismos (Banerjee A. Sharma R. Banjee UC. 2002).

Microorganismo	Tipo	Propiedades de la nitrilasa						Ref	
		Peso mol. (kDa)	No. de subunidades y peso mol. del monómero (kDa)	Óptimos		Estabilidad			
				pH	T (°C)	pH	T (°C)		
Bacteria									
<i>Nocardia sp.</i> NICB 11216	Inducible	560	- (45)	8.0	-	-	-	Aromáticos	[34]
<i>Nocardia sp.</i> NICB 11215	Inducible	560	12 (46)	8.0	40	7.0 – 9.5	10 – 50	Aromáticos y heterocíclicos	[41]
<i>R. rhodocorus</i> J1	Constitutiva	78	2 (41.5)	7.5	45	-	Por debajo de 50	Alifáticos y aromáticos	[38]
<i>R. rhodocorus</i> K22	Constitutiva	650	15 – 16 (41)	5.5	50	6.0 – 9.0	Por debajo de 50	Alifáticos	[39]
<i>R. rhodocorus</i> PA - 34	Inducible	45	Monomero	7.5	35	6.0 – 9.0	30 – 50	Alifáticos	[42, 43]
<i>R. rhodocorus</i> ATCC 39484	Inducible	560	- (40)	7.5	30	5.5 – 9.5	25 – 40	Aromáticos	[43]
<i>R. rhodocorus</i> NICMB 11216	Inducible	45.8	-	8.0	30	-	-	Aromáticos	[44]
<i>Arthobacter sp</i> J1	Inducible	30	1	8.5	40	-	-	Aromáticos	[45]
<i>Alcaligenes faecalis</i> JM3	Inducible	260	6	7.5	45	5.8 – 9.3	20 – 50	Arilacetónitrilo	[46]
<i>Acinetobacter sp.</i> AK 226	Inducible	580	-	8.0	50	5.8 – 8.0	Arriba de 60	Alifáticos y aromáticos	[47]
<i>Alcaligenes faecalis</i> ATCC 8750	Inducible	32	-	7.5	40 – 45	6.5 - 8.0	Por debajo de 50	Arilacetónitrilo	[48]
<i>Comoamonas testosterona</i>	-	-	Oligomérico (38)	7.0	25	-	-	Adiponitrilo	[49]
<i>Pseudomonas fluorescens</i> DSM 7155	Inducible	-	2 (40, 38)	9.0	50	-	-	Arilacetónitrilo	[40]
<i>Bacillus pallidus</i> Dac 521	Inducible	600	- (41)	7.6	65	6.0 – 9.0	Por debajo de 70	Aromáticos	[50]
<i>Klebsiella ozanae</i>	Constitutiva	37	2 (-)	9.2	35	-	-	Bromoxinil	[51]
Hongos									
<i>Fusarium solana</i>	Inducible	620	8 (76)	-	-	7.8 – 9.1	-	Aromáticos	[11]
<i>Fusarium oxysporum</i>	Constitutiva	550	Oligomérico (27)	-	4	6 - 11	-	Alifáticos y aromáticos	[31]
<i>Cryptococcus sp</i> UFMG - Y28	Inducible	-	-	-	-	-	-	Benzonitrilo	[52]

b. Mecanismo de acción

El mecanismo propuesto para la reacción catalizada por la nitrilasa involucra un ataque nucleofílico del grupo tiol de un residuo de cisteína del sitio

activo, sobre el carbono del grupo ciano, seguido de la protonación del nitrógeno, lo que produciría un intermediario imino tioéster. Posteriormente la adición de una molécula de agua ocasiona que se libere una molécula de amoniaco formándose una acil-enzima intermedia que por la adición de una segunda molécula de agua reconstituye la cisteína del sitio activo y libera el ácido carboxílico correspondiente (Fig. 8). En algunos casos el intermediario tetraédrico puede descomponerse en forma anormal para producir la amida en lugar del ácido carboxílico. Se ha reportado que la nitrilasa de *Rhodococcus rhodochrous* J1 cataliza la hidrólisis de amidas a amoniaco, lo cual sugiere que un intermediario tetraédrico común está involucrado para ambos sustratos[36].

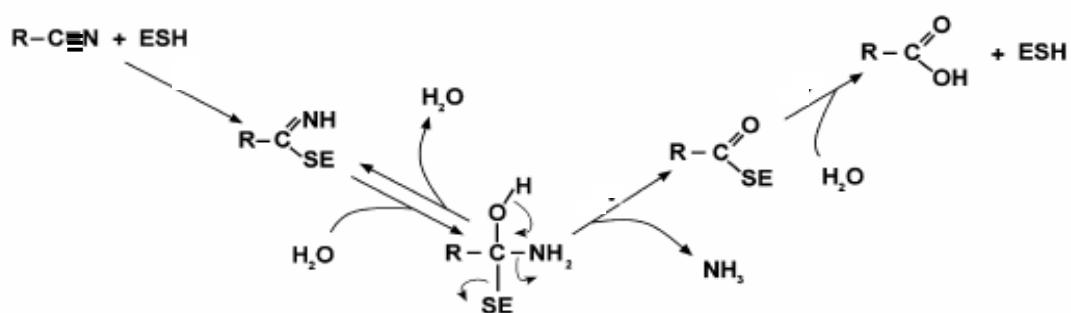


Fig. 8. Mecanismo de acción propuesto para la hidrólisis de nitrilos catalizada por nitrilasas. El mecanismo planteado es reversible hasta antes del desprendimiento de una molécula de amonio.

2. Nitrilo hidratatasas

Las enzimas nitrilo hidratatasas (NHAsas) juegan un importante papel en el proceso de utilización de los nitrilos por los microorganismos a través de su hidratación para formar amidas. En las plantas cianogénicas, son responsables de la biosíntesis de la L-asparagina mediante la hidratación de la β -cianoalanina, la cual proviene de la reacción del ácido cianhídrico con la cisteína, con la participación de la β -cianoalanina sintetasa[46]. El interés en estas enzimas ha crecido desde su aplicación en la producción industrial de amidas como la

acrilamida y la nicotinamida mediante la hidratación de los correspondientes nitrilos[46, 53].

Por otro lado, una combinación de nitrilo hidratasa y amidasa puede transformar nitrilos alifáticos en las sales de amonio de los correspondientes ácidos carboxílicos. Entre los géneros de bacterias que poseen ambas actividades enzimáticas se encuentran *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Bacteridium*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium* y *Micrococcus*.

Las NHasas están constituidas por dos subunidades, α y β . Son heterodímeros (con un centro metálico) y su disociación en los correspondientes monómeros implica la pérdida de la actividad. Estas enzimas contienen generalmente en su sitio activo, ya sea un átomo de Fe^{+3} no hemo (Fe-NHasas), o un átomo de Co^{+3} no corrinoide (Co-NHasas), dependiendo del microorganismo[54]. Una de las NHasas mejor caracterizadas proviene de *Rhodococcus* sp. N-771 y fue purificada en su forma inactiva[55]. La actividad de la NHasa de *Rhodococcus* sp. N-771 desaparece casi completamente cuando las células se incuban en forma aeróbica durante 16 horas en la oscuridad y es completamente reactivada mediante irradiación con luz.

En los últimos años se han empleado NHasas silvestres y mutantes, provenientes de diversos microorganismos como biocatalizadores para la producción industrial de acrilamida en escala de kilogramos a toneladas[56] y también para la síntesis enantioselectiva de otras amidas y en la biorremediación de suelos o aguas contaminados con nitrilos.

El mecanismo catalítico de las NHasas aún no ha sido descrito en detalle; sin embargo se han sugerido tres posibles mecanismos[24], (Fig. 9). El papel del ion metálico de la enzima en la hidratación parece ser el de un ácido de Lewis. Los

mecanismos alternativos suponen que el agua o el ion hidroxilo, coordinados al metal (Fe^{3+} o Co^{3+}), atacan al carbono del nitrilo (Fig. 9a y 9b), o que el ion metálico activa a una molécula de agua, la cual a su vez puede actuar como nucleófilo sobre el carbono del nitrilo coordinado al metal (Fig. 9c).

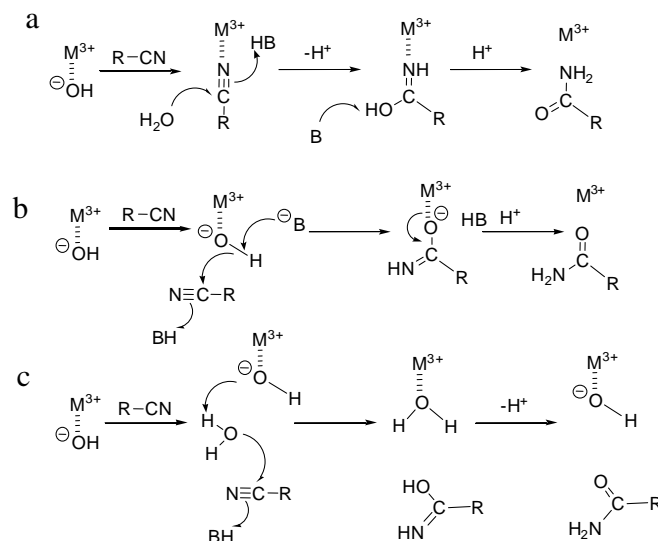


Fig. 9. Mecanismos propuestos para la hidratación de los nitrilos por las NHasas.

G. Importancia de la biocatálisis en la hidrólisis de los nitrilos.

Los nitrilos, las amidas y los ácidos carboxílicos, particularmente los enantiómeros puros de compuestos quirales, tienen amplia aplicación en las industrias química y farmacéutica. La hidrólisis de los nitrilos puede ser aprovechada para varios propósitos, incluida su aplicación en biocatálisis (4). Dada la poca solubilidad en agua de los sustratos, los bajos índices de conversión son un problema a resolver. Finalmente la enantioselectividad observada en la biotransformación de los nitrilos ha sido estudiada a través de la hidrólisis a carboxamidas mediante amidasas, observándose rendimientos mayores en el ácido (S)-carboxílico correspondiente[57].

Se han obtenido algunas aplicaciones comerciales de la bioconversión de

los nitrilos. Ejemplos sobresalientes son la producción a gran escala de acrilamida (Mitsubishi Rayon Co.) y nicotinamida (Lonza AG) usando como biocatalizador una nitrilo hidratasa obtenida de *Rhodococcus rhodochrous*[58]. Otros compuestos comercialmente producidos por nitrilasas son los ácidos (R)-mandélico y (R)-3-cloromandélico (Mitsubishi Rayon Co.). Aunque son pocos los procesos comerciales que utilizan nitrilasas, nitrilo hidratasas o ambas, parecen existir grandes oportunidades para su aplicación industrial[59] y algunas compañías (DuPont, Lonza, Dow, Diversa, BASF y DSM, entre otras) se encuentran investigando la aplicación de las nitrilasas en otros procesos. Una aplicación es la hidrólisis selectiva de nitrilos en presencia de grupos funcionales lábiles, lo que impide el empleo de condiciones de reacción extremas[60, 61].

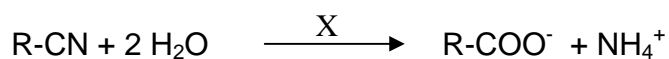
Resultados recientes indican que algunas enzimas que degradan nitrilos podría hidrolizar enantioselectivamente algunos nitrilos racémicos. Por ejemplo, una nitrilo hidratasa obtenida a partir de *Pseudomonas putida* NRRL-18668 es capaz de hidrolizar 50 veces más rápido el 2(S)-(4-clorofenil)-3-metilbutironitrilo que el enantiómero (R)[62]. También se ha observado hidrólisis estereoselectiva del 2-(4-metoxifenil)propiononitrilo por el sistema nitrilhidratasa presente en *Rhodococcus equi* A4[63, 64]. Aparentemente existe también la preferencia para degradar un solo grupo cuando se trata de dinitrilos. Por ejemplo, la enzima aislada de *Rhodococcus* AJ270, que tiene la capacidad de hidrolizar una gran cantidad de nitrilos, dinitrilos y amidas, presenta regioespecificidad para dinitrilos alifáticos[65, 66]. Las nitrilasas pueden discriminar entre isómeros configuracionales (E, Z)[67]. Adicionalmente pueden usarse para producir lactonas a partir de 4-hidroxinitrilos [68] y lactamas a partir de α, ω – dinitrilos[69].

Esta gran versatilidad de las enzimas transformadoras de nitrilos demuestra su gran potencial de aplicación en síntesis orgánica.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Cuando se encuentra una nueva enzima, uno de los primeros retos a los que nos enfrentamos es la optimización del cultivo del microorganismo para la adecuada expresión de la proteína, posteriormente la medición de la reacción o reacciones que dicha enzima cataliza. En una reacción química el avance de la misma puede determinarse midiendo la aparición de algún producto o bien por la desaparición de alguno de los reactivos. En el caso específico de la nitrilasa obtenida de *Rhodococcus pyridinovorans* V51B la transformación de los nitrilos en sus correspondientes ácidos carboxílicos se lleva a cabo de manera completa e irreversible. Al tener la capacidad de transformar nitrilos aromáticos y alifáticos su aplicación puede ser enorme tanto en bioconversión de compuestos como en eliminación de contaminantes, sin embargo esa misma versatilidad complica la posibilidad de desarrollar un método general de medición a partir el ácido carboxílico formado.

