



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**Caracterización de la actividad  
enzimática de la nitrilasa inmovilizada  
de *Rhodococcus sp* V51B**

**T E S I S**

para obtener el título de  
**Químico Farmacéutico Biólogo**

**P R E S E N T A**

**Daniel Romero Martínez**

**Directora de tesis**

Dra. Georgina Garza-Ramos Martínez

**Asesor de tesis**

Dr. Manuel López Ortiz



**Ciudad de México, 2018**



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.



*“La vida no es fácil, para ninguno de nosotros. Pero... ¡qué importa!  
Hay que perseverar y, sobre todo, tener confianza en uno mismo.  
Hay que sentirse dotado para realizar alguna cosa y esa cosa hay  
que alcanzarla, cueste lo que cueste”*

**Marie Curie**



Jurado asignado



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

DIRECCIÓN

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR PRESENTE.

Comunico a usted que el alumno ROMERO MARTÍNEZ DANIEL con número de cuenta 31030360-6 de la carrera de Q. F. B. se le ha fijado el día 26 del mes de Noviembre de 2018 a las 15:00 hrs., para presentar examen profesional, que tendrá lugar en la sala de exámenes profesionales Campus II de esta Facultad, con el siguiente jurado:

- PRESIDENTE MTRA. DORA ALICIA PÉREZ GONZÁLEZ
VOCAL\* DRA. GEORGINA GARZA-RAMOS MARTÍNEZ
SECRETARIO DR. MANUEL LÓPEZ ORTIZ
SUPLENTE DRA. MA. ISABEL SOTO CRUZ
SUPLENTE DR. RODRIGO GONZÁLEZ OLVERA

Handwritten signatures of the jury members corresponding to the list above.

El título de la tesis que se presenta es: Caracterización de la actividad enzimática de la nitrilasa inmovilizada de Rhodococcus sp V51B

Opción de titulación: Tesis Experimental

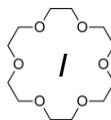
ATENTAMENTE "POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU" Ciudad de México, a 24 de Octubre de 2018.

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ DIRECTOR

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA DIRECCION

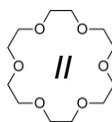
REC.BÍ: OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES Y DE GRADO

Vo.Bo. DRA. RAQUEL ELIZABETH UGALDE JEFA DE LA CARRERA DE Q.F.B.



*Reconocimientos institucionales*

Durante el desarrollo de este proyecto de investigación se contó con la beca de ayudante de investigador nacional nivel III del CONACyT con expedientes de ayudante y de investigador: 15943 / 2833.



*Reconocimientos académicos*

El diseño y desarrollo experimental de este proyecto se condujo siempre bajo el asesoramiento de la Dra. Georgina Garza-Ramos Martínez en el Laboratorio de Fisicoquímica e Ingeniería de Proteínas de la Facultad de Medicina, UNAM.

A su vez, se contó con el apoyo de las técnicas académicas: M. en C. Laura Ileana Álvarez y Dra. Ma. Isabel Velázquez.

Algunos de los reactivos, así como el soporte técnico para el desarrollo de las metodologías cromatográficas analíticas, fueron provistos por el Dr. Manuel López Ortiz y el Dr. José Ignacio Regla Contreras, del Laboratorio de Síntesis de Fármacos de la FES Zaragoza, UNAM.

Finalmente, se agradecen todos los comentarios y sugerencias hechos del trabajo escrito por parte del jurado asignado.



*Agradecimientos personales*

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, mi *alma mater*, por ser un elemento esencial en mi formación profesional desde hace más de 9 años.

A la **Facultad de Estudios Superiores Zaragoza**, que junto con la comunidad que la integra, me han brindado la mejor formación en el área científica, así como amistades y experiencias invaluableles. Simplemente orgullo Zaragozano.

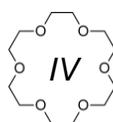
A mis padres, **Lucía e Isidro**, quienes han sido una piedra angular en todo momento de mi vida. Sin ustedes y sus enseñanzas constantes, que los convierten en excelentes seres humanos, nada de esto habría sido posible.

**Jimena y Erick**, del mismo modo, sin su presencia y las diferencias que tanto nos marcan, pero que a la vez mejoran nuestro vínculo, la vida sería de insufriblemente gris. Gracias por su alegría y su comprensión.

**Dra. Geo**, no siento más que profundo agradecimiento por la confianza que me brindó desde mi llegada y durante el desarrollo de los proyectos que nos propusimos durante este tiempo. Del mismo modo, agradezco el apoyo brindado más allá de lo académico para hacer de mi estancia en el LFQIP un periodo dichoso.

**Manu**, sin duda alguna fuiste la primera persona que me orientó y encaminó por el bello sendero de la ciencia. Gracias por tu asesoramiento, tanto en mi estadía en el L-9, como cuando tuve que emigrar, pero sobre todo gracias por tu amistad. El mejor profesor e investigador que tiene la FES Zaragoza, de eso no hay duda.

**Arturo y Jonathan**, vaya que han pasado los años, tan sólo mírennos, 9 años después y aquí seguimos. Agradezco siempre que seamos tan diferentes, pues eso pone a flote charlas increíbles cada que nos frecuentamos, las cuales me han nutrido intelectual y moralmente en gran medida.



## ***Agradecimientos personales***

**Maat, David, Jesús, Julio, Luis, Jorge, Omar y Karina.** Mejor compañía no pude haber tenido durante el último año de la carrera. Esas discusiones, a veces de ciencia, a veces de planes a futuro, a veces simplemente de temas banales, todas ellas siempre tan intensas, pero mostrando la calidez de la comunidad que hemos formado. Salud por nuestra amistad, hermanos.

**Team nitrilasa (Hugo L, Karla, Sergio y Héctor).** La estancia en el LFQIP habría sido bastante más complicada de no ser por su asesoramiento. Gracias por esa disposición que siempre mostraron. Huguito y Karla, nos espera un futuro próspero y desafiante. ¡A darle!

**Comunidad LFQIP (Doctores, Ashanty, Ale, Esaú, Hugo S, Renán, Dana, Banda, Jorge, Sergio R, ...).** Sin duda alguna una comunidad que demuestra que la ciencia que se hace en la UNAM es de gran nivel. Gracias por la colaboración constante, así como por los buenos momentos vividos en dicho espacio científico.

**Comunidad FES Zaragoza y L-9 (Karen C, Karen H, Lupita, Itze, Ivonne, Otoniel, ...).** Ésta, siendo la última parte, fue la más complicada de todas, ya que son tantos que me es muy complicado recordarlos en este instante a todos. No me queda más que agradecer su pequeña o gran contribución en todo momento de nuestras relaciones. Espero sea recíproco en alguna medida.

***Gracias... ¡totales!***



## Índice general

<b>Jurado asignado</b> .....	I
<b>Reconocimientos institucionales</b> .....	II
<b>Reconocimientos académicos</b> .....	III
<b>Agradecimientos personales</b> .....	IV
<b>Índice general</b> .....	1
<b>Índice de figuras y cuadros</b> .....	3
<b>Lista de abreviaturas</b> .....	6
<b>Resumen</b> .....	9
<b>Introducción</b> .....	11
<b>Marco teórico</b> .....	13
Biotecnología moderna .....	13
Química verde.....	14
Proteínas, enzimas y biocatálisis .....	15
Propiedades verdes de las enzimas .....	16
Superfamilia nitrilasa.....	17
Nitrilasas y nitrilos .....	18
Estructura y oligomerización .....	20
Mecanismo de reacción .....	23
Obtención de productos de interés industrial a partir de nitrilasas .....	26
Inmovilización de enzimas .....	28
Adsorción y deposición no covalente.....	31
Inmovilización vía interacciones iónicas .....	31
Fijación covalente .....	32
Atrapamiento en geles poliméricos o cápsulas .....	34
Entrecruzamiento.....	34
Agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs).....	35
Ventajas de los CLEAs .....	37
Aplicaciones de los CLEAs .....	37
Dextrano .....	40



Modificación química de dextrano por oxidación. Obtención de dextranpolialdehído (DPA).....	41
Dextranpolialdehído como agente entrecruzante .....	42
<b>Antecedentes</b> .....	43
<b>Planteamiento del problema</b> .....	45
<b>Objetivos</b> .....	46
<b>Hipótesis</b> .....	47
<b>Materiales</b> .....	48
<b>Esquema general de trabajo</b> .....	52
<b>Métodos</b> .....	53
<b>Resultados y discusión</b> .....	66
<b>Conclusiones</b> .....	103
<b>Perspectivas</b> .....	104
<b>Referencias</b> .....	105
<b>Apéndice A</b> .....	111
<b>Apéndice B</b> .....	114
<b>Apéndice C</b> .....	116

## Índice de figuras y cuadros

Figura	Cuadro	Título	Página
1		Alineamiento de secuencias de las trece ramas que forman la superfamilia nitrilasa.	17
	1	Superfamilia nitrilasa.	18
2		Reacción típica de las nitrilasas.	18
3		Ejemplos de grupos funcionales que se pueden obtener a partir de un nitrilo.	19
4		Estructuras cristalográficas de las nitrilasas de <i>Synechocystis sp.</i> PCC6803 y de <i>Pyrococcus abyssi</i> .	20
5		Modelo de la Nit de <i>R. rhodochrous</i> J1 basado en estructuras resueltas.	21
6		Modelo de oligómero de la Nit de <i>R. rhodochrous</i> J1 ajustado en una hélice tridimensional.	21
7		Micrografías electrónicas de tinción negativa para la CynD de <i>B. pumilus</i> C1 a pH 8 y 5.4 y de la nitrilasa trunca en 39 aminoácidos de <i>R. rhodochrous</i> J1.	22
8		Esquema representativo del mecanismo de reacción de las nitrilasas.	24
9		Vista del loop que comprende a la superficie C y de la "tétrada catalítica" en el sitio activo para un modelo de la Nit de <i>R. rhodochrous</i> J1.	25
	2	Especificidad por sustrato de la nitrilasa de <i>Rhodococcus</i> PA-34 para la producción de aminoácidos.	26
10		Síntesis de ácido ( <i>R</i> )-mandélico a partir de mandelonitrilo quiral mediante una resolución cinética dinámica por catálisis con una nitrilasa.	27
11		Diferentes rutas biocatalíticas empleadas comercialmente para la síntesis de objetivos intermediarios del Lipitor®.	28
	3	Propiedades tecnológicas de los sistemas de enzimas inmovilizadas.	29
12		Representación de las diferentes técnicas de inmovilización.	30
13		Diferentes grupos reactivos presentes en los soportes para inmovilización química.	34
14		Esquematización del mecanismo general de formación de un CLEA.	36
15		Esterificación de aminoácido <i>N</i> -protegidos con un CLEA de alcalasa.	38
16		Síntesis de ampicilina empleando un CLEA de Penicilina G amidasa.	38
17		Esquema de preparación de un biocatalizador CLEMPA.	39
18		Proceso bioenzimático para la síntesis de ácido ( <i>S</i> )-mandélico, empleando una hidroxinitrilo liasa ( <i>S</i> ) específica y una nitrilasa no específica en conjunto.	40
19		Estructura y reacción de oxidación del dextrano.	41
	4	Efecto del agente entrecruzante en la actividad recuperada de los CLEAs.	42



20	Comparación de las actividades específicas para las diferentes mutantes por delección en el C-terminal.	44
21	Micrografías obtenidas por microscopía electrónica de transmisión de nitrilasa mutante Nit $\Delta$ C328.	44
22	Formación del complejo morado entre el BCA y el ion cuproso generado de la reacción de Biuret.	56
23	Formación del derivado indofenólico a partir de amoníaco, hipoclorito, nitroprusiato y timol.	57
5	Amortiguadores empleados en cada valor de pH para evaluar la actividad en dichos medios.	60
24	Reacción para la generación de un indano cuantificable por fluorescencia, a partir del amonio liberado de la hidrólisis enzimática.	64
25	Gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 12.5% del seguimiento al proceso de sobreexpresión y solubilidad de la proteína Nit $\Delta$ C328 de <i>R. sp V51B</i> .	66
26	Cromatograma de la purificación por exclusión molecular de la nitrilasa.	67
27	Gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 12.5% de las fracciones seleccionadas tras la purificación por exclusión molecular.	67
6	Actividades específicas determinadas para las dos condiciones de inducción probadas.	68
28	Efecto del tamaño del DPA en la conversión del benzonitrilo tras la inmovilización.	69
29	Relación enzima/entrecruzante y efecto de la carga de cada uno por CLEA en la actividad obtenida.	71
30	Efecto del agente precipitante en la formación de los CLEAs de la nitrilasa.	72
31	Apariencia física los CLEAs obtenidos con cada agente precipitante empleado.	73
32	Determinación de la reusabilidad de los CLEAs.	75
33	Comparativo de estabilidad en almacenamiento para los CLEAs y la nitrilasa libre	76
34	Seguimiento de la actividad residual tras el calentamiento a tres temperaturas (30, 40 y 50 °C) de la nitrilasa inmovilizada y la enzima libre	78
35	Cambio en la apariencia física de los CLEAs de la nitrilasa tras el calentamiento exhaustivo.	79
36	Perfil de actividad de la nitrilasa libre e inmovilizada en función de la temperatura.	80
37	Perfil de pH para la nitrilasa libre e inmovilizada.	82
38	Superficies de interacción en un modelo de un dímero de la nitrilasa Nit $\Delta$ C328 construido por homología.	84
39	Evaluación de la actividad de la nitrilasa inmovilizada en mezclas binarias a diferentes concentraciones.	86
40	Comparación de la actividad de la nitrilasa libre e inmovilizada en las mezclas binarias empleadas.	87
41	Relación entre la actividad de los CLEAs en cada mezcla, constante dieléctrica y log <i>P</i> del disolvente.	88



<b>42</b>	Representación esquemática para la explicación de la dependencia entre la $K_M$ y el Log $P$ del disolvente.	<b>90</b>
<b>43</b>	Estructura, nombres triviales y clasificación de los sustratos empleados para la caracterización de la especificidad y selectividad de la nitrilasa inmovilizada	<b>92</b>
<b>44</b>	Comparativo de las actividades observadas para los 20 sustratos evaluados con la nitrilasa inmovilizada.	<b>93</b>
<b>45</b>	Estructuras con indicaciones de los sitios de mayor inestabilidad para el <i>p</i> -clorobenzonitrilo y el <i>p</i> -nitrobenzonitrilo.	<b>94</b>
<b>46</b>	Estructuras de resonancia más importantes para los piridinonitrilos.	<b>95</b>
<b>47</b>	Estructuras químicas de los derivados del fenilacetoneitrilo con sustituyentes alquílicos en el carbono alfa al nitrilo.	<b>96</b>
	<b>7</b> Productos obtenidos, de acuerdo con la cantidad de amonio liberado, de la hidrólisis enzimática de los dinitrilos.	<b>97</b>
<b>48</b>	Cinética enzimática de la nitrilasa libre y la nitrilasa inmovilizada.	<b>99</b>
	<b>8</b> Parámetros cinéticos para la nitrilasa libre e inmovilizada.	<b>99</b>
<b>49</b>	Modelo construido por homología de un dímero de la Nit $\Delta$ C328 de <i>Rhodococcus</i> sp V51B.	<b>100</b>
	<b>9</b> Máximos de absorción determinados para todos los compuestos analizados.	<b>111</b>
	<b>10</b> Resultados determinados durante el desarrollo de los métodos para detección y cuantificación por CLAR.	<b>112</b>
<b>50</b>	Cromatograma de todos los nitrilos y sus correspondientes ácidos analizados por CLAR.	<b>113</b>
<b>51</b>	Cromatograma de la curva estándar de benzamida, ácido benzoico y benzonitrilo.	<b>113</b>



## Lista de abreviaturas

<b>%</b>	Por ciento de
<b>°C</b>	Grados Celsius
<b>μ</b>	Micro
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>BCA</b>	Ácido bicinconínico
<b>BSA</b>	Albúmina sérica bovina
<b>CHT</b>	Cianuro hidratasa
<b>CLAR</b>	Cromatografía de líquidos de alta resolución
<b>CLEAs</b>	Agregados enzimáticos entrecruzados
<b>CLECs</b>	Cristales enzimáticos entrecruzados
<b>CLEMPAs</b>	Agregados enzimáticos entrecruzados en partículas magnéticas
<b>cm</b>	Centímetro
<b>Cu<sup>+</sup></b>	Ión cuproso
<b>CynD</b>	Cianuro dihidratasa
<b>CynD<sub>pum</sub></b>	Cianuro dihidratasa de <i>Bacillus pumilus</i> C1
<b>Cys</b>	Cisteína
<b>DCasa</b>	<i>N</i> -carbamoil-D-aminoácido-amidohidrolasa
<b>DME</b>	1,2-dimetoxietano
<b>DMF</b>	Dimetilformamida
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DO<sub>600</sub></b>	Densidad óptica a 600 nm
<b>DPA</b>	Dextranpolialdehído
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EtOH</b>	Etanol
<b>g</b>	Gramo
<b>Glu</b>	Ácido glutámico
<b>h</b>	Hora
<b>HnL</b>	Hidroxinitrilo liasa