La reacción general del proceso es:



Donde X puede ser un ácido o una base fuerte o bien, como en nuestro caso, una nitrilasa. Evidentemente R puede ser aromático (sin sustituir, mono o polisustituido, con cadenas entre el grupo CN y el anillo, con ramificaciones o grupos polares o no polares en la cadena) o alifático (lineal, ramificado, mono o polisustituido); lo cual nos brinda una enorme variedad de compuestos que se pueden producir a partir de la reacción catalizada por las nitrilasas. Esa misma variedad implica muchas posibles reacciones para determinar los ácidos formados de la biotransformación.

Dado este razonamiento, el producto común a medir es el amoniaco

producido en la reacción. La gran volatilidad de este compuesto dificulta su cuantificación precisa, particularmente en las condiciones necesarias para la catálisis enzimática, que implican temperaturas superiores a la ambiente y valores de pH a los que el amoníaco se encuentra en equilibrio dinámico con el ión amonio.

Hasta la fecha, se ha propuesto un método de monitoreo para biotransformación de nitrilos usando espectroscopia por infrarrojo medio[70], o bien el seguimiento de la reacción mediante el uso de cromatografía de líquidos de alta resolución en fase reversa (HPLC)[38]. Ambos métodos tienen el inconveniente de requerir tiempos largos para cada determinación lo que los hace ineficientes para el seguimiento del curso en el tiempo de la reacción. También, se ha propuesto la posibilidad de realizar el monitoreo de la reacción mediante el uso de indicadores de pH, aprovechando la producción de ácido en el proceso[71]. En todos estos métodos se ha buscado determinar la formación del ácido o amida producidos (por las nitrilo hidratadas) o bien monitorear la desaparición del nitrilo usado como sustrato. Eso ha implicado la adecuación de mezclas de disolventes, el uso de diferentes columnas y en general prácticamente el desarrollo de un método de análisis por cada sustrato probado. Por otra parte, utilizando un detector de UV el método no es aplicable a nitrilos alifáticos. Otra dificultad, es que los métodos por HPLC son determinaciones a tiempo fijo y no métodos cinéticos. En general, para estudios cinéticos se prefieren los métodos de monitorización continua de la reacción.

Para poder llevar a cabo una purificación y la caracterización cinética de la enzima aislada es necesario disponer de un procedimiento práctico para cuantificarla. Este proyecto tiene la finalidad de resolver las siguientes situaciones:

1. Optimizar el método de cultivo de tal manera que la proteína se exprese en cantidades adecuadas para ser medida y purificada.
2. Obtener un método de medición confiable y reproducible, basado

en el acoplamiento con otra enzima que tiene la capacidad de fijar amonio y observar el desarrollo de la reacción mediante la aparición de un nuevo compuesto o bien la desaparición de algún componente de la mezcla de reacción.

3. Realizar la purificación parcial o total de la enzima
4. Determinar el comportamiento cinético de la enzima en por lo menos dos sustratos (benzonitrilo y valeronitrilo).

III. OBJETIVOS

A. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la nitrilasa obtenida a partir de *Rhodococcus pyridinovorans* V51B.

B. OBJETIVOS PARTICULARES

Desarrollar un método de ensayo para medir la actividad de la nitrilasa de *Rhodococcus pyridinovorans* V51B.

1. Acoplamiento enzimático.
2. Ensayo potenciométrico (Δ pH).

Optimizar la inducción de la nitrilasa de *Rhodococcus pyridinovorans* V51B.

Purificar la proteína.

Determinación de los parámetros cinéticos (K_m , K_{is} , V_{max}^{app} , k_{cat}).

IV. HIPÓTESIS

Al desarrollar un método adecuado de medición de actividad será posible verificar la optimización del método de cultivo del *Rhodococcus pyridinovorans* V51B, así como la expresión adecuada de la nitrilasa en los extractos proteicos de la biomasa obtenida. Del mismo modo podrá realizarse el seguimiento de la presencia de la proteína en una purificación y obtenerse los parámetros cinéticos de la proteína pura.

V. EQUIPOS

Agitador orbital marca Forma Scientific.

Centrífuga Beckman Avanti J-25-I.

Rotor JLA 10.500.

Rotor JLA 25.000.

Ultrasonic Processor modelo CV 26.

Potenciómetro Methrom 713.

Cromatógrafo de líquidos de alta resolución. Equipo Waters 600E.

Detector Waters UV 486.

Cromatógrafo de líquidos de alta resolución para proteínas.

Bomba Waters 626.

Detector Waters UV 2487.

Espectrofotómetro Cary 400 con control de temperatura.

VI. MATERIALES Y REACTIVOS

Los reactivos fueron adquiridos en Sigma Aldrich.

A. Material biológico

Cepa de *Rhodococcus pyridinovorans* V51B (aislada por Regla y Zaldívar, 2003).

Cepa de *Escherichia coli* K12 590 PUC Nag B.

L-Glutamato deshidrogenasa bovina (L-GDH_b).

B. Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados se prepararon de acuerdo a la siguiente composición:

Medio Luria Bertrani modificado (LBm).

Agar.

Hidrolizado enzimático de caseína.	10.0 g L ⁻¹
Extracto de levadura.	5.0 g L ⁻¹
Cloruro de sodio.	9.0 g L ⁻¹
Fosfato monoácido de sodio.	1.0 g L ⁻¹
Bactoagar.	15.0 g L ⁻¹

Líquido.

Hidrolizado enzimático de caseína.	10.0 g L ⁻¹
Extracto de levadura.	5.0 g L ⁻¹
Cloruro de sodio.	9.0 g L ⁻¹
Fosfato monoácido de sodio.	1.0 g L ⁻¹

Medio mínimo salino (MMS).

Fosfato diácido de potasio.	0.3 g L ⁻¹
Fosfato monoácido de potasio.	0.7 g L ⁻¹
Sulfato de magnesio heptahidratado.	0.5 g L ⁻¹
Sulfato ferroso.	0.01 g L ⁻¹
Bactoagar.	15.0 g L ⁻¹
Benzonitrilo.	1.01 g L ⁻¹
El pH se ajusta a 7.2.	

Medio Mínimo Toru Nagasawa modificado (TNm).

Glucosa.	15.0 g L ⁻¹
Glutamato de sodio.	2.0 g L ⁻¹
Extracto de levadura.	1.0 g L ⁻¹
Fosfato diácido de potasio.	0.5 g L ⁻¹
Fosfato monoácido de potasio.	0.5 g L ⁻¹
Sulfato de magnesio heptahidratado.	0.1 g L ⁻¹
Caprolactama.	5.0 g L ⁻¹
El pH se ajusta a 7.2.	

Precipitación y conservación del precipitado.

Sulfato de amonio anhidro.	Q.P.
2-Mercaptoetanol.	Q.P.

Solución amortiguadora de sonicación (pH 7.7).

Etilendiaminotetraacetato de potasio.	7.4 g L ⁻¹
Cloruro de potasio.	11.18 g L ⁻¹
Trietanolamina (Tris).	12.11 g L ⁻¹

El pH se ajusta a 7.7.

Reacción acoplada con Glucosamina 6 fosfato desaminasa de *Escherichia coli* (EcGNPD).

Ácido clorhídrico.	12 M
Ácido acético glacial.	Q.P.
Tris-HCl.	1 M pH 7.7
Carbonato ácido de amonio.	Sol. Saturada
Carbonato ácido de amonio.	1 M pH 7.7
Anhídrido acético.	Q.P.
Borato de potasio.	0.9 M pH 9.2
<i>p</i> -dimetilaminobenzaldehído.	Q.P.
Fructosa-6-fosfato.	50 mM pH 7.7
<i>N</i> -acetilglucosamina-6-fosfato.	100 mM pH 7.7
Benzonitrilo.	20 mM pH 7.7
EcGNPD.	
Agua desionizada.	

Reacción acoplada con L-Glutamato deshidrogenasa bovina (L-GDH_b).

α -Cetoglutarato.	100 mM pH 7.5
Nicotinamida Adenina Dinucleótido Reducido (NADH).	6.4 mM pH 7.5
Benzonitrilo.	30 mM pH. 7.5
Valeronitrilo.	80 mM pH 7.5
L-Glutamato deshidrogenasa bovina (L-GDH _b).	100 UI mL ⁻¹ pH 7.5
Nitrilasa <i>Rp</i> V51B (semipurificado).	pH 7.5
Tris.	20 mM pH 7.5

Mezcla de elución para HPLC en fase reversa.

Acetonitrilo.	30 %
Amortiguador de fosfatos 50 mM pH 3.0.	70 %

Ensayo potenciométrico.

Nitrilasa <i>Rp</i> V51B (semipurificado).	pH 8.2
Benzonitrilo.	30 mM pH 8.2

VII. METODOLOGÍA

A. Cultivo.

1. Obtención de biomasa en medio Luria Bertani modificado.

a. Usando como inductor benzonitrilo

El microorganismo se siembra en placas de medio LBm. Se incuba a 30 °C durante 48 a 72 horas, se siembra en MSS una colonia aislada y se incuba por 48 horas, se toma una colonia aislada y con ella se siembra un tubo de cultivo con 10 mL de medio LBm líquido (LBLm) y se deja incubar durante 12 horas a 30 °C con agitación orbital a 230 rpm. Se transfiere en condiciones estériles a un matraz de cultivo de 500 mL que contiene 250 mL de LBLm, se agregan 250 µL de Benzonitrilo. Se incuba a 30 °C y 230 rpm durante seis horas, transcurrido este tiempo se agregan 250 µL más de benzonitrilo y se incuba durante 18 horas más. Al término de este tiempo se transfiere la totalidad del medio a un matraz de cultivo de 2 L con 750 mL de medio LBLm y se agrega 1 mL de benzonitrilo. Se incuba durante 24 horas a 30 °C y 230 rpm.

b. Usando como inductor valeronitrilo

El microorganismo se siembra en placas de medio LBm. Se incuba a 30 °C durante 48 a 72 horas, se siembra en MSS una colonia aislada y se incuba por 48 horas, se toma una colonia aislada y con ella se siembra un tubo de cultivo con 10 mL de medio LBm líquido (LBLm) y se deja incubar durante 12 horas a 30 °C con agitación orbital a 230 rpm. Se transfiere en condiciones estériles a un matraz de cultivo de 500 mL que contiene 250 mL de LBLm, se agregan 125 µL de valeronitrilo. Se incuba a 30 °C y 230 rpm durante seis horas, transcurrido este

tiempo se agregan 125 μ L más de valeronitrilo y se incuba durante 18 horas adicionales. Al término de este tiempo se transfiere la totalidad del medio a un matraz de cultivo de 2L con 750 mL de medio LBLm y se agrega 500 μ L de valeronitrilo. Se incuba durante 24 horas a 30 °C y 230 rpm.

2. Obtención de biomasa en medio Toru Nagasawa modificado (TNm)

Una muestra de *Rhodococcus pyridinovorans* V51B se siembra en placas de medio LBm. Se incuba a 30 °C durante 48 a 72 horas, de una colonia aislada se siembra en MSS y se incuba por 48 horas, se toma una colonia aislada y con ella se siembra un tubo de cultivo con 10 mL de medio LBm líquido y se deja incubar durante 12 horas a 30 °C y a 230 rpm. De aquí se toma un mililitro y se coloca en un matraz de cultivo de 2 L que contiene 1000 mL de medio mínimo TNm y se incuba a 30 °C y a 230 rpm durante 60 horas.

B. Obtención del extracto enzimático

La biomasa producida se colecta centrifugando a 5000 rpm durante 30 minutos a 4 °C. Se lava en tres ocasiones con 300 mL de amortiguador de Tris 10 mM pH 7.5 centrifugando en cada ocasión a 5000 rpm por 30 minutos a 4 °C. Se agregan 8 mL de amortiguador para sonicar por gramo de biomasa húmeda, se rompen las células con un equipo Ultrasonic Processor modelo CV 26 mediante pulsos de 9-9 (nueve segundos de pulsos sónicos por nueve segundos de pausa) durante 10 minutos y se dan 10 minutos de interrupción. Este proceso se repite en 3 ocasiones manteniendo la temperatura por debajo de los 14 °C. La biomasa tratada se centrifuga a 18000 rpm (39,191 x g) durante 30 min a 4 °C. El sobrenadante se colecta y se precipita con sulfato de amonio al 30% de saturación. Se separa el precipitado por centrifugado a 14000 rpm / 30 min / 4 °C. El precipitado se desecha y se agrega sulfato de amonio al sobrenadante hasta

60% de saturación, se agrega $1 \mu\text{L mL}^{-1}$ de 2-mercaptoetanol (que actúa como reductor de la cisteína del sitio activo), para alcanzar una concentración final de 14.25 mM.

Para todos los ensayos (excepción hecha del ensayo potenciométrico, cuyas condiciones se describen en la parte correspondiente) la fracción precipitada al 60% de sulfato de amonio es dializada en amortiguador de Tris 20 mM a 4°C , durante 8 horas, con cambios de amortiguador cada dos horas.

C. Purificación parcial

La fracción precipitada con sulfato de amonio al 60% de saturación se colecta por centrifugación a 12000 rpm durante 3 min. El sobrenadante se desecha y el botón se resuspende en el volumen mínimo de amortiguador de Tris 10 mM pH 7.5. Este sobrenadante se aplica a una columna de filtración molecular Superdex 200 que se eluye con Tris 10 mM a un flujo de 1 mL min^{-1} . El perfil de elución obtenido se muestra en la Fig. 10.

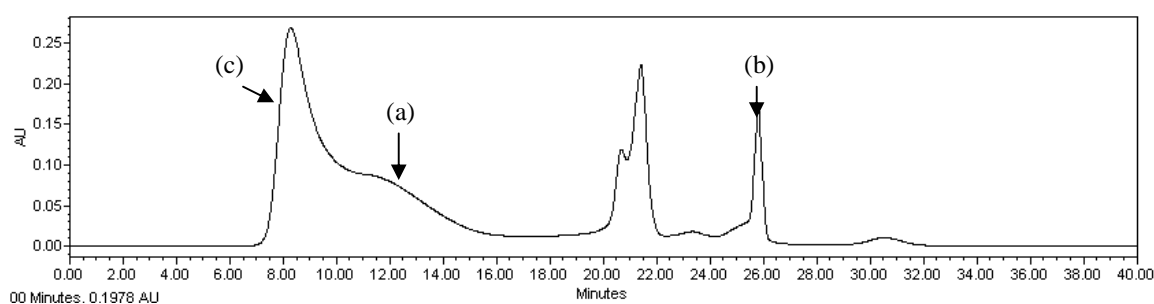


Fig. 10. Perfil de elución obtenido por HPLC en una columna analítica Superdex 200. La actividad de nitrilasa ha sido observada en la zona señalada como (a) y en el pico marcado como (b). La zona (a) corresponde a agregados (posiblemente decámeros o dodecámeros) y el pico (b) corresponde aparentemente al dímero. En el pico (c) se observa una aparente actividad de NADH-oxidasa.

Se observan zonas con actividad de nitrilasa, las cuales corresponden aparentemente al dímero (pico b) y al agregado (zona a). Se ha sugerido que estas enzimas tienden a aglomerarse por efecto de los sustratos o bien como consecuencia del incremento de la temperatura[33]. El pico denominado c presenta una intensa actividad de NADH oxidasa, la cual ha resultado un factor importante de interferencia en uno de los ensayos de actividad implementados en este trabajo.

D. Ensayo de actividad.

Hasta el momento se han probado dos métodos de ensayo: por HPLC y por acoplamiento enzimático. El procedimiento potenciométrico se considera viable, sin embargo no se ha desarrollado totalmente. Los fundamentos y las técnicas de los diferentes ensayos de actividad desarrollados durante este trabajo se mencionan a continuación.

1. Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

Esta técnica desarrollada por el Dr. Ignacio Regla[2] es usada para nitrilos aromáticos. El detector utilizado es un detector Waters UV a una longitud de onda de 220 nm.

Colocando volúmenes iguales de extracto de enzima y solución de nitrilo se hace reaccionar a 30 °C. Pasados cinco minutos de incubación, se detiene la reacción adicionando el mismo volumen de mezcla de reacción y del disolvente de elución cromatográfica. La columna utilizada es una columna Waters C₁₈ 3.5 μm (4.6 x 75 mm). Antes de pasar la muestra por la columna se filtra por membranas de nylon Waters de 4.5 μm de poro. El flujo se mantiene a 1 mL min⁻¹. El perfil obtenido se muestra en la Fig. 11.

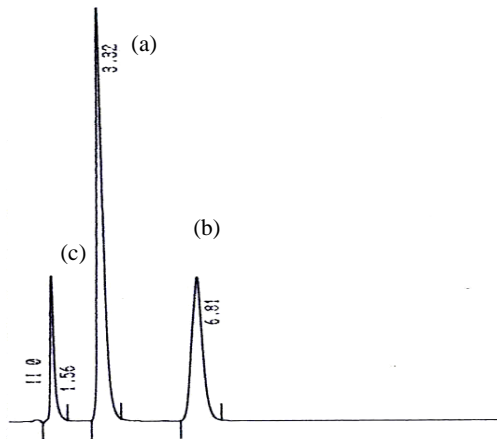


Fig. 11. El perfil de elución obtenido mediante el método por HPLC permite observar tanto la presencia de sustrato [benzonitrilo (b)] como la de producto [ácido benzoico (a)]. Se puede monitorizar la reacción a través de cualquiera de las dos especies químicas. El pico denominado (c) es debido al mercaptoetanol adicionado para mantener reducidos los residuos de cisteína presentes en la enzima.

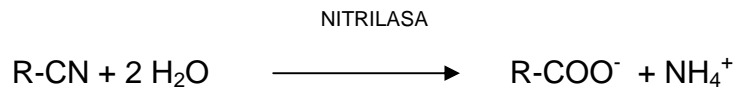
La separación entre los picos correspondientes a ambos compuestos es de poco más de 3 minutos, lo que permite distinguir perfectamente entre uno y otro; por otra parte este método nos ha permitido clasificar la enzima producida por *Rhodococcus pyridinovorans* V51B como una nitrilasa al no observarse la presencia de una amida intermedia.

2. Ensayos acoplados.

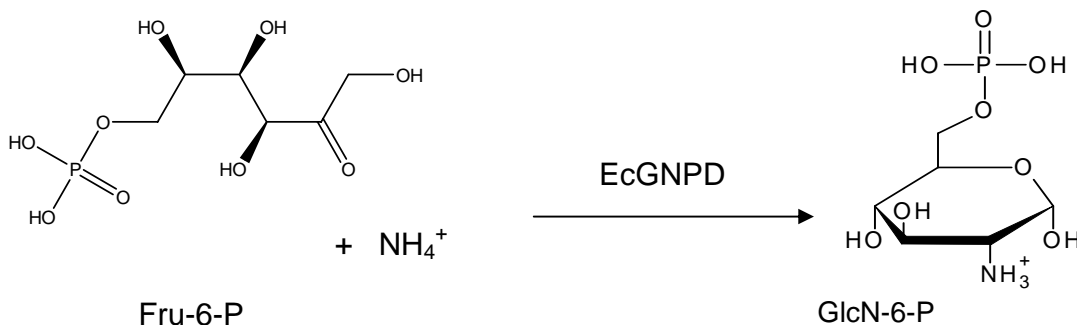
a. Glucosamina 6-fosfato desaminasa (EcGNPD)

El primer intento de ensayo acoplado pretendía aprovechar la reacción reversa de la glucosamina 6 fosfato desaminasa (EcGNPD) de *Escherichia coli* para captar el amonio producido por la nitrilasa y unirlo a una fructosa 6 fosfato (Fru-6-P) y formar glucosamina 6-fosfato (GlcN-6-P). Esta enzima, ampliamente estudiada en el laboratorio de fisicoquímica e ingeniería de proteínas de la Facultad de Medicina de la UNAM, tiene la propiedad de fijar amonio cuando se encuentra en presencia de fructosa 6-fosfato (Fru-6-P) y de su activador alostérico la *N*-acetil glucosamina 6-fosfato (GlcNAc-6-P), por lo que surgía como un candidato idóneo para acoplar ambas reacciones y permitir el monitoreo en tiempo real de la actividad de la primera.

La reacción catalizada por la nitrilasa, en la que se produce una molécula de amonio por cada molécula de nitrilo transformada es la siguiente:

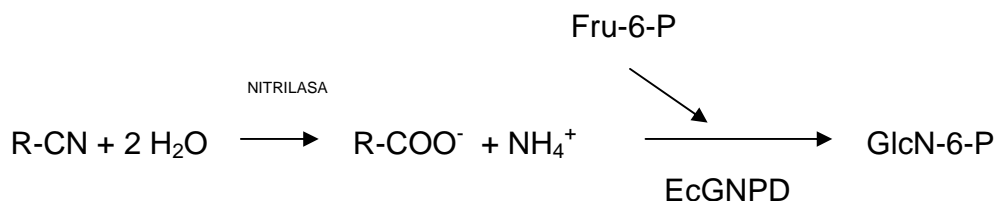


La reacción inversa catalizada por la EcGNPD se muestra a continuación:



La reacción acoplada utiliza el ion amonio producido por la nitrilasa, éste en

presencia de la EcGNPD reacciona con una molécula de Fru-6-P para producir una molécula de GlcN-6-P de acuerdo al esquema siguiente:



Posteriormente la GlcN-6-P que se forma es acetilada a GlcNAc-6-P, acoplada a un cromógeno (p-dimetilaminobenzaldehido) y el producto coloreado que se forma se cuantifica en un espectrofotómetro.

Técnica

Las concentraciones finales de los reactivos en la mezcla de reacción para la cinética enzimática son las siguientes:

Fru-6-P	10 mM
GlcNAc-6-P	43.5 μ M
Tris	50 mM
Carbonato ácido de amonio	Variable (de 0 a 70 mM)
EcGNPD	

El volumen de la mezcla de reacción se completa a 200 μ L con agua destilada.

Para observar el efecto de la presencia de nitrilo en la reacción de la EcGNPD: las concentraciones finales en la mezcla de reacción son:

Fru-6-P	10 mM
GlcNAc-6-P	43.5 μ M
Tris	50 mM
Carbonato ácido de amonio	Variable (de 0 a 70 mM)
Benzonitrilo	1 mM
EcGNPD	

El volumen de la mezcla de reacción se completa a 200 μ L con agua destilada.

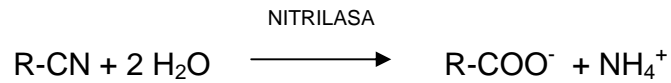
En ambos casos se incuba a 30° C por exactamente 10 minutos. Pasado este tiempo se detiene la reacción introduciendo la mezcla en agua a 92 °C durante tres minutos (92 °C; 3'), después se enfría a una temperatura de 2 a 4 °C por tres minutos más (2-4 °C; 3'). Se agregan 50 µL de solución saturada de carbonato ácido de amonio, se homogeniza perfectamente (92 °C; 3'), (2-4 °C; 3'). Se agregan 50 µL de una mezcla anhídrido acético-agua (1+19 V/V), (92 °C; 3'), (2-4 °C; 3'). Se agregan 50 µL de borato de potasio 0.9 M pH 9.2, (92 °C; 3'), (2-4 °C; 3'). Se agregan 1500 µL del reactivo desarrollador de color, (preparado de la siguiente manera: 5 g p-dimetilaminobenzaldehído, 500 µL ácido clorhídrico 12 M, se completa el volumen a 50 mL con ácido acético glacial). Se incuba a 37 °C durante 15 minutos, se mide la absorbancia a 544 nm utilizando como blanco el primer tubo de la serie.

b. L-Glutamato deshidrogenasa (L-GDH)

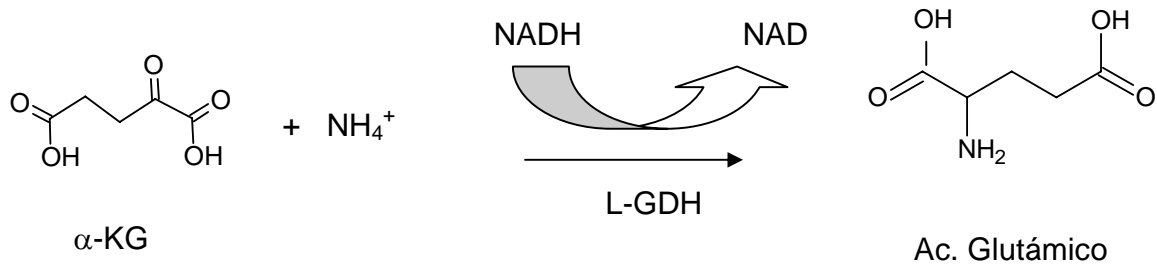
Otro ensayo acoplado ha aprovechado la propiedad de la L-Glutamato deshidrogenasa bovina (L-GDH_b) para, transformar el alfa cetoglutarato (α -KG) en ácido glutámico (Glu) utilizando amonio (NH_4^+) y oxidando la nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH) a nicotinamida adenina dinucleótido (NAD). Esta oxidación puede monitorearse a través del cambio en la absorbancia a 340 nm.

El acoplamiento de la reacción de la L-GDH a reacciones que producen amonio se encuentra ampliamente difundido en química, se aprovecha para determinar urea, transaminasas (alaninoaminotransferasa ALAT y aspartatoaminotransferasa ASAT) y a través del tiempo ha demostrado ser un método confiable y reproducible para medir la producción de amonio.

La reacción catalizada por la nitrilasa, en la que se produce un ion amonio es la siguiente:



La reacción inversa catalizada por la L-GDH es la siguiente:



Esta reacción se acompaña de la disminución de la absorbancia a 340 nm, debido a que el NADH se oxida. Esta reacción implica un reacomodo en los enlaces del anillo nicotinamida (Fig. 12), cambiando con ello la resonancia del cromóforo y perdiendo la capacidad de absorber la luz a 340 nm.