**Lista de abreviaturas**

<b><i>i</i>PrOH</b>	Isopropanol
<b>IPTG</b>	Isopropil- $\beta$ - <i>D</i> -1-tiogalactopiranosido
<b><math>K_d</math></b>	Constante de desactivación térmica
<b><math>K_M</math></b>	Constante de Michaelis-Mentel
<b>L</b>	Litro
<b>LB</b>	Caldo lisogénico
<b>Log <i>P</i></b>	Coeficiente de partición
<b>Lys</b>	Lisina
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>mg</b>	Miligramo
<b>min</b>	Minuto
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>mUA</b>	Miliunidades de absorbancia
<b>MWCO</b>	Corte de peso molecular
<b>NaBH<sub>4</sub></b>	Borohidruro de sodio
<b><math>n_H</math></b>	Coeficiente de Hill
<b>NHasa</b>	Nitrilo hidratasa
<b>Nit</b>	Nitrilasa
<b>Nit<math>\Delta</math>C328</b>	Nitrilasa trunca en 39 aminoácidos de <i>Rhodococcus</i> sp V51B
<b>nm</b>	Nanómetros
<b><i>n</i>PrOH</b>	n-propanol
<b>PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida
<b>PDB</b>	Base de datos de proteínas
<b>PEG</b>	Polietilenglicol
<b>pH</b>	Potencial de hidrógeno
<b><i>pI</i></b>	Punto isoeléctrico
<b>pKa</b>	Constante de disociación de un ácido
<b>PM</b>	Peso molecular
<b>PMSF</b>	Fluoruro de $\alpha$ -fenilmetilsulfonilo
<b><math>r^2</math></b>	Coeficiente de determinación
<b>RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C</b>	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno-1 y carbono-13



## Lista de abreviaturas

<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>SDS</b>	Laurilsulfato de sodio
<b>SOC</b>	Caldo súper óptimo con represión de catabolito
<b>sp</b>	Sin especie
<b>t<sub>1/2</sub></b>	Vida media de termoinactivación
<b>THF</b>	Tetrahidrofurano
<b>T<sub>m</sub></b>	Temperatura de fusión
<b>UA</b>	Unidades de absorbancia
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>V<sub>máx</sub></b>	Velocidad máxima de catálisis
<b>V<sub>o</sub></b>	Velocidad inicial
<b>WT</b>	Versión silvestre
<b>ε</b>	Constante dieléctrica
<b>λ<sub>máx.</sub> (emisión)</b>	Longitud de onda de máxima emisión
<b>λ<sub>máx.</sub> (excitación)</b>	Longitud de onda de máxima excitación



## **Resumen**

Las enzimas son los catalizadores más eficientes que existen, ofreciendo en muchas ocasiones mayores ventajas que la catálisis química. Sin embargo, a pesar de su gran potencial, sus aplicaciones industriales se han obstaculizado principalmente por su falta intrínseca de estabilidad. Para superar dicho obstáculo, se han puesto en práctica varios enfoques, entre ellos la inmovilización, la cual se define como el confinamiento físico de una enzima, sin que haya una pérdida en su actividad catalítica.

Dentro de la gran diversidad de enzimas que han despertado interés por la industria de la biocatálisis se encuentran las nitrilasas, las cuales son enzimas que convierten nitrilos a sus correspondientes ácidos carboxílicos.

La nitrilasa mutante Nit $\Delta$ C328 de *Rhodococcus* sp V51B constituye un modelo interesante de estudio debido a sus atractivas propiedades, tales como su actividad enzimática, estabilidad aumentada y tolerancia a disolventes en concentraciones bajas. El presente trabajo tuvo como objetivo caracterizar la actividad enzimática de la nitrilasa inmovilizada de *Rhodococcus* sp V51B, con la expectativa de mejorar aún más sus propiedades biocatalíticas.

La proteína se sobreexpresó en *Escherichia coli*, a 22 °C por 8 h. Para su purificación bastó un paso de cromatografía por exclusión molecular. Posteriormente, para su inmovilización se empleó dextranpolialdehído (DPA) de 150 kDa como agente entrecruzante y precipitación salina con sulfato de amonio.

Una vez inmovilizada la enzima, se caracterizó su actividad enzimática para evaluar su estabilidad mecánica y operacional, térmica, química, etc. Se encontró que el método empleado permitió tener hasta 16 reusos del catalizador. Además, se aumentó su estabilidad cinética en almacenamiento y bajo calentamiento a 30, 40 y 50 °C, así como su estabilidad termodinámica al aumentar 10 °C la temperatura de fusión ( $T_m$ ). Con respecto al perfil de pH, la nitrilasa inmovilizada mostró una mayor actividad en los extremos de pH empleados.



Dentro del conjunto de mezclas binarias con disolventes empleadas, se encontró una tolerancia aumentada a estos tras la inmovilización, particularmente hacia acetona, DMF, *n*-propanol e isopropanol.

El estudio de selectividad y especificidad mostró que: 1) los sustratos aromáticos son los preferidos por la enzima inmovilizada, 2) la presencia de sustituyentes en posición *orto* disminuyó la actividad, 3) la presencia de sustituyentes alifáticos en el carbono  $\alpha$  de los arilacetoneitrilos abatió la actividad por completo, 4) no presentó actividad con compuestos  $\alpha,\beta$  insaturados, 5) entre más corta la cadena alifática, mayor la actividad con nitrilos alifáticos y arilalquilnitrilos, 6) se observó monohidrólisis de dinitrilos de hasta cuatro carbonos de longitud y 7) la enzima inmovilizada no mostró enantioselectividad con los compuestos empleados.

Por último, se determinaron los parámetros cinéticos, encontrando que tras la inmovilización hay una pérdida de 29 veces en afinidad, una reducción a la mitad en la  $V_{m\acute{a}x}$  y una transición de cooperatividad positiva a cooperatividad negativa.



## Introducción

Las enzimas nos han acompañado desde hace aproximadamente 6000 AC, cuando el hombre comenzó a elaborar alimentos fermentados, tales como la cerveza, el vino, la soya, etc. A pesar de ello, su exploración empezó hasta cerca de 1833, cuando dos químicos franceses, Payen y Persoz, aislaron por primera vez una enzima (diastasa) a partir de la malta, hoy conocida como amilasa. Posteriormente, en 1836, Berzeliuz elaboró su teoría de la catálisis donde se expresaba “...*hay amplias razones para suponer que en las plantas y animales tienen lugar miles de procesos catalíticos, y que de ellos resultan la formación de gran número de compuestos...*”<sup>(1)</sup>.

Casi un siglo después, durante la primera década del siglo XX, el trabajo de los hermanos Buchner fue un hito que marcó el punto de desarrollo de la biocatálisis como hoy la conocemos. Ellos demostraron que era posible aislar enzimas a partir de levaduras y que estas podían retener su capacidad catalítica y propiedades fisicoquímicas sin la presencia de la célula. Así, a mediados del siglo pasado, fue que se inició como tal el desarrollo de la tecnología enzimática, al empezar a generarse biocatalizadores usados en la fabricación de jarabes a partir de almidón, detergentes, etc.

Hoy en día, debido a las propiedades específicas de estos catalizadores y a los grandes avances que ha tenido la biotecnología en áreas como la microbiología industrial, la biología molecular, la ingeniería de proteínas y la ingeniería enzimática, las enzimas se han posicionado como elementos preponderantes en diversos sectores industriales, con miras a permanecer por mucho tiempo más ahí<sup>(1)</sup>.

Las nitrilasas son enzimas que convierten nitrilos en sus correspondientes ácidos carboxílicos y amoniacos. Estas se encuentran ampliamente distribuidas, tanto en organismos procariontes como eucariontes<sup>(2)</sup>. En las últimas décadas, las nitrilasas han captado considerablemente la atención de la industria biotecnológica debido a su alta especificidad química y frecuente enantioselectividad,

características que permiten su aplicación en la biotransformación de nitrilos como prominentes biocatalizadores. Algunas nitrilasas ya se usan comercialmente como biofábricas para la producción de ácidos carboxílicos de interés industrial o tratamiento de desechos, entre otras<sup>(3)</sup>.