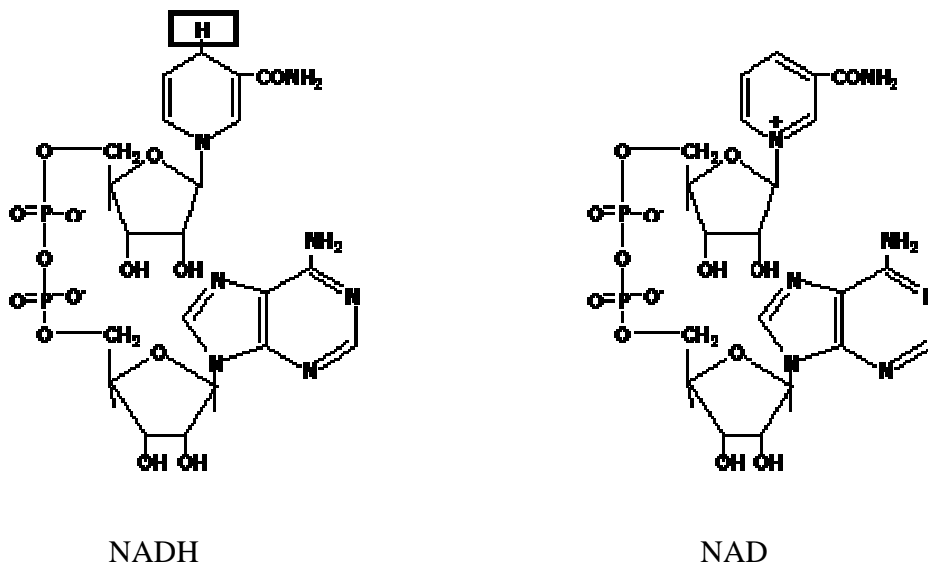
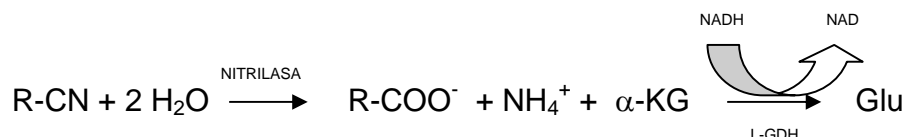


Fig. 12. La pérdida o ganancia de un protón en el NAD ocasiona un reacomodo de los electrones en el anillo nicotinamida presente en la molécula. Este reajuste ocasiona (en la forma oxidada) una pérdida en la capacidad de resonancia de la molécula y por lo tanto la pérdida de la absorbancia en la zona del ultravioleta cercano.

Nuevamente la reacción acoplada es alimentada por el ion amonio producido por la nitrilasa, el amonio es unido por la L-GDH_b a una molécula de alfa cetoglutarato y es producida una molécula de ácido glutámico de acuerdo al esquema siguiente:



En la reacción acoplada, cada molécula de nitrilo que es transformada produce un ion amonio que reacciona con el alfa cetoglutarato, produciendo una molécula de ácido glutámico. Esto involucra la oxidación de una sola molécula de NADH. Por lo tanto, la pérdida de absorbancia a 340 nm será directamente proporcional al consumo de nitrilo usado como sustrato. La reacción acoplada se inicia cuando la nitrilasa comienza la transformación del nitrilo y la producción de amonio a partir de él.

Técnica

Las concentraciones finales de los reactivos en la mezcla de reacción para la cinética enzimática de la L-GDH_b en presencia de benzonitrilo son las siguientes:

α -Cetoglutarato (α -KG)	1 mM
NADH	320 μ M
Benzonitrilo	Variable (0 a 9 mM)
Carbonato ácido de amonio	Variable (0 a 40 mM)
L-GDH _b	1 UI mL ⁻¹

El volumen se completa a 500 μ L con tris 20 mM

La reacción se inicia al adicionar el α -KG, por lo que todos los demás componentes se colocan en la celda, se mezclan y se colocan en el

espectrofotómetro. Se realiza una lectura inicial, posteriormente se agrega el α -KG, se mezcla nuevamente y se introduce la celda en el espectrofotómetro. Se realizan lecturas continuas durante 2 minutos. Al término del tiempo de reacción se ubica la zona lineal en la curva de pérdida de absorbancia y se calcula la pendiente. Conociendo el ϵ_{340} del NADH o bien a partir de una curva de calibración que relacione la concentración de NADH con la absorbancia es posible conocer la velocidad inicial (v_0) en μM de NADH transformados min^{-1} .

c. Ensayo acoplado L-GDH_b Nitrilasa.

Para el ensayo acoplado las concentraciones de los reactivos en la mezcla de reacción son las mismas que en el ensayo de L-GDH_b en presencia de benzonitrilo, solo se agrega el extracto de nitrilasa o la nitrilasa parcialmente purificada y no se añade la sal de amonio.

α -Cetoglutarato (α -KG)	1 mM
NADH	320 μM
Benzonitrilo	Variable (0 a 6 mM)
Valeronitrilo	Variable (0 a 8 mM)
L-GDH	1 UI mL^{-1}
Nitrilasa (extracto)	se agregan 20 μL

El volumen se completa a 500 μL con tris 20 mM

En este caso la reacción se inicia cuando la nitrilasa comienza a consumir el nitrilo, por lo tanto la mezcla contendrá de inicio, todos los participantes a excepción del extracto de nitrilasa.

d. Ensayo potenciométrico (Δ pH)

Siguiendo la propuesta de monitorear la reacción mediante variaciones de pH realizada por Banerjee *et al*, se pensó en la posibilidad de realizar un seguimiento de la variación de pH en tiempo real, para esto se usó un potenciómetro Methrom. La agitación fue constante durante todo el tiempo del ensayo.

En este ensayo es muy importante evitar la presencia de cualquier reactivo que pueda actuar como amortiguador, excepción hecha por obvias razones, de los grupos en las proteínas que contiene el extracto o la fracción parcialmente purificada de nitrilasa, esto debido a que las especies ácidas y alcalinas producidas serían amortiguadas por cualquier amortiguador por muy poco concentrado que se encontrara. Para lograr esto, el extracto precipitado en sulfato de amonio es dializado a 4 °C, con agua desionizada durante 8 horas, realizándose tres cambios en ese tiempo.

Una vez realizada la diálisis el pH se ajusta a 8.2 tanto en el extracto de nitrilasa, como en el agua para completar el volumen de la mezcla y en la solución de nitrilo. En todo momento se evita la presencia de cualquier amortiguador en la mezcla de reacción. La mezcla de reacción está compuesta por:

Nitrilasa <i>Rp V51B</i> (Extracto)	200 mL
Benzonitrilo	Concentración variable
Agua desionizada pH 8.2	c.b.p. 5 mL

El ensayo se inicia cuando el extracto y el nitrilo se ponen en contacto y se realiza el seguimiento a través del tiempo con la intención de determinar la zona que puede ser considerada como de velocidad inicial, que será aquella zona cercana al inicio del ensayo en la que se observe un Δ pH que varíe de manera lineal en función del tiempo.

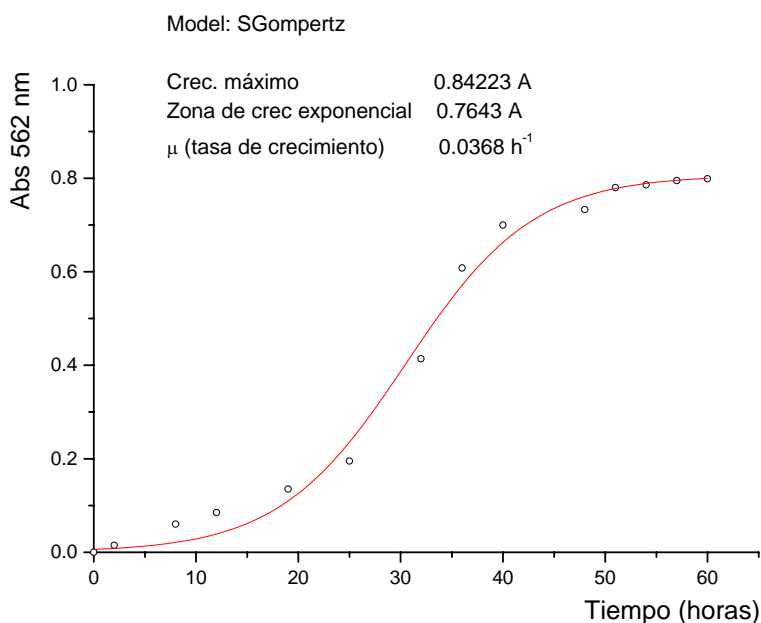
VIII. RESULTADOS

A. Optimización del método de cultivo

Rhodococcus pyridinovorans V51B tiene la facilidad de expresar la enzima nitrilasa al usar benzonitrilo, valeronitrilo o caprolactama como fuente de carbono y nitrógeno. La eficiencia, bajo costo, menor volatilidad y menor toxicidad de la caprolactama ha ocasionado su uso preferente.

Para evaluar el tiempo recomendable de cultivo fue realizada la toma de muestras a diferentes tiempos, se midió la absorbancia a 562 nm como indicativo del crecimiento bacteriano (Fig. 13) y se observó la presencia de la proteína objeto de este estudio en algunas de ellas a través de la búsqueda de actividad en los picos observados en los perfiles de elución en la columna de filtración molecular Superdex 200. (Fig. 14)

Fig. 13. Curva de crecimiento de *Rhodococcus pyridinovorans* V51B. La curva muestra un crecimiento exponencial simple. La tasa de crecimiento nos demuestra que se trata de un microorganismo de crecimiento lento.



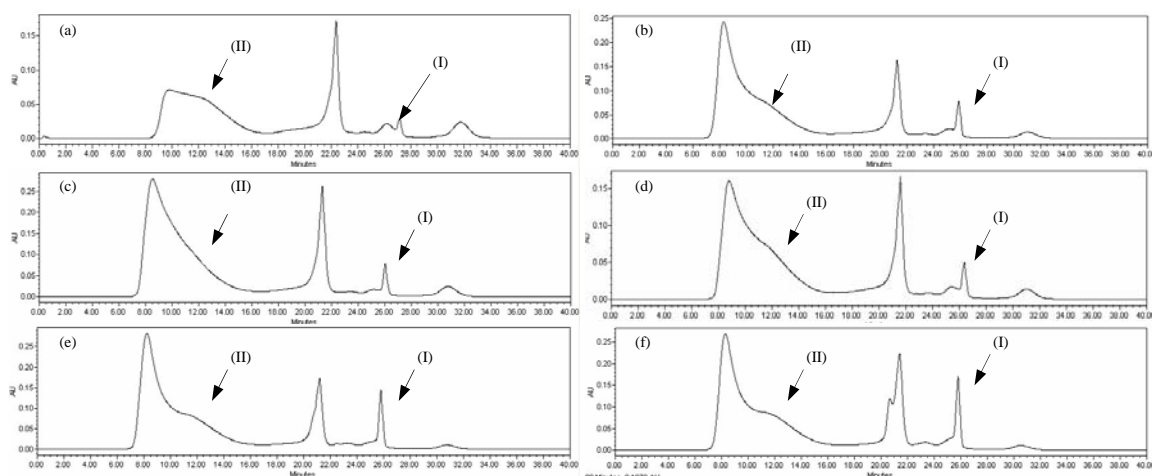


Fig 14. Perfiles de elución del extracto protéico de *Rhodococcus pyridinovorans* V51B obtenidos por fraccionamiento del extracto extracelular en una columna Superdex 200 a 1 mL min^{-1} . La secuencia corresponde a los tiempos en que se realizó el muestreo de biomasa, esta fue rota según el método descrito y el extracto obtenido siguió con el protocolo de la precipitación parcial con sulfato de amonio. (a) corresponde a 26.5 horas de incubación. (b) 36 horas. (c) 40 horas. (d) 48 horas. (e) 54 horas. (f) 60 horas. Las zonas que muestran actividad de nitrilasa se encuentran señaladas (I) corresponde al dímero. (II) corresponde al agregado.

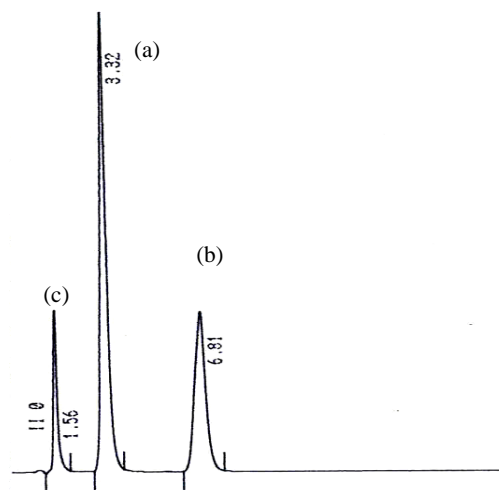
En la Fig. 14 se aprecia como al transcurrir el tiempo el pico señalado como I aumenta en proporción a los demás picos en el perfil. Este fenómeno sugiere que la producción de la nitrilasa por *R. pyridinovorans* V51B se incrementa conforme la edad del cultivo es mayor. La zona marcada como II corresponde a la formación de agregados de la proteína, la cual hasta el momento no ha podido evitarse debido a que este fenómeno se presenta como consecuencia del incremento de la temperatura y/o la presencia del sustrato en el medio. Estos resultados plantean que el momento propicio para cosechar las células es entre las 54 y las 60 horas.

B. Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

Un método que ha brindado buenos resultados según los artículos consultados es la cromatografía de líquidos de alta resolución conocida por sus siglas en inglés (HPLC), método que han empleado prácticamente todos los equipos de investigación dedicados al estudio de nitrilasas[1, 30, 38]. Tiene la ventaja de ser muy sensible, de brindar resultados confiables y de (en el caso de las condiciones desarrolladas para este estudio) ser bastante rápido. Permite el estudio de la actividad tanto de suspensiones celulares como de ensayos con extractos proteicos. Una de sus principales desventajas es que se debe adecuar la mezcla de disolventes para cada compuesto ensayado, sobre todo si existen otros grupos funcionales.

El perfil o cromatograma obtenido para el seguimiento de la reacción con benzonitrilo ha mostrado sólo dos picos completamente separados (Fig. 15) identificados como ácido benzoico y benzonitrilo mediante el uso de estándares conocidos. No existe evidencia experimental de la presencia de una amida intermediaria por lo que consideramos que *R. pyridinovorans* V51B produce una nitrilasa y no un sistema nitrilo hidratasa – amidasa. Otro fundamento de esta afirmación es el hecho de que cuando se pone benzamida en la mezcla de reacción en los ensayos tanto con células enteras como con extractos proteicos, no se detecta la producción de ácido benzoico.

Fig. 15. Cromatograma por HPLC, se observa la presencia de ácido benzoico (a) y benzonitrilo (b). El pico (c) corresponde al mercaptoetanol en la mezcla de reacción. No se detecta la presencia de amida intermedia.



Con base a la medida del área bajo la curva (ABC) de las muestras y los estándares internos es posible, ayudados por una curva de calibración, cuantificar la cantidad de ácido producido o de sustrato (nitrilo) transformado.

Para la curva de calibración se obtuvieron los datos de la Tabla 4 y con ellos se trazó la curva de la Fig. 16.

Tabla 4. Datos de ABC obtenidos a partir de diferentes concentraciones de ácido benzoico

Ac. Benzoico mM	ABC mm ²
0.005	0.0138
0.015	0.0306
0.063	0.1615
0.125	0.3192
0.25	0.6844

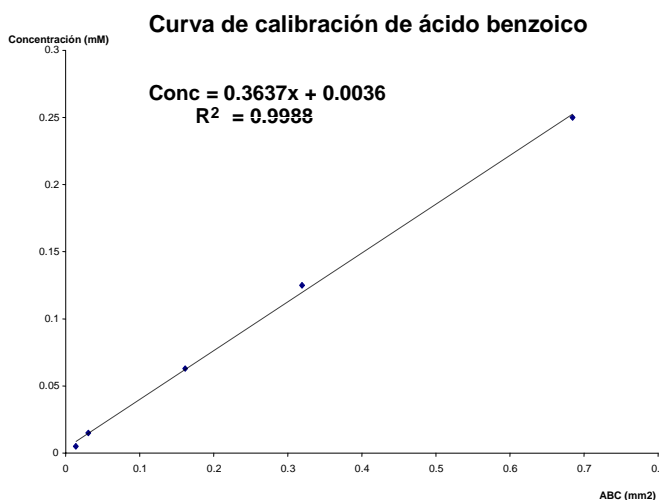


Fig. 16. Curva de calibración que relaciona el ABC y la concentración de ácido benzoico. La línea punteada es el ajuste en la regresión lineal.

Con la calibración anterior se calculan las concentraciones de ácido benzoico producido (Tabla 5).

Tabla 5. Transformación del ABC obtenida en los cromatogramas por HPLC a concentración de ácido benzoico.

Benzonitrilo mM	Acido Benzoico ABC (mm ²)	Acido Benzoico mM
0	0	0
0.2	0.44457157	0.163
0.25	0.472891614	0.1733
0.3	0.445121474	0.1632
0.4	0.529806654	0.194
0.5	0.580122849	0.2123
0.75	0.605418422	0.2215
1	0.60376871	0.2209
3	0.608442892	0.2226
5	0.634838273	0.2322

Al graficar concentración de ácido producido en función de la concentración de benzonitrilo en la mezcla de reacción obtenemos la curva de la Fig. 17.

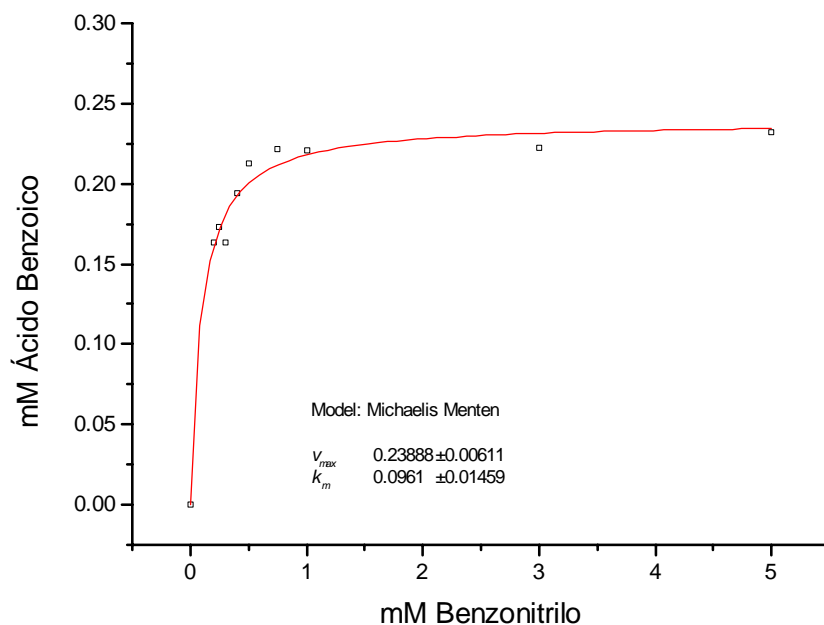


Fig. 17. Cinética de la nitrilasa de *Rhodococcus pyridinovorans* V51B obtenida mediante HPLC en fase reversa.

Los valores obtenidos para los parámetros cinéticos son: V_{max} 0.239 mM min^{-1} , K_m 96.1 μM . La concentración de la proteína en el extracto fue de 3.5 mg mL^{-1} . La actividad específica resultante es de 0.0683 mMol min^{-1} mg^{-1} .

C. Ensayos acoplados

1. Acoplamiento con Glucosamina 6 fosfato desaminasa de *Escherichia coli* (EcGNPD).

El acoplamiento con la EcGNPD vio dificultado porque se encontró una fuerte inhibición de la enzima acoplada (EcGNPD) por el sustrato de la nitrilasa; las primeras pruebas no mostraron actividad y al incrementar la concentración de la EcGNPD se pudo observar una actividad que se encontraba disminuida casi en un 50% a una concentración 1 milimolar (mM) de benzonitrilo, los resultados se presentan en la Fig. 18.

El análisis de los resultados por regresión no lineal (mediante programas de cálculo basados en el algoritmo de Marquardt) arroja como resultado los parámetros cinéticos (velocidad máxima aparente $v_{max\ app}$ y constante de Michaelis K_m) presentados en la Tabla 6.

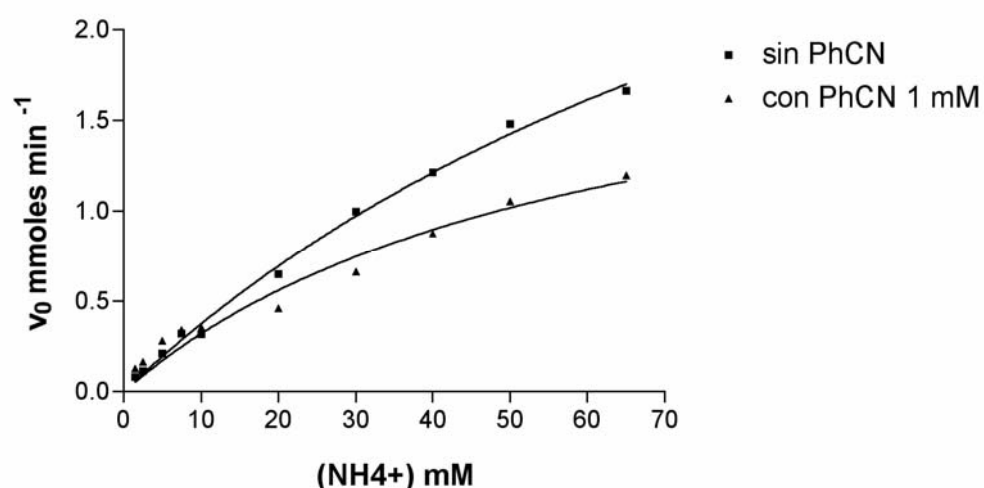


Fig. 18. Comportamiento de la GlcN6P desaminasa en ausencia (■) y presencia (▲) de

benzonitrilo a una concentración 1 mM. Se observa una disminución en la velocidad inicial (v_0) que hace inviable su utilización como enzima acoplante para medir la producción de amonio por la nitrilasa.

Tabla 6. Comparativo de los parámetros cinéticos calculados para la GlcN6P desaminasa de *E. coli*. Puede apreciarse que tanto la k_{cat} como la K_m disminuyen al 50% lo que indica que el benzonitrilo es un inhibidor de la desaminasa.

Parámetro	EcGNPD sin benzonitrilo	EcGNPD con benzonitrilo (1.0 mM)
k_{cat} (s^{-1})	155.1	72.68
K_m (mM)	115.4	59.04
r^2 (del ajuste)	0.9960	0.9600

Se puede apreciar que la k_{cat} y la K_m disminuyen ostensiblemente (cerca del 50%) en presencia de 1 mM de benzonitrilo. Al inhibirse de manera significativa la enzima acoplante, es preciso descartar la posibilidad de implementar un método de ensayo basado en esta enzima, sobre todo porque las expectativas de un comportamiento parecido al de las enzimas reportadas en la literatura, que de seguir el comportamiento de las enzimas reportadas la K_m fuese cercana a 15 mM de benzonitrilo. Del mismo modo no se exploraron concentraciones mayores a 70 mM de amonio ya que el nitrilo de mayor solubilidad en agua (valeronitrilo) tiene una solubilidad máxima de 80 mM. En esta experiencia el benzonitrilo resultó un excelente inhibidor para la EcGNPD.

2. Acoplamiento con L- Glutamato deshidrogenasa (L-GDH)_b.

La L-GDH_b es utilizada con mucha frecuencia para medir amonio, la facilidad en el seguimiento de la reacción al medir los cambios de absorbancia en tiempo real (Fig. 19), la hace una candidata natural para los propósitos de medición del producto de la nitrilasa.

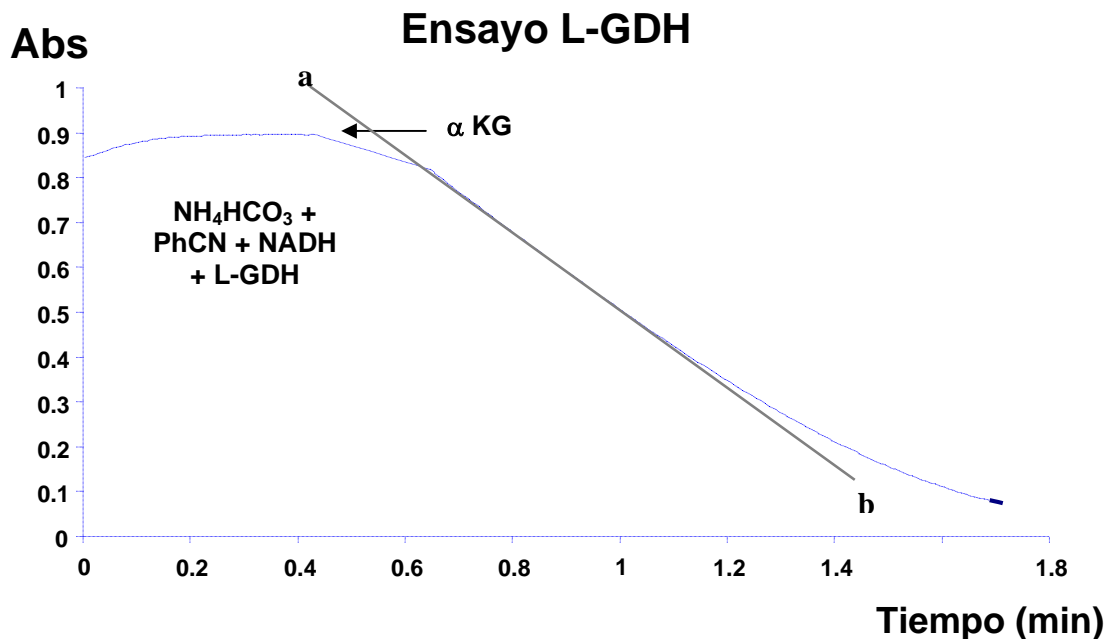


Fig. 19. Curva obtenida del ensayo espectrofotométrico de la L-GDH_b. La mezcla de reacción contiene inicialmente benzonitrilo, NADH, L-GDH. La reacción se inicia con la adición del α -KG (flecha), después de mezclar y reanudar la medición se obtienen medidas estables y uniformes. La pendiente de la recta a - b nos permite conocer el cambio de absorbancia por unidad de tiempo (Δ Abs) y ésta es una medida de la velocidad inicial (v_0) de la reacción.