Por otro lado, la inmovilización de enzimas es considerada como el paso clave para la optimización de un proceso, haciendo de estas un recurso de mayor valor y en muchas ocasiones mejorando sus propiedades biocatalíticas.

En función de lo mencionado, en el presente trabajo se expondrán y discutirán las propiedades de las nitrilasas como biocatalizadores emergentes en las últimas décadas, así como las implicaciones que tienen los diversos métodos de inmovilización de enzimas, haciendo énfasis en aquellos que involucran el entrecruzamiento de proteínas. Posteriormente, se describirán, analizarán y discutirán los resultados obtenidos durante el proceso de inmovilización y caracterización cinética de la nitrilasa inmovilizada de *Rhodococcus* sp V51B, todo esto con el objetivo de generar un biocatalizador robusto y con potencial aplicación biotecnológica.

## Marco teórico

### *Biotecnología moderna*

La biotecnología moderna, de acuerdo con la *Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico* (OCDE), se define como “la aplicación de la ciencia y la tecnología en organismos vivos, así como en partes de los mismos, sus productos o modelos, para alterar materiales vivos o muertos para la producción de conocimiento, bienes y servicios”.

De acuerdo con su aplicación, la biotecnología ha evolucionado en tres áreas:

1. Biotecnología roja: la biotecnología roja, o la biotecnología de la salud, es la más visible y se dedica a la prevención, diagnóstico y tratamiento de un gran número de enfermedades nuevas o conocidas.
2. Biotecnología verde: se enfoca en poner la biotecnología al servicio de la mejora de las características de plantas o animales de un modo más rápido y eficiente.
3. Biotecnología blanca: también conocida como biotecnología industrial. La biotecnología blanca es la aplicación de técnicas biotecnológicas para mejorar procesos industriales o crear procesos nuevos<sup>(4)</sup>.

La biotecnología blanca se encuentra en una etapa relativamente temprana en la industria química, pero se considera un posible factor clave para el futuro de ésta. Las aplicaciones industriales de la biotecnología incluyen actualmente materias primas ambientalmente amigables, como los azúcares y el almidón, que reemplacen a los combustibles fósiles, bioprocesos tales como fermentaciones para la producción de vitaminas, la biocatálisis en la producción de ingredientes farmacéuticos activos y otras aplicaciones en la industria textil y de pieles, alimentación animal, industria papelera, energética, metalúrgica y en el procesamiento de desechos y aguas residuales. Las probables áreas en las que hubo una mayor penetración por parte de la biotecnología son en la de la industria química fina y la farmacéutica, donde se estima que tan solo en 2010 se generó

un valor adicional por 60 mil millones de dólares, esto debido a la demanda de productos biológicos, quirales y naturales.

La biotecnología roja, por otro lado, ha afectado profundamente la industria farmacéutica. No sólo existen numerosas compañías nuevas que están desarrollando nuevas terapias con proteínas, sino que también los fármacos convencionales constituidos por “pequeñas moléculas” se han vuelto más complejos. Se ha incrementado la dificultad en la síntesis química de nuevos fármacos, los cuales en muchos casos son quirales, además de que la mayoría de las autoridades regulatorias a menudo exigen el desarrollo de rutas sintéticas que conduzcan a un único enantiómero. Esto plantea grandes retos sintéticos en donde el potencial enfoque biotecnológico para la catálisis regioselectiva y quimioselectiva se ha vuelto crucial. Además, las implicaciones ambientales por el uso de disolventes y reactivos indeseables en química sintética han provocado un aumento en el uso de herramientas biotecnológicas en este sector. Idealmente, desde un punto de vista industrial, es deseable contar con una estrecha integración entre la biotecnología y la catálisis química en las diferentes etapas del descubrimiento de fármacos y su desarrollo para maximizar todo su potencial<sup>(5)</sup>.

### *Química verde*

El concepto de “química verde” constituye varios principios básicos que deberían ser considerados en los procesos químicos para que tengan el menor impacto posible en el ambiente.

La química verde tiene como objetivo mantener y mejorar el ambiente para beneficio de la sociedad. La idea fundamental detrás de este objetivo, aplicada a los procesos químicos que nos permiten generar bienes de consumo, es no generar sustancias peligrosas y transformar las que ya se generan en compuestos menos peligrosos.

Uno de los principios de la química verde es el empleo de catalizadores, los cuales son agentes químicos que disminuyen la energía necesaria para que un proceso ocurra, permitiendo que éste se lleve a cabo en una escala de tiempo menor, es decir, aceleran las reacciones. Además, un catalizador se emplea generalmente en concentraciones bajas y no se consume en el transcurso de la reacción. En los procesos químicos se utilizan catalizadores de diversas naturalezas, entre ellos las enzimas, tales como lipasas, proteasas, entre otras<sup>(6)</sup>.

### *Proteínas, enzimas y biocatálisis*

Las proteínas son las macromoléculas más versátiles en los sistemas vivos y realizan funciones cruciales en esencialmente todos los procesos biológicos. Sus funciones van desde la catálisis, transporte y almacenamiento de moléculas tales como el oxígeno, proveen soporte mecánico y protección inmune, generan movimiento, transmiten impulsos nerviosos y controlan el crecimiento y la diferenciación. Las proteínas que llevan a cabo procesos catalíticos son conocidas como enzimas.

Las enzimas a su vez son notables dispositivos moleculares que actúan como catalizadores altamente efectivos para una diversidad enorme de reacciones químicas debido a su gran poder catalítico y su capacidad de unirse específicamente a un amplio rango de moléculas. Estas aceleran reacciones por factores desde un millón o más. De hecho, la mayoría de las reacciones en los sistemas biológicos no tomarían lugar en cantidades perceptibles en ausencia de enzimas<sup>(7)</sup>.

Estas proteínas catalíticas evolucionaron para desarrollar su función en un medio compatible con la vida, como agua y membranas lipídicas. Sin embargo, estos catalizadores también se pueden utilizar para acelerar reacciones químicas fuera de su ámbito biológico, lo que llevó a la creación de un concepto nuevo denominado “biocatálisis”, que es la aplicación de las propiedades catalíticas de

las enzimas en la obtención de una amplia gama de productos químicos de interés industrial<sup>(6)</sup>.

### *Propiedades verdes de las enzimas*

Dentro del marco de la química verde, las enzimas pueden apoyar a mejorar los procesos industriales, ya que algunas de sus propiedades las hacen no sólo adecuadas, sino deseables para dicha función. Algunas de ellas son:

- Las enzimas son, de forma natural, un recurso renovable. Se pueden producir en distintos organismos y esta producción, a su vez, requiere únicamente materiales renovables.
- Presentan una alta especificidad por sus sustratos. El empleo de catalizadores selectivos permite la separación y reutilización de materiales, distintos al sustrato de la reacción, incluidos en las materias primas.
- Las enzimas se pueden usar durante varios ciclos de un proceso, siempre que se cuente con los métodos adecuados para recuperarlas. Estos procesos generalmente requieren inmovilización de la enzima en un soporte sólido de fácil separación.
- El disolvente natural de las enzimas es el agua, por lo que no se requiere el uso de disolventes orgánicos. Sin embargo, en caso de ser necesario, las enzimas también pueden actuar en presencia de estos disolventes.
- Las enzimas funcionan a temperaturas y presiones moderadas, ambientales en muchos casos, reduciendo así el impacto económico asociado a la necesidad de energía para cambiar dichas variables<sup>(6)</sup>.
- El uso de enzimas generalmente evita la necesidad de activación de grupos funcionales, así como los pasos de protección y desprotección requeridos tradicionalmente en síntesis orgánica, con lo que se reduce de manera significativa el número de operaciones necesarias para obtener un producto<sup>(6,8)</sup>.

Superfamilia nitrilasa

La superfamilia nitrilasa consiste en un conjunto de tiol-enzimas involucradas en la biosíntesis de productos naturales, tales como auxinas, biotina y β-alanina, y en modificaciones postraduccionales en plantas, animales, hongos y ciertos procariontas. De acuerdo con la similitud de secuencia y la presencia de dominios adicionales, la superfamilia puede ser clasificada en trece ramas, pudiendo anticipar la especificidad por sustrato de miembros de nueve de estas ramas (figura 1)<sup>(9)</sup>.