Ante la fuerte inhibición presentada por la EcGNPD, se realizó la búsqueda de información en cuanto a la actividad de la enzima en presencia de nitrilos, la variante bovina no tenía estudios previos. Existe un reporte[72], en relación a la actividad de una L-GDH de *Pyrobaculum islandicum* en presencia de varios disolventes orgánicos, entre ellos el acetonitrilo. En este estudio se refiere una activación de la enzima cuando en el medio se encuentra el acetonitrilo. Ello, aunado a la experiencia con la EcGNPD nos dio la pauta a realizar ensayos para observar la posible activación o inhibición de la L-GDH_b en presencia del nitrilo de referencia usado en este trabajo, el benzonitrilo. Encontramos una activación moderada conforme las concentraciones de benzonitrilo se incrementaron (Tablas 7 Fig. 20).

Tabla 7. Velocidades iniciales v_0 ($\mu\text{M min}^{-1}$). Las letras NC señalan los puntos donde no se obtuvo concordancia en tres medidas consecutivas bajo las mismas condiciones.

NH_4^+	L-GDH sin PhCN	0,05mM PhCN	0,1mM PhCN	0,25mM PhCN	0,5mM PhCN	2,5mM PhCN	6mM PhCN	9mM PhCN
0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	7.779	6.650	11.313	10.111	5.726	7.882	7.354	6.078
5	31.727	26.096	25.714	28.442	26.272	32.138	22.048	23.823
10	39.573	42.081	45.776	42.784	44.808	45.747	40.511	36.669
15	46.245	48.342	53.959	50.425	44.295	53.768	44.999	49.442
20	46.612	48.929	49.193	54.018	50.615	52.082	50.615	54.106
25	NC	56.335	52.771	54.326	50.484	56.482	56.701	57.772
30	51.011	NC	51.921	48.870	57.919	58.285	60.133	55.206
35	43.664	50.352	52.771	54.091	57.523	58.505	52.727	56.335
40	46.289	45.395	50.146	54.355	52.126	56.027	57.860	56.481

Con los datos de la Tabla 7 se trazaron y ajustaron por regresión no lineal los gráficos para conocer el comportamiento enzimático de la L-GDH_b en presencia de benzonitrilo (Fig. 20).

Efecto del PhCN sobre la L-GDH_b

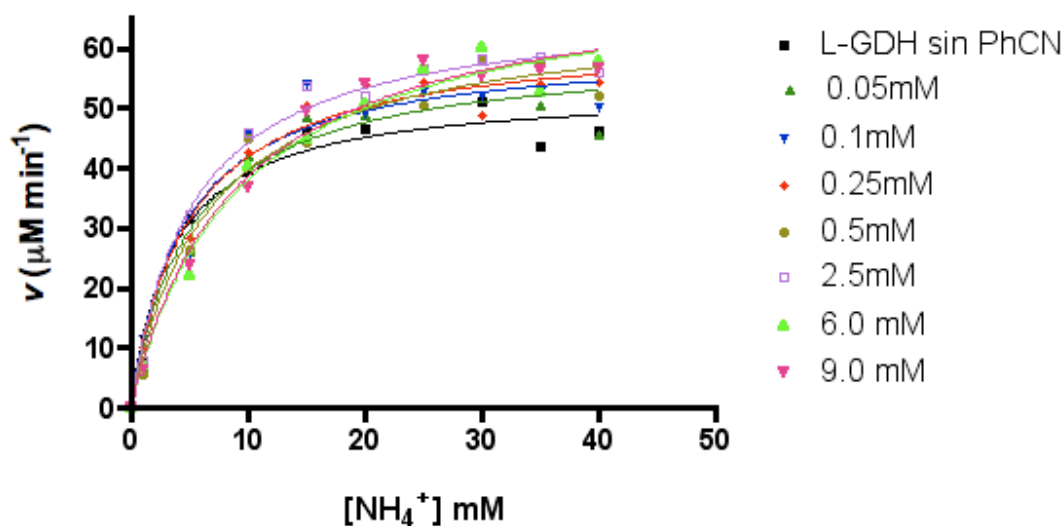


Fig. 20. El comportamiento de la L-GDH_b sigue el modelo de Michaelis-Menten en las condiciones del ensayo. Al incrementar la concentración de benzonitrilo se observa una ligera activación de la enzima como se muestra con los valores de v_0 y K_m .

Los resultados de V_{maxapp} y K_m correspondientes a cada concentración de benzonitrilo se resumen en la Tabla 8.

Tabla 8. Resumen de los valores de K_m y V_{app} para la L-GDH_b obtenidos en presencia de diferentes concentraciones de benzonitrilo.

Conc. benzonitrilo (mM)	V_{maxapp} ($\mu\text{M min}^{-1}$)	K_m [NH ₄] mM
0	53.31 \pm 2.57	3.59 \pm 0.87
0.005	59.71 \pm 4.72	5.03 \pm 1.67
0.1	60.53 \pm 3.53	4.41 \pm 1.22
0.25	62.52 \pm 2.68	4.89 \pm 0.94
0.5	66.34 \pm 3.67	6.65 \pm 1.41
2.5	67.09 \pm 2.18	5.11 \pm 0.73
6	73.10 \pm 4.44	9.15 \pm 1.81
9	72.90 \pm 4.03	8.78 \pm 1.62

En general se observó una tendencia moderada hacia la activación de la L-GDH cuando se encuentra en presencia de benzonitrilo, esto concuerda con el reporte de Chizu and Toshihisa, en el sentido de que los nitrilos tienen la capacidad de activar a la enzima de *Pyrobaculum islandicum*. La activación moderada que se presentó en las concentraciones de nitrilo ensayadas nos permitió pensar en utilizar la L-GDH como enzima acoplada para la determinación de la nitrilasa.

A continuación buscamos determinar los parámetros cinéticos de la nitrilasa de *R. pyridinovorans* V51B aprovechando el ensayo acoplado. Las concentraciones de benzonitrilo ensayadas fueron desde 0 hasta 6 mM. Los resultados se expresan en la Fig. 21.

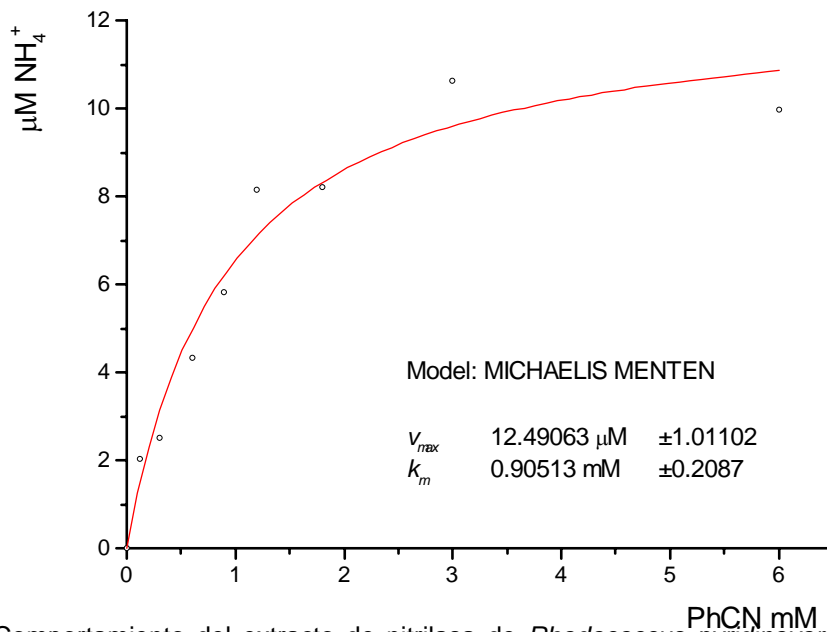


Fig. 21. Comportamiento del extracto de nitrilasa de *Rhodococcus pyridinovorans* V51B. Datos ajustados a la ecuación de Michaelis Menten.

Siguiendo con el ensayo acoplado se probó con valeronitrilo como sustrato, la gráfica obtenida se muestra en la Fig. 22.

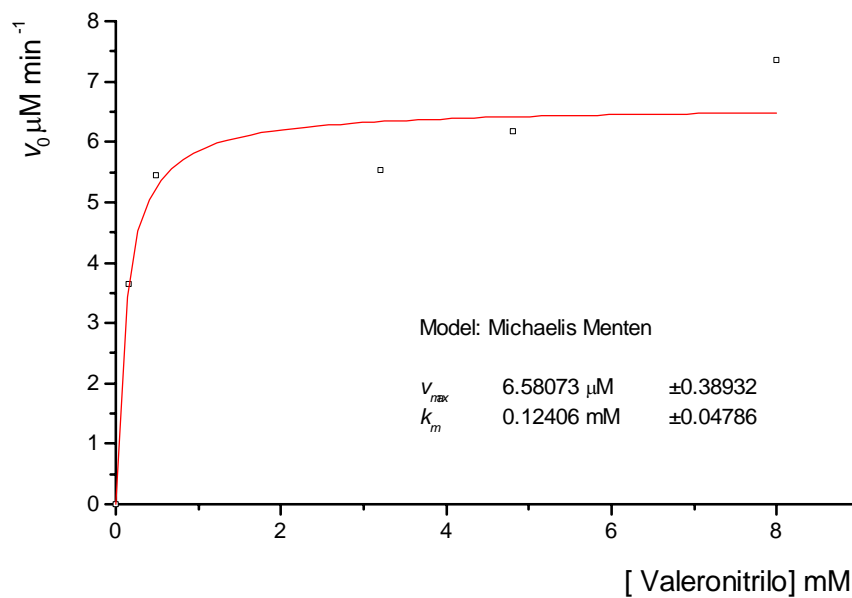


Fig. 22. Comportamiento de la nitrilasa de *Rhodococcus pyridinovorans* V51B utilizando el valeronitrilo como sustrato. El ajuste a Michaelis Menten no es tan bueno como en el caso del benzonitrilo. Una razón probable es la alta volatilidad del valeronitrilo en las condiciones del ensayo.

La Tabla 9 muestra los resultados comparados de ambos compuestos cuando participan como sustratos de la enzima, la concentración de proteína total en el extracto de *Rhodococcus pyridinovorans* V51B fue de 9.32 mg mL⁻¹.

Tabla 9. Comparación de las constantes cinéticas de la nitrilasa de *Rhodococcus pyridinovorans* V51B para cada uno de los sustratos ensayados como sustratos.

Sustrato	K_m (mM)	$V_{max\ app}$ ($\mu\text{Mol min}^{-1}$)	Act. específica ($\text{mMol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)
Benzonitrilo	0.905	12.491	1.340
Valeronitrilo	0.124	6.581	0.706

En esta etapa el trabajo con el ensayo acoplado ha tenido que suspenderse debido a la presencia (que no se había manifestado con anterioridad) de una proteína en el extracto que oxida el NADH aún en ausencia de otras sustancias en el medio y se comporta como una NADH oxidasa. Al existir esta interferencia no hemos proseguido con el proceso de purificación por no poder utilizar el ensayo acoplado para rastrear la proteína en las diferentes fracciones. En apariencia, un partícipe de esta interferencia es el pigmento de la bacteria, el cual en presencia de compuestos reductores presenta un cambio de color.

D. Ensayo potenciométrico (Δ pH)

El ensayo potenciométrico por Δ pH no se ha implementado completamente, durante este trabajo sólo se ha comprobado la posibilidad de llevarlo a cabo. El objeto de esta parte del trabajo es establecer la viabilidad de un método de medida en tiempo real basado en la liberación de iones H⁺ producidos por la reacción de la nitrilasa.

Lo primero que hicimos fue verificar si era posible detectar variaciones de pH durante la actividad de la enzima. Encontramos variaciones por arriba de 7 y

siempre en descenso, por lo que incrementando el pH de la mezcla de reacción por encima de 8 fue posible observar un Δ pH lineal y medible, como lo demuestra la Fig. 23.

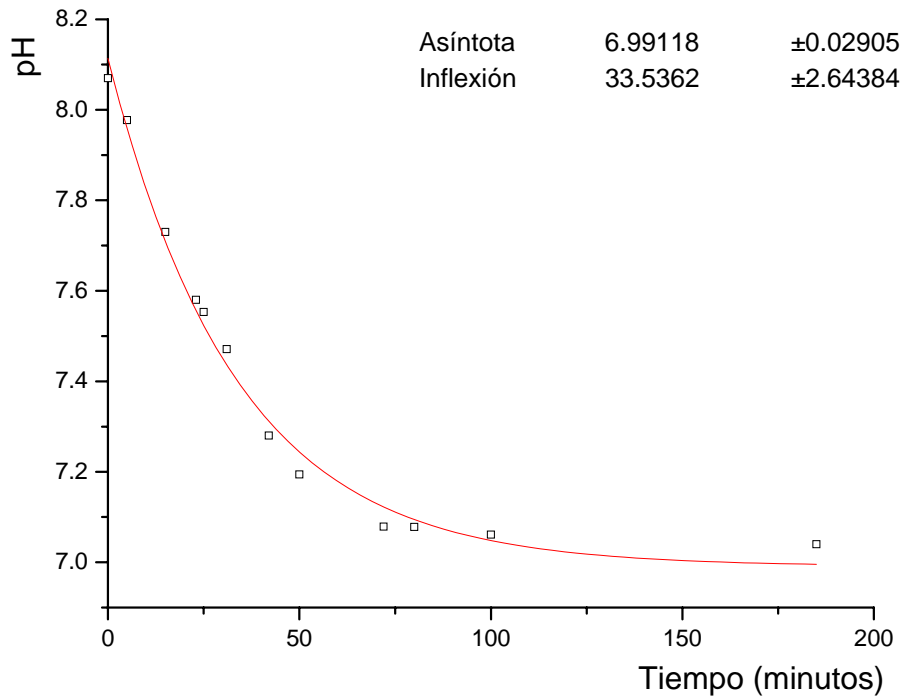


Fig. 23. Las variaciones de pH que se observan durante la actividad de la nitrilasa de *Rhodococcus pyridinovorans* V51B con benzonitrilo como sustrato. Ajustando por regresión no lineal a un modelo de decaimiento exponencial tenemos que la curva tiende a 7 y que la recta pierde linealidad a los 33 minutos (inflexión). La concentración de benzonitrilo en la mezcla de reacción es de 1 mM.

El siguiente paso consistió en verificar que la pendiente de la zona recta depende directamente de la concentración de sustrato a concentración constante de proteína. La Fig. 24 muestra resultados que permiten suponer que la dependencia mencionada existe y que este puede ser un método que permita la medición de la actividad de la enzima.

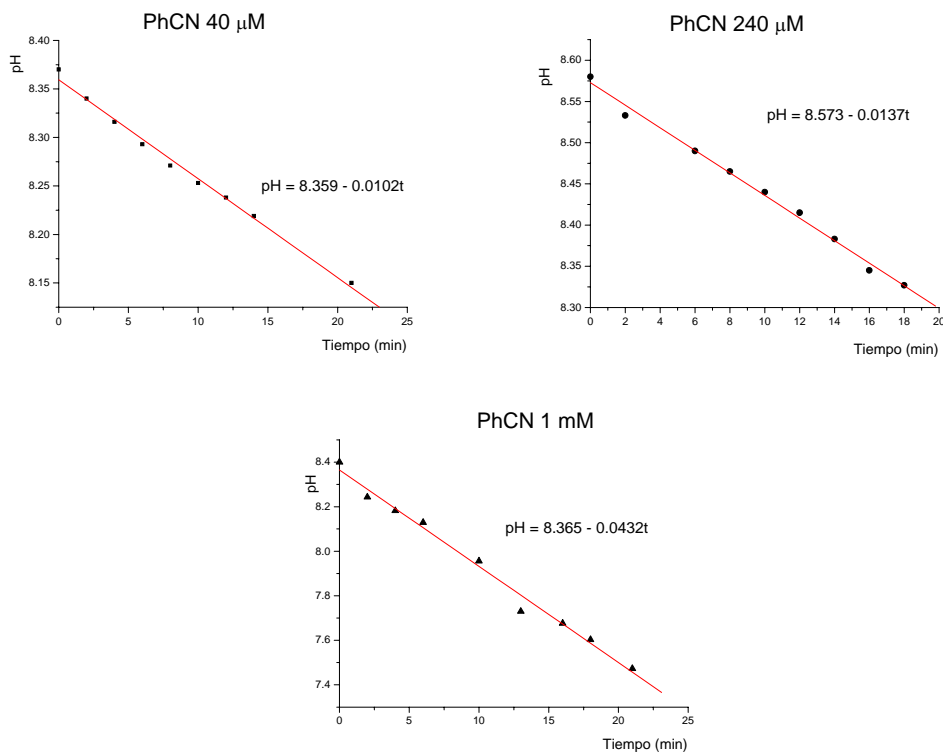


Fig. 24. Realizando el análisis a los datos preliminares de los ensayos potenciométricos se observa un incremento en la pendiente de la zona recta de la curva conforme se incrementa la concentración del sustrato. El contar con un equipo autotitulado en escala micro permitirá afinar el método y obtener resultados aún más confiables.

IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

De las dos condiciones de cultivo evaluadas se prefirió cultivar a *Rhodococcus pyridinovorans* V51B en el medio TN m debido a que la caprolactama resulta más económica que los nitrilos, menos tóxica y no es volátil; además de presentarse un menor riesgo de contaminación al no existir la necesidad de adicionar en varias ocasiones el inductor. *Rhodococcus pyridinovorans* V51B es un microorganismo de crecimiento lento, la fase de crecimiento exponencial se presenta después de 20 horas de iniciado el cultivo y la estacionaria después de 50 horas. La enzima nitrilasa aparece en pequeñas cantidades pasadas las 24 horas y su cantidad relativa se incrementa conforme pasa el tiempo. Tomando en cuenta estos resultados, el cultivo se ha optimizado permitiendo su desarrollo durante 60 horas y cosechando la biomasa al término de este tiempo. Las fracciones colectadas después de pasar el extracto a través de una columna de filtración molecular nos han permitido encontrar la actividad en zonas de diferente peso molecular. Ante esto suponemos que tenemos dos estados de agregación, presumiblemente un dímero y un agregado de 10 o 12 unidades.

Las técnicas que se ensayaron para determinar la actividad de la proteína en el ensayo y las fracciones parcialmente purificadas permitieron demostrar la acción de la enzima. El método por HPLC en fase reversa demostró su utilidad aunque sólo para sustratos que presentan grupos cromóforos a una longitud de onda de 220 a 300 nm. Las diferencias entre los resultados obtenidos por HPLC y el método de ensayo acoplado son debidas fundamentalmente a la concentración de proteína en el extracto y la posible pérdida de actividad debida a la diálisis prolongada (en el caso del ensayo acoplado).

El ensayo acoplado con la EcGNPD de *Escherichia coli* resultó un fracaso al ser esta enzima inhibida por benzonitrilo aún a bajas concentraciones. En la búsqueda de nuevas perspectivas probamos la L-GDH_b, la cual nos abrió las

puertas para probar un método original para el ensayo de este tipo de enzimas. Gracias a este ensayo conseguimos evaluar de manera parcial la actividad en presencia de valeronitrilo, que ha resultado hasta el momento en una mayor afinidad (K_m más baja) por éste que por el benzonitrilo; aunque las transformaciones alcanzan mayores actividades específicas (k_{cat}) para el segundo, las dificultades para medir de manera confiable la actividad de la enzima en presencia de valeronitrilo se deben fundamentalmente a la alta volatilidad de este compuesto a la temperatura de ensayo. Hasta el momento de escribir este trabajo no ha resultado posible validar el método debido a la aparición en el extracto proteico, de un artefacto que interfiere con el ensayo al oxidar el NADH en ausencia de los demás partícipes de la reacción. Un resultado interesante en este respecto es que al no agregar hierro en la composición del medio de cultivo este efecto disminuye, lo cual parece indicar que el hierro podría estar presente en la especie que nos ha interferido con este ensayo.

Otra opción no explorada hasta el momento por otros laboratorios es la de seguir la reacción a través de cambios de pH. A este respecto, hemos demostrado la posibilidad de monitorear la actividad con la condición de que el pH inicial de la mezcla de reacción sea superior a 8, y ha quedado demostrado en los ensayos que la tendencia del pH es a estabilizarse en un valor muy cercano a 7. La adquisición de un micro autotitulado nos permitirá realizar mediciones más precisas, seguir la actividad de la enzima en los diferentes pasos de la purificación e incluso comparar los resultados con los que pueda arrojar el método acoplado una vez que tengamos la proteína pura. Ambos métodos (el acoplado y el potenciométrico) son el aporte novedoso de este trabajo de tesis.

X. CONCLUSIONES

De los tres inductores probados durante el desarrollo de este trabajo, la caprolactama fue elegida como el inductor, debido a su baja volatilidad, menor toxicidad y menor costo.

Existen por lo menos dos estados de agregación de la nitrilasa de *Rhodococcus pyridinovorans* V51B determinados mediante filtración molecular. La formación de agregados puede deberse al incremento de la temperatura.

De las opciones exploradas para el monitoreo continuo de la transformación de nitrilos por la nitrilasa de *Rhodococcus pyridinovorans* V51B, quedó descartado el acoplamiento con la glucosamina 6-fosfato desaminasa de *Escherichia coli* debido a la disminución de su actividad en presencia de benzonitrilo.

En el caso de la glutamato deshidrogenasa bovina, ésta se presenta como una excelente opción para medir la actividad de la enzima estudiada en agua, sin embargo, es susceptible de interferencias por parte de sustancias presentes en el extracto con capacidad de ser reducidas por el NADH o de participar en la oxidación de este último por el oxígeno del medio.

Los resultados obtenidos hasta ahora indican que la nitrilasa de *Rhodococcus pyridinovorans* V51B tiene una mayor afinidad por el valeronitrilo que por el benzonitrilo.

En ensayos potenciométricos preliminares se ha demostrado que en presencia de la nitrilasa de *Rhodococcus pyridinovorans* V51B, la velocidad de cambio de pH es directamente proporcional a la concentración de nitrilo presente en la mezcla de reacción.

XI. PERSPECTIVAS

La purificación total de la nitrilasa de *R. pyridinovorans* V51B nos permitirá evaluar la viabilidad de su liofilización y ensayo en disolventes no acuosos. Esto tomando en cuenta que los nitrilos precursores de moléculas de interés comercial (precursores de fármacos) son muy poco solubles en agua.

La búsqueda de otros nitrilos que actúen como sustratos, poniendo especial énfasis en aquellos que tienen interés en la industria.

La clonación del gen de la nitrilasa de *R. pyridinovorans* V51B y la sobre expresión del mismo y posible mutación sitio-específica de la proteína, con el fin de modificar la afinidad que la enzima pudiera tener por nitrilos de interés industrial.

XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Banerjee, S.R.B.U.a.A., *The nitrile-degrading enzymes: current status and future prospects*. Appl Microbiol Biotechnol, 2002. **60**: p. 33-44.
2. Regla, J.I., *Estudio tendiente a la preparación químico-enzimática de la D-homofenilalanina*. 2005, UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA.
3. Goodfellow M, A.G., *The actinomycete-genus Rhodococcus: a home for the 'rhodochrous' complex*. J. Gen. Microbiol., 1977. **100**: p. 99-122.
4. Warhurst AM, F.C., *Biotransformations catalyzed by the genus Rhodococcus*. Crit. Rev. Biotechnol, 1994. **14**: p. 29-73.
5. Bell KS, P.J., Aw DWJ, Christofi N *The genus Rhodococcus*. J. Appl. Microbiol, 1998. **85**: p. 195-210.
6. Finnerty, W., *The biology and genetics of the genus Rhodococcus*. Annu. Rev. Microbiol., 1992. **46**: p. 193-218.
7. Pucci OH, B.M., Peressutti SR, Klein L, Härtig L, Alvarez HM, Wünsche L., *Influence of crude oil contamination on the bacterial community of semiarid soils of Patagonia (Argentina)*. Acta Biotechnol, 2000. **20**(2): p. 129-146.
8. Whyte LG, H.J., Zhou E, Bourbonniere L, Inniss WE, Greer CW., *Biodegradation of variable-chain-length alkanes at low temperatures by a psychrotrophic Rhodococcus sp.* Appl. Environ. Microbiol., 1998. **64**: p. 2578 - 2584.
9. Yang P, V.L., Vancanneyt M, Swings J, Kersters K., *Application of fatty acid methyl esters for the taxonomic analysis of the genus Xanthomonas*. Syst. Appl. Microbiol., 1993. **16**: p. 47-71.
10. Thimann K, M.S., *Nitrilase II, its substrate specificity and possible mode of action*. Arch Biochem Biophys, 1964. **107**: p. 62-68.
11. Harper, D., *Fungal degradation of aromatic nitriles: enzymology of C-N cleavage by Fusarium solani*. Biochem J., 1977a. **167**: p. 685-692.
12. Bestwick L, G.L., James D, Bones A, Rossiter J *Purification and characterization of a nitrilase from Brassica napus*. Physiol Plant, 1993. **89**: p. 611-618.
13. Bartel, B. and G.R. Fink, *Differential regulation of an auxin-producing nitrilase gene family in Arabidopsis thaliana*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(14): p. 6649-53.
14. Piotrowski M, S.S., Weiler WE., *The Arabidopsis thaliana isogene NIT4 and its orthologs in tobacco encode β -cyano-L-alanine hydratase/nitrilase*. J Biol Chem, 2001. **276**: p. 2616-2621.
15. Kato, Y., et al., *Novel heme-containing lyase, phenylacetaldoxime dehydratase from Bacillus sp. strain OxB-1: purification, characterization, and molecular cloning of the gene*. Biochemistry, 2000. **39**(4): p. 800-9.
16. Dorr P, K.C., *Cyanide oxygenase and cyanase activities of Pseudomonas fluorescens NCIMB 11764*. FEMS Microbiol Lett, 1989. **60**: p. 289-294.
17. Wang P, M.D., Van Etten H., *Purification and characterization of cyanide hydratase from phytopathogenic fungus Gloeocercospora sorghi*. Arch Biochem Biophys, 1992. **298**: p. 569-575.