1. Nitrilasa	63	f	P	E	a	f	67	150	h	R	K	I	.	p	T	156	184	l	.	C	W	E	n	.	.	p	192
2. Amidasa alifática	57	F	P	E	Y	S	61	132	Y	R	K	i	.	P	W	138	164	i	l	C	d	D	G	n	y	P	172
3. N-terminal amidasa	61	F	P	E	.	.	65	134	Y	r	K	.	F	L	.	140	185	.	l	C	M	D	.	.	P	Y	193
4. Biotinidasa	90	f	P	E	d	.	94	190	Y	r	K	.	h	L	y	196	223	F	t	C	F	D	i	l	f	y	231
5. β-ureidopropionasa	117	.	Q	E	A	W	121	194	.	R	K	N	H	I	P	200	231	N	l	C	Y	G	R	H	H	P	239
6. Carbamilasa	45	F	p	E	L	A	49	125	Y	R	K	i	H	L	P	131	170	f	l	C	N	D	R	R	W	P	178
7. NAD sintetasa procarionte	42	f	P	E	L	.	46	111	.	.	K	.	.	L	P	117	146	.	l	C	E	D	.	w	.	p	154
8. NAD sintetasa eucarionte	43	G	P	E	L	E	47	112	R	p	K	m	.	l	a	118	173	E	i	C	E	E	L	w	.	p	181
9. ALP N-acetiltransferasa	267	w	p	E	.	a	271	328	.	.	K	.	.	l	v	334	380	.	i	C	y	E	.	.	f	.	388
10. Nit y NitFhit	83	L	P	E	.	f	87	159	y	r	K	.	H	I	F	165	201	.	i	C	Y	D	.	R	F	p	209
11. NB11	41	.	q	E	l	f	45	113	Y	R	K	.	H	I	P	119	150	.	i	C	w	D	q	w	f	p	158
12. NB12	266	F	P	E	i	F	270	243	Q	y	K	I	H	i	T	249	277	q	l	C	Y	D	i	E	F	P	285
13. Elementos no fusionados	36	l	P	E	.	.	40	108	y	r	K	.	h	L	f	114	145	.	i	C	y	d	.	r	F	p	153

**Figura 1. Alineamiento de secuencias de las trece ramas que forman la superfamilia nitrilasa.** Las letras rojas con fondo amarillo indican los residuos conservados en todas las ramas, correspondientes a tres de los cuatro aminoácidos catalíticos (Glu-Lys-Cys). Modificada de Pace, 2001<sup>(9)</sup>.

A pesar de la histórica clasificación de todas estas secuencias, únicamente una de las ramas es conocida por tener actividad de nitrilasa, mientras que ocho de las ramas tienen actividad aparente de amidasa o de condensación de amidas (cuadro 1)<sup>(9)</sup>.

Aunque existe una identidad de secuencia variable (≈20%), todas las estructuras comparten un plegamiento monomérico característico formado por un motivo estructural de cuatro capas α-β-β-α, así como la conservación de dos glutamatos, una lisina y una cisteína en su sitio catalítico. Los monómeros se asocian en forma común para formar un sándwich αββα-αββα<sup>(2)</sup>.

## Resumen de las actividades enzimáticas de la superfamilia nitrilasa

Rama nitrilasa	Nitrilasa	Amidasa		Amidasa reversa	Carbamilasa	Sustrato proteico
	$R-C\equiv N$	$R-C(=O)NH_2$	$R-C(=O)NHR_1$		$R-NH-C(=O)NH_2$	
1. Nitrilasa	Sí					
2. Amidasa alifática		Sí				
3. <i>N</i> -terminal amidasa		Sí				Sí
4. Biotinidasa		Sí	Sí			Algunas veces
5. $\beta$ -Ureido propionasa		Sí			Sí	
6. Carbamilasa		Sí			Sí	
7. NAD sintetasa procariota		Supuesto				
8. NAD sintetasa eucarionte		Supuesto				
9. Apolipoproteína <i>N</i> -acetiltransferasa			Sí	Sí		Sí
10. Nit y NitFhit						
11. NB 11						
12. NB 12						Supuesto
13. Elementos no fusionados						

**Cuadro 1. Superfamilia nitrilasa.** En el cuadro se muestran las actividades enzimáticas por sustrato de cada una de las trece ramas de la superfamilia. Modificada de Pace, 2001<sup>9</sup>.

## Nitrilasas y nitrilos

Las nitrilasas son una importante clase de enzimas industriales pertenecientes a la superfamilia nitrilasa y que son expresadas ampliamente tanto en procariontas como en eucariotas. Estas enzimas hidrolizan nitrilos en sus correspondientes ácidos carboxílicos y amoniaco, aunque ocasionalmente llegan a liberar la amida como producto (figura 2). La rama de las nitrilasas está formada por nitrilasas (Nit), cianuro dihidratasa (CynD) y cianuro hidratasa (CHT)<sup>(2)</sup>.

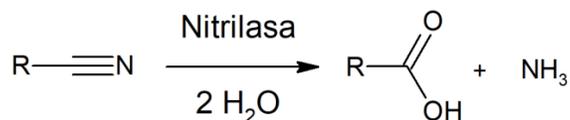


Figura 2. Reacción típica de las nitrilasas.

Las nitrilasas constituyen biocatalizadores atractivos en las industrias química fina y farmacéutica debido a su alta especificidad y su quimio-, regio- y enantioselectividad. Además, son empleadas en la detoxificación de desechos industriales y degradación de herbicidas. En general, la biocatálisis de nitrilos opera en disoluciones acuosas a valores de temperatura y pH moderados, minimizando así los costos de los procesos químicos, así como el impacto de la industria en el ambiente<sup>(2)</sup>.

Los nitrilos se encuentran ampliamente distribuidos en el ambiente. En la naturaleza, estos son producidos por plantas en varias formas, tales como cianoglucósidos, cianolípidos, ricinina, fenilacetónitrilo, etc. A pesar de que la mayoría de los nitrilos son tóxicos, mutagénicos y carcinogénicos en la naturaleza, estos constituyen también importantes intermediarios para la síntesis orgánica de aminas, amidas, amidinas, ácidos carboxílicos, ésteres, compuestos carbonílicos y compuestos heterocíclicos (figura 3). Por lo tanto, las nitrilasas, junto con otras enzimas convertidoras de nitrilos, se consideran biocatalizadores importantes con potenciales aplicaciones en el campo de la química orgánica. El uso de las nitrilasas ha atraído substancial interés debido a que los métodos químicos convencionales para la hidrólisis de nitrilos implican el uso de condiciones severas, tales como el uso de ácidos o bases y altas temperaturas. Tales condiciones son generalmente inadecuadas cuando los complejos moleculares son sensibles o compuestos quirales son involucrados. Productos secundarios y pérdidas de rendimiento son además los principales inconvenientes de los métodos no enzimáticos para la hidrólisis de nitrilos<sup>(10)</sup>.

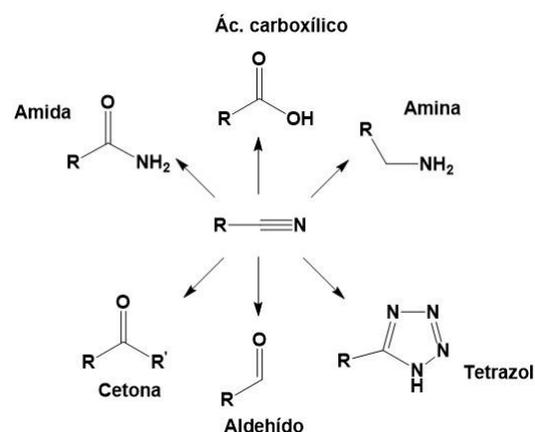
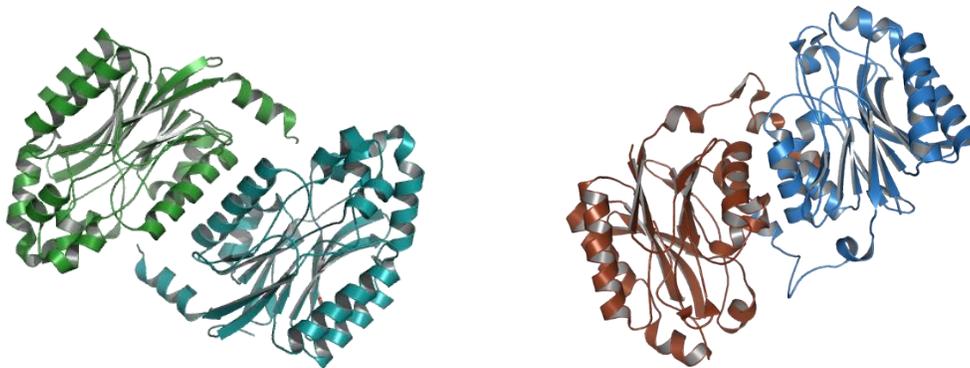


Figura 3. Ejemplos de grupos funcionales que se pueden obtener a partir de un nitrilo.