18. Ingovorsen K, H.-P.B., Godtfredsen S, *Novel cyanide hydrolyzing enzyme from Alcaligenes xyloxidans subsp. denitrificans*. Appl Environ Microbiol, 1991. **57**: p. 1783-1789.
19. Johnson, D.V., A.A. Zabelinskaja-Mackova, and H. Griengl, *Oxynitrilases for asymmetric C-C bond formation*. Curr Opin Chem Biol, 2000. **4**(1): p. 103-9.
20. Kuwahara M, Y.H., *Liberation of hydrogen cyanide from diaminomalenonitrile by Trichoderma sp. MB 519*. Agric Biol Chem, 1985. **49**: p. 125-131.
21. Liu, J.K., C.H. Liu, and C.S. Lin, *The role of nitrogenase in a cyanide-degrading Klebsiella oxytoca strain*. Proc Natl Sci Counc Repub China B, 1997. **21**(2): p. 37-42.
22. Helen, B.C.a.P., *The nitrilase superfamily: classification, structure and function* Genome Biology, 2001. **2**(1): p. Review 0001.1 – 0001.9.
23. Pekarsky Y, C.M., Saprashvili Z, Druck T, Sedkov Y, Tillib S, Draganescu A, Wermuth P, Rothman JH, Huebner K, Buchberg AM, Mazo A, Brenner C, Croce CM. , *Nitrilase and Fhit homologs are encoded as fusion proteins in Drosophila melanogaster and Caenorhabditis elegans* Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1998. **95**: p. 8744-8749.
24. Huang, W., et al., *Crystal structure of nitrile hydratase reveals a novel iron centre in a novel fold*. Structure, 1997. **5**(5): p. 691-9.
25. Brenner, C., *Catalysis in the nitrilase superfamily*. Current Opinion in Structural Biology, 2002. **12**: p. 775-782.
26. Robertson DE, C.J., DeSantis G, Podar M, Madden M, Chi E, Richardson T, Milan A, Miller M, Weiner DP, Wong K, McQuaid J, Farwell B, Preston LA, Tan X, Snead MA, Keller M, Mathur E, Kretz PL, Burk MJ, Short JM. , *Exploring nitrilase sequence space for enantioselective catalysis*. Appl Environ Microbiol, 2004. **70**(4): p. 2429-2436.
27. Podar M, E.J., Richardson TH., *Evolution of a microbial nitrilase gene family: a comparative and environmental genomics study*. BMC Evol Biol, 2005. **5**: p. 42-47.
28. O'Reilly, C.P.T., *The nitrilase family of CN hydrolyzing enzymes: a comparative study*. J. Appl. Microbiol., 2003. **95**: p. 1161-1174.
29. Mylerová, M.L.a.V., *Synthetic applications of nitrile-converting enzymes*. Current Organic Chemistry, 2003. **7**: p. 1-17.
30. Collins P, K.C., *The utilization of nitriles and amides by Nocardia rhodochrous*. J Gen Microbiol 1983. **129**: p. 248–254.
31. Goldhust A, B.Z., *Induction, purification and characterization of the nitrilase of Fusarium oxysporum*. Biotechnol Appl Biochem, 1989. **11**: p. 581-601.
32. Nagasawa T, K.M., Yamada H, *Optimum culture conditions for the production of benzonitrilase by Rhodococcus rhodochrous J1*. Arch Microbiol, 1988. **150**: p. 89-94.
33. Nagasawa T, W.M., Nakamura T, Iwahara H, Yoshida T, Gekko K, *Nitrilase of Rhodococcus rhodochrous J1, conversion into the active form by subunit association*. Eur J Biochem, 2000. **267**: p. 138-144.
34. Harper, D., *Microbial metabolism of aromatic nitriles: enzymology of C-N cleavage by Nocardia sp. NCIB 11216*. J Biochem., 1977b. **165**: p. 309-319.

35. Stevenson, D.E., et al., *Mechanistic and structural studies on Rhodococcus ATCC 39484 nitrilase*. Biotechnol Appl Biochem, 1992. **15**(3): p. 283-302.
36. Kobayashi, M., M. Goda, and S. Shimizu, *The catalytic mechanism of amidase also involves nitrile hydrolysis*. FEBS Lett, 1998. **439**(3): p. 325-8.
37. Kobayashi, S.S.a.M., *Nitrile hydrolases*. Current opinion in chemical Biology, 2000. **4**: p. 95-102.
38. Kobayashi, M., T. Nagasawa, and H. Yamada, *Nitrilase of Rhodococcus rhodochrous J1. Purification and characterization*. Eur J Biochem, 1989. **182**(2): p. 349-56.
39. Kobayashi, M., et al., *Purification and characterization of a novel nitrilase of Rhodococcus rhodochrous K22 that acts on aliphatic nitriles*. J Bacteriol, 1990. **172**(9): p. 4807-15.
40. Layh, N., Parratt, J. & Willets, A., *Characterization and partial purification of an enantioselective arylacetone nitrilase from Pseudomonas fluorescens DSM 7155*. J Mol Catal B Enzym, 1998: p. 417-424.
41. Harper, D., *Characterization of a nitrilase from Nocardia sp. (Rhodococcus group) NCIB 11215, using p-hydroxybenzoxynitrile as sole carbon source* Int J Biochem, 1985. **17**: p. 677-683.
42. Bhalla, T.C., Miura, A., Wakamoto, A., Ohba, Y. & Furuhashi, K. , *Asymmetric hydrolysis of α -aminonitriles to optically active amino acids by a nitrilase of Rhodococcus rhodochrous PA-34*. Appl Microbiol Biotechnol, 1992. **37**(184–190).
43. Stevenson DE, F.R., Dumas F, Groleau D, Mihoc A, Storer AC., *Mechanistic and structural studies on Rhodococcus ATCC 39484 nitrilase*. Biotechnol. Appl. Biochem., 1992. **15**: p. 283-302.
44. Hoyle, A., Bunch, A.W. and Knowles, C.J., *The nitrilases of Rhodococcus rhodochrous NCIMB 11216*. Enzyme and Microbial Technology, 1998. **23**: p. 475-482.
45. Bandopadhyay A, N.T., Asano Y, Fujishiro K, Tani Y, Yamada H *Purification and characterization of benzonitrilase from Arthrobacter sp. J1*. Appl Environ Microbiol 1986. **51**(302-306).
46. Nagasawa, Y.H.a.T., *Microbial production of commodity chemicals*. Pure & Appl. Chem, 1995. **67**(7): p. 1241-1256.
47. Yamamoto K, K.K., *Purification and characterization of nitrilase responsible for the hydrolysis from Acinetobacter sp. AK 226*. Agric Biol Chem, 1991. **55**: p. 1459-1466.
48. Yamamoto K, F.I., Komatsu K., *Purification and characterization of the nitrilase from Alcaligenes faecalis ATCC 8750 responsible for enantioselective hydrolysis of mandelonitrile*. J Ferment Bioeng, 1992a. **73**: p. 425-430.
49. Levy-Schil, S., et al., *Aliphatic nitrilase from a soil-isolated Comamonas testosteroni sp.: gene cloning and overexpression, purification and primary structure*. Gene, 1995. **161**(1): p. 15-20.
50. Almatawah, Q.A., R. Cramp, and D.A. Cowan, *Characterization of an inducible nitrilase from a thermophilic bacillus*. Extremophiles, 1999. **3**(4): p. 283-91.

51. Stalker D, M.L., McBride K., *Purification and properties of a nitrilase specific for the herbicide bromoxynil and corresponding nucleotide sequence analysis of the bxn gene.* J Biol Chem, 1988a. **263**: p. 6310-6314.
52. Rezende R, D.J., Ferraz V, Linardi V., *Metabolism of benzonitrile by Cryptococcus sp. UFMG- Y28.* J Basic Microbiol, 2000. **40**: p. 389-392.
53. Watanabe. 1993: US Pat.
54. Mascharak, P.K., *Structural and functional models of nitrile hydratase.* Coordination Chemistry Reviews, 2002. **225**: p. 201-214.
55. Nagamune, T., et al., *Purification of inactivated photoresponsive nitrile hydratase.* Biochem Biophys Res Commun, 1990. **168**(2): p. 437-42.
56. Yamada. 1987: US Pat.
57. Faber, K., *Biotransformations in organic chemistry.*, ed. Springer. Vol. 113 – 134. 1992, New York: Berlin Heidelberg
58. Wieser M, N.T., *Stereoselective nitrile-converting enzymes.* Stereoselective biocatalysis, ed. P. RN. 2000, New York. 461–486.
59. Martínková L, K.V., *Nitrile- and amide-converting microbial enzymes: stereo-, regio- and chemoselectivity.* Biocat Biotrans, 2002. **20**: p. 73-93.
60. Klempier N, d.R.A., Faber K, Griengl H, *Selective transformation of nitriles into amides and carboxylic acids by an immobilized nitrilase.* Tetrahedron Lett, 1991. **32**: p. 341-344.
61. Sugai T, Y.T., Yokoyama M, Ohta H., *Biocatalysis in organic synthesis: the use of nitrile- and amide-hydrolyzing microorganisms.* Biosci Biotech Biochem, 1997. **61**: p. 1419-1427.
62. Payne MS, W.S., Fallon RD, Tudor G, Stieglitz B, Turner IM and Nelson MJ, *A stereoselective cobalt-containing nitrile hydratase.* Biochemistry, 1997. **36**: p. 5447-5454.
63. Prepechalová I, M.L., Stolz A, Ovesna M, Bezouska K, Kopecky J, Krěn V., *Purification and characterization of the enantioselective nitrile hydratase from Rhodococcus equi A4.* Appl Microbiol Biotechnol, 2001. **55**: p. 150-156.
64. Martínková L, S.A., Knackmuss HJ, *Enantioselectivity of the nitrile-hydratase from Rhodococcus equi A4 towards substituted (R,S)-2-arylpropionitriles.* Biotechnol Lett, 1996. **18**: p. 1073-1076.
65. Blakey A, C.J., Williams E, O'Reilly C *Regio- and stereo-specific nitrile hydratase from Rhodococcus AJ270.* FEMS Microbiol Lett 1995. **129**: p. 47-62.
66. Colby J, S.D., Black GW *Immobilization of Rhodococcus AJ270 and use of entrapped biocatalyst for the production of acrylic acid.* Chemical Monthly (Monatshefte für Chemie) 2000. **131**: p. 655-666.
67. Effenberger F, O.S., *(E)-Selective hydrolysis of (E, Z)- α,β -unsaturated nitriles by the recombinant nitrilase AtNIT1 from Arabidopsis thaliana.* Tetrahedron Asym, 2001. **12**: p. 2581-2587.
68. Taylor SK, C.N., Simons LJ, Vyvyan JR., *Conversion of hydroxy nitriles to lactones using Rhodococcus rhodochrous whole cells.* J Org Chem, 1996. **61**: p. 9084-9085.

69. Gavagan JE, F.S., Fallon RD, Folsom PW, Herkes FE, Eisenberg A, Hann EC, DiCosimo R, *Chemoenzymatic production of lactams from aliphatic α,ω -dinitriles*. . J Org Chem 63, 1998. **63**: p. 4792-4801.
70. Dadd, M.R., et al., *Real-time monitoring of nitrile biotransformations by mid-infrared spectroscopy*. J Microbiol Methods, 2000. **41**(1): p. 69-75.
71. Banerjee, A., R. Sharma, and U.C. Banerjee, *A rapid and sensitive fluorometric assay method for the determination of nitrilase activity*. Biotechnol Appl Biochem, 2003. **37**(Pt 3): p. 289-93.
72. Ohshima, C.K.a.T., *Enzymological characteristics of the hyperthermostable NADdependent glutamate dehydrogenase from the archaeon Pyrobaculum islandicum and effects of denaturants and organic solvents*. Applied and Environmental Microbiology, 1998: p. 2152–2157.

ABREVIATURAS

α -KG	Alfa-cetoglutarato.
EcGNPD	Glucosamina 6 fosfato desaminasa de <i>Escherichia coli</i> .
EC X.X.X.X	Número de clasificación enzimática, asignado de acuerdo a las reglas de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB por sus siglas en inglés).
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución.
k_{cat}	Constante catalítica.
K_m	Constante de Michaelis.
K_{is}	Constante de inhibición del sustrato.
LBm	Medio de cultivo Luria Bernatni modificado.
L-GDH	Glutamato deshidrogenasa.
L-GDH _b	Glutamato deshidrogenasa bovina.
MMS	Medio de cultivo mínimo salino.
TNm	Medio de cultivo Toru Nagasawa Modificado.
Tris	Trietanolamina.
PhCN	Benzonitrilo.
UV	Ultravioleta.
V_{maxapp}	Velocidad máxima aparente.