### Estructura y oligomerización

A la fecha, únicamente se conoce la estructura tridimensional de dos nitrilasas verdaderas, la de *Pyrococcus abyssi* y la de *Synechocystis* sp. PCC 6803. Cada monómero de enzima tiene un plegamiento  $\alpha\beta\beta\alpha$ , característico de la superfamilia, que se asocian para formar un dímero de 8 capas  $\alpha\beta\beta\alpha$ - $\alpha\beta\beta\alpha$  a través de la superficie "A". Las diferencias más importantes se encuentran alrededor del sitio activo y en las interacciones del extremo C-terminal, estando este último implicado en la formación de la superestructura de sándwich (figura 4)<sup>(11,12)</sup>.

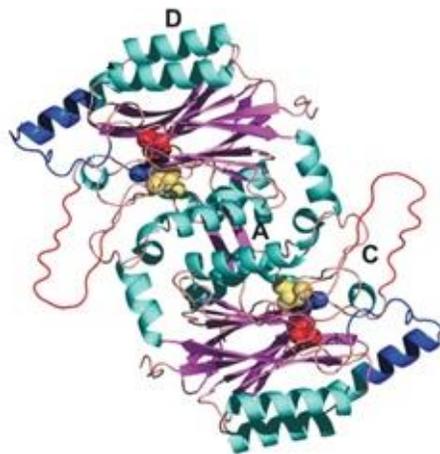


**Figura 4. Estructuras cristalográficas de las nitrilasas de *Synechocystis* sp. PCC6803 (PDB 3WUY, izquierda) y de *Pyrococcus abyssi* (PDB 3IVZ, derecha). Se observa la topología característica tipo "sándwich"  $\alpha\beta\beta\alpha$ , así como la asociación de monómeros en forma de dímero<sup>(11,12)</sup>.**

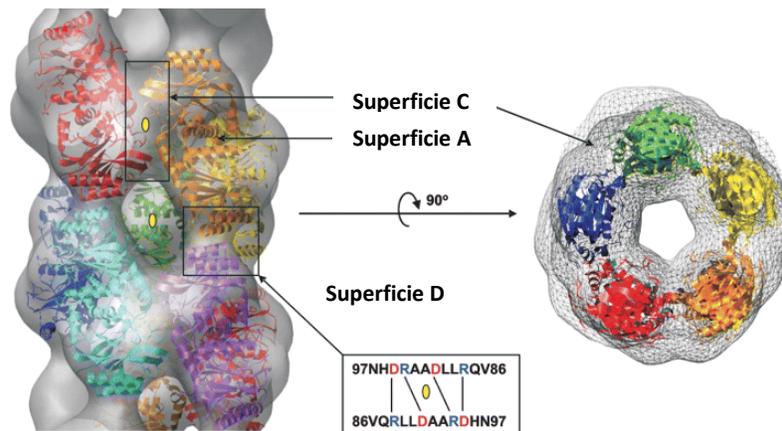
Las nitrilasas microbianas en general son conocidas por existir como dímeros inactivos en disolución, exceptuando al dímero activo de *Pyrococcus abyssi*. La mayoría de estas enzimas tienen un peso por subunidad que va de los 30 a los 45 kDa, los cuales se autoasocian para formar oligómeros activos, teniendo entre 4 y 22 subunidades, o en espirales activas de longitud variable. Mientras que las estructuras cristalinas forman dímeros, tetrámeros, hexámeros u octámeros, las nitrilasas microbianas forman espirales homo-oligoméricas con variable número de subunidades.

De acuerdo con las diferentes regiones que participan tanto en la asociación de los monómeros, como en la formación de estructuras más

complejas, es posible identificar las interfases que llevan a la formación de oligómeros espirales. La localización de las regiones interfaciales y la forma en que estas se asocian se muestran en las figuras 5 y 6, correspondientes a un modelo por homología construido para la nitrilasa de *Rhodococcus rhodochrous* J1. La superficie "A" es aquella en la que se dan todas las interacciones básicas para la dimerización, mientras que la superficie "C" es clave para la formación de las estructuras cuaternarias en forma de espiral. La superficie "D" ocurre únicamente cuando la espiral completa un giro (figuras 5 y 6)<sup>(2,13,14)</sup>.



**Figura 5. Modelo de la Nit de *R. rhodochrous* J1 basado en estructuras resueltas.** Se indican las regiones más importantes de interacción entre monómeros (Superficie A), dímeros (Superficie C) y la formada cuando la espiral completa un giro (Superficie D). Los residuos catalíticos, Glu (rojo), Lys (azul) y Cys (amarillo) son ilustrados como esferas<sup>(14)</sup>.



**Figura 6. Modelo de oligómero de la Nit de *R. rhodochrous* J1 ajustado en una hélice tridimensional.** La hélice es construida por los dímeros que interaccionan a lo largo de la superficie A, que a su vez interactúan mediante las superficies C y D<sup>(14)</sup>.

El dímero constituye el bloque de construcción primario para la oligomerización y su asociación ocurre en varias formas entre las enzimas de la superfamilia. En particular, la nitrilasas del género *Rhodococcus* pueden formar complejos que se estima tienen entre 10 y 12 subunidades en presencia de sustrato, tratamiento con calor o con la adición del sulfato de amonio o de un disolvente orgánico. Este fenómeno también se observa con las cianuro dihidratasas, como es en el caso de la CynD de *B. pumilus* C1 (CynD<sub>pum</sub>) que fue encontrada como espirales de 18 subunidades hasta hélices de longitud variable, mostrando una dependencia por el pH del medio para la formación de las estructuras observadas<sup>(2,15)</sup>.

Existen numerosas sugerencias acerca del significado funcional de la oligomerización. Jandhyala y colaboradores observaron un incremento en la actividad de CynD<sub>pum</sub> respecto a un homólogo para el que no ocurre un cambio estructural dependiente del pH (figura 7)<sup>(15)</sup>. Un incremento en la actividad, acompañado de un aumento en el tamaño del complejo oligomérico, es comúnmente observado en especies de *Rhodococcus* en donde dímeros inactivos y oligómeros activos superiores han sido encontrados. Probablemente el mejor ejemplo es el de la nitrilasa de *R. rhodochrous* J1, la cual mostró la formación de oligómeros activados de 480 kDa que se autorearreglaron en largas hélices después de un corte de 39 aminoácidos en el fragmento del C-terminal, probablemente debido a una autoproteólisis (figura 7)<sup>(2,14)</sup>.

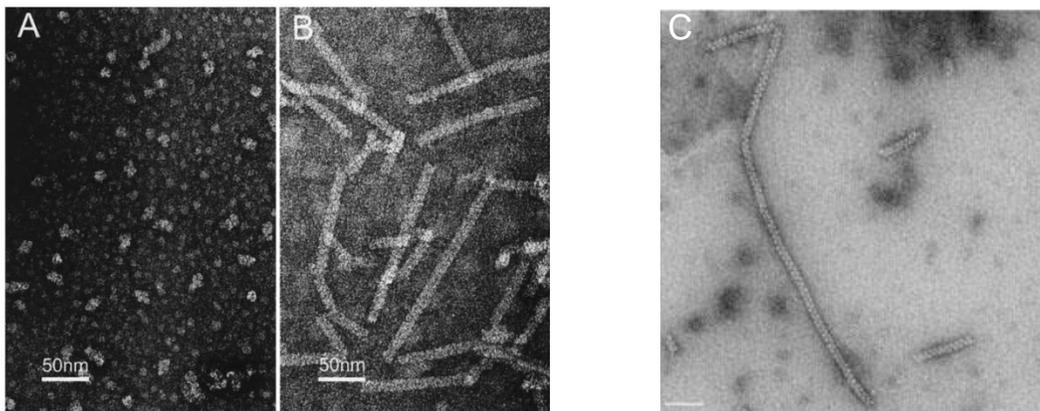


Figura 7. Micrografías electrónicas de tinción negativa para la CynD de *B. pumilus* C1 a pH 8 (A) y 5.4 (B), mostrando la transición de partículas discretas a filamentos extendidos. (C) Hélices formadas por la nitrilasa trunca en 39 aminoácidos de *R. rhodochrous* J1<sup>(14,15)</sup>.

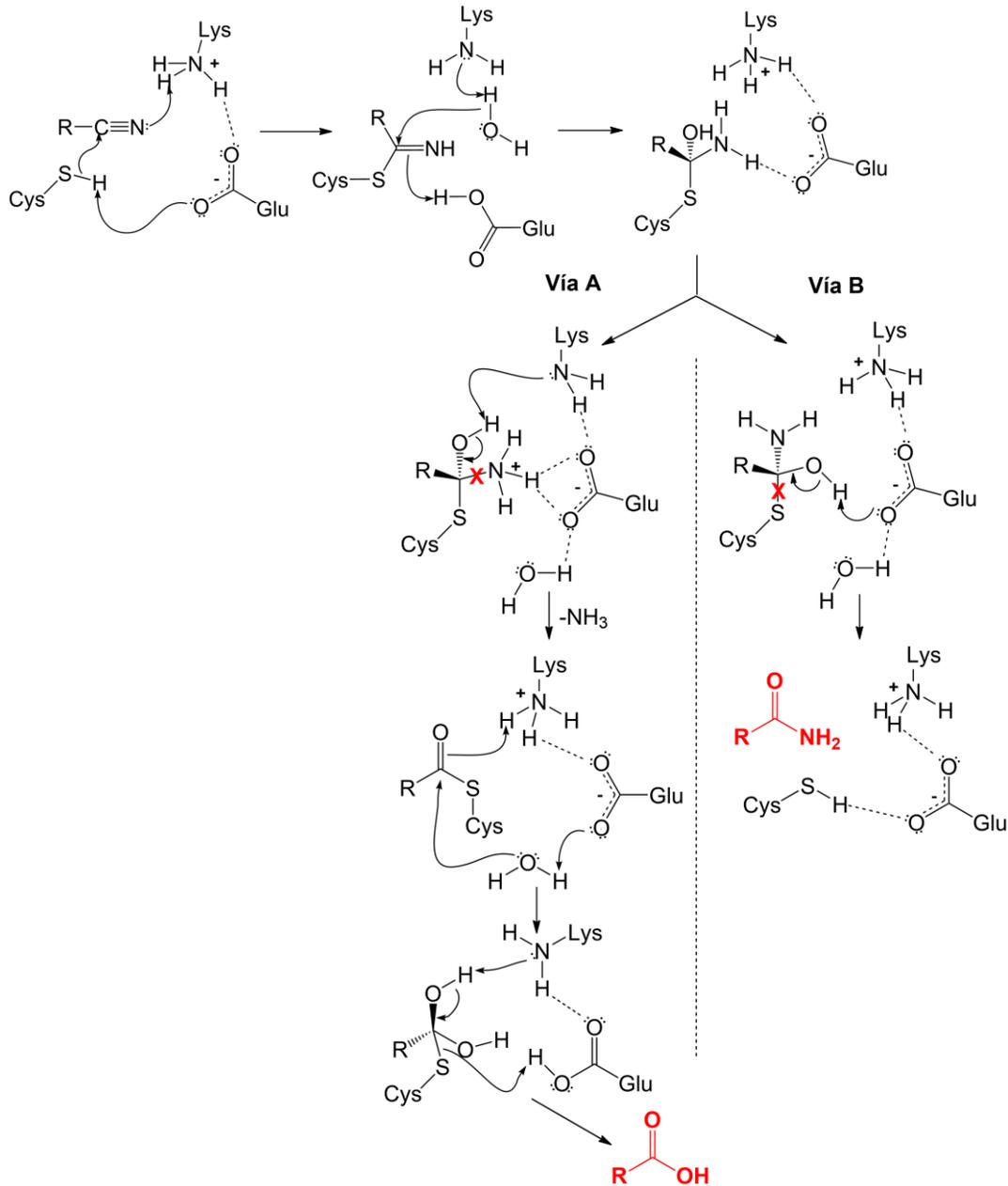
### *Mecanismo de reacción*

Todas las enzimas de la superfamilia conservan los tres residuos catalíticos, es decir, una cisteína que actúa como nucleófilo, un glutamato que actúa como un catalizador ácido-base y una lisina que estabiliza al intermediario tetraédrico<sup>(2,11,12)</sup>. Mientras que el mecanismo de reacción de las nitrilasas no está bien definido, información considerable puede ser inferida de estudios estructurales de otros miembros de la superfamilia, en particular de la *N*-carbamoil-D-aminoácido-amidohidrolasa (DCasa) de *Agrobacterium radiobacter* y la amidasa de *Geobacillus pallidus* RApc8. En ambas enzimas el nitrógeno del grupo amida del sustrato está interaccionando por puente de hidrógeno con los dos glutamatos del sitio activo (47 y 146 en la DCasa). La posición de ambos glutamatos está conservada en estructuras conocidas y ha sido sugerido que estas interacciones juegan un papel importante en el posicionamiento del sustrato. Se ha establecido que la reacción empieza con un ataque nucleofílico de la cisteína del sitio activo sobre el sustrato para formar un intermediario tetraédrico. Uno de los dos glutamatos (Glu47) incrementa la nucleofilicidad de la cisteína y participa en la transferencia de protón, dando lugar a la liberación de amoniaco. El intermediario tetraédrico es pensado que es estabilizado por la lisina conservada. El intermediario tioéster, formado después de la liberación de amonio, es sometido a un ataque nucleofílico catalizado por base, formando un segundo intermediario tetraédrico estabilizado, el cual después colapsa, conllevando a la liberación del producto ácido y la restauración de la enzima (figura 8)<sup>(2)</sup>.

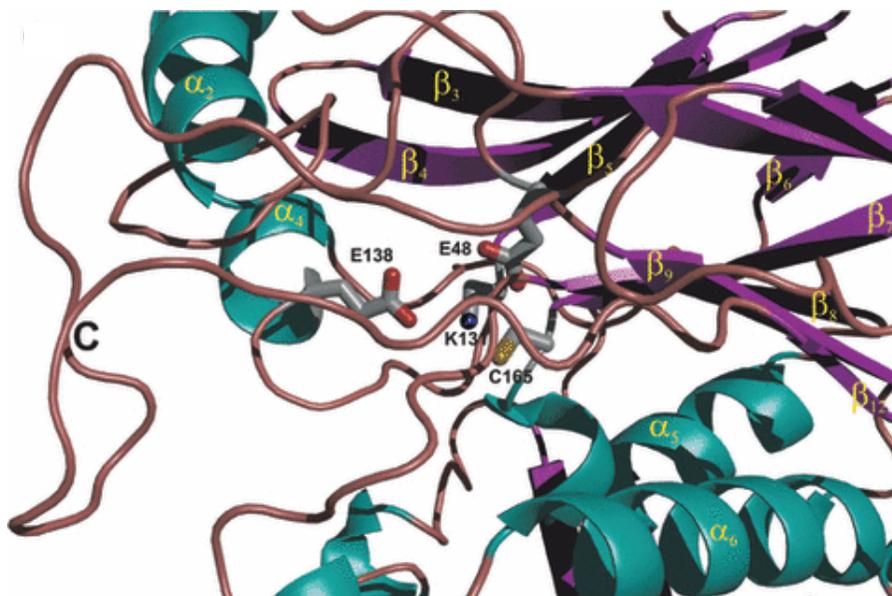
La observación de que el intermediario acil-enzima podría prevenir el acceso de agua a la vecindad del primer glutamato del sitio activo (E59 en la amidasa de *G. pallidus*), conduce a la sugerencia de que la hidrólisis de este intermediario puede ser catalizada por el segundo residuo de glutamato (E142 en la amidasa de *G. pallidus*), cuya cadena lateral se encuentra en posición adecuada para actuar como catalizador ácido-base. Se ha observado que la amidasa mutante E142L de *G. pallidus* RApc8 es inactiva y conduce a la formación de una cisteína modificada covalentemente con ciertos sustratos.



Además, la localización del E142 en un loop que está dirigido hacia la superficie “C” (figura 9), hace pensar que este residuo se mueve a otra posición por la oligomerización, y por lo tanto explica la inactividad de las nitrilasas como dímeros, particularmente en las bien caracterizadas del género *Rhodococcus*<sup>(2,16)</sup>.



**Figura 8. Esquema representativo del mecanismo de reacción de las nitrilasas.** Se ejemplifican las dos posibles vías que puede seguir la reacción, dependiendo del sustrato empleado, ya sea para la formación del ácido carboxílico (vía A) o de la amida (vía B)<sup>(17,18)</sup>.



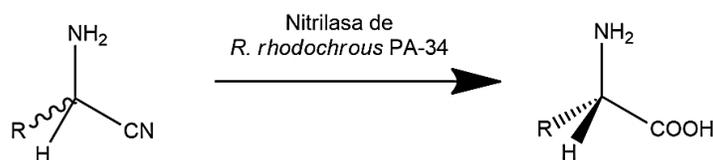
**Figura 9. Vista del loop que comprende a la superficie C y de la “tétrada catalítica” en el sitio activo para un modelo de la Nit de *R. rhodochrous* J1.** El sitio activo comprende una cisteína (C165), una lisina (K131) y dos glutamatos (E48 y E138). La localización del E138 en la superficie C plantea la posibilidad de que la asociación de dímeros mueve a este residuo a su correcta posición para la actividad catalítica<sup>(2)</sup>.

Se ha sugerido que, en el caso de los nitrilos como sustratos, un intermediario tioimidato es formado después del primer ataque nucleofílico, que es posteriormente hidrolizado con la liberación de amoníaco y un acil-intermediario, el cual es sometido a un segundo paso de hidrólisis que es similar al postulado para las amidasas y las DCasas. Dependiendo de la naturaleza del sustrato, se ha visto que se puede obtener como producto una concentración significativa de amida, lo cual sugiere que el enlace escindible del intermediario tetraédrico tioimidato no está bien determinado para todos los sustratos<sup>(2)</sup>. Ejemplo de esto es el reportado por Kiziak y colaboradores para la arilacetoneitrilasa de *Pseudomonas fluorescens* EBC191, la cual, dependiendo del sustrato, forma el producto amida en un rango del 8 al 89%. En esta enzima, una correlación positiva fue observada entre la cantidad de amida producida y la deficiencia electrónica del carbono- $\alpha$  del nitrilo, sugiriendo una sutil interacción entre el sitio activo y el sustrato. Además, bajas temperaturas y valores de pH altos hacen que la reacción se dirija hacia la formación de la amida como producto<sup>(3,17,19)</sup>.

## Obtención de productos de interés industrial a partir de nitrilasas

## Alfa-aminoácidos

Obtenidos comúnmente mediante la reacción de Strecker, los  $\alpha$ -aminonitrilos son sustratos atractivos para una conversión selectiva, vía hidrólisis enzimática, en  $\alpha$ -aminoácidos de gran pureza óptica. Estos últimos se han usado ampliamente como bloques constructivos en la industria farmacéutica, como aditivos en alimentos y en la nutrición humana. En el cuadro 2 se exponen los resultados obtenidos por Bhalla y colaboradores al hidrolizar varios  $\alpha$ -aminonitrilos, empleando una nitrilasa enantioselectiva<sup>(20)</sup>.



Sustrato	Producto	Actividad (%)	Pureza óptica (%ee)
DL- $\alpha$ -aminoisocapronitrilo	L-Leucina	100	89.7
DL- $\alpha$ -aminopropionitrilo	D-Alanina	24.4	57.3
DL- $\alpha$ -isovaleronitrilo	L-Valina	0.16	100
DL- $\alpha$ -n-valeronitrilo	L-Norvalina	107	92.2
DL- $\alpha$ -capronitrilo	L-Norleucina	77.5	100
DL- $\alpha$ -amino-4-metiltiobutironitrilo	L-Metionina	5.37	96.0

**Cuadro 2. Especificidad por sustrato de la nitrilasa de *Rhodococcus* PA-34 para la producción de aminoácidos.**

## Ácido mandélico y derivados

Otro producto de igual interés es el ácido (*R*)-mandélico, el cual se ha descrito como un intermediario clave para la síntesis de penicilinas y cefalosporinas semisintéticas, un agente para resolución quiral, así como un sintón quiral para la síntesis de agentes antitumorales y contra la obesidad, mientras que el estereoisómero (*S*) se usa para la síntesis de los antiinflamatorios no

esteroidales celecoxib y deracoxib. Notablemente, la nitrilasa de *Alcaligenes faecalis* ATCC 8750 mostró rendimientos de conversión del 91% de mandelonitrilo, con un exceso enantiomérico del 99% del estereoisómero (*R*). La reacción usualmente se lleva a cabo en condiciones ligeramente alcalinas, en las cuales la nitrilasa (*R*) selectiva hidroliza preferentemente al (*R*)-mandelonitrilo a ácido (*R*)-mandélico, mientras que el (*S*)-mandelonitrilo no reactante es espontáneamente racemizado *in situ* bajo las condiciones alcalinas, formando nuevamente (*R*)-mandelonitrilo que es usado para la hidrólisis (figura 10)<sup>(21)</sup>.

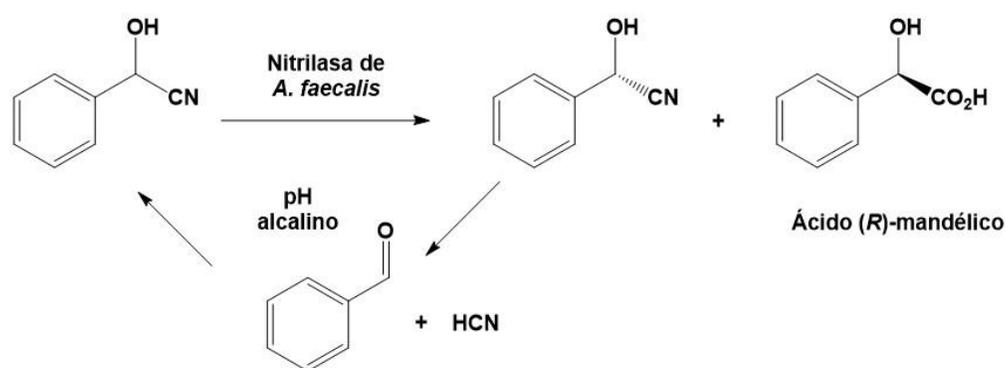


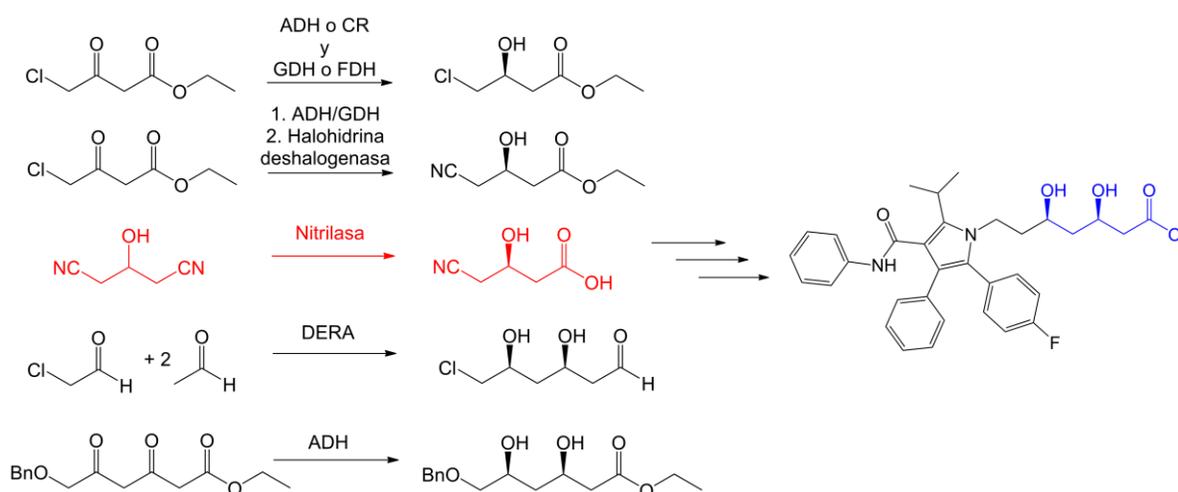
Figura 10. Síntesis de ácido (*R*)-mandélico a partir de mandelonitrilo quiral mediante una resolución cinética dinámica por catálisis con una nitrilasa.

#### Ácido (*R*)-4-ciano-3-hidroxibutírico

El Lipitor®, el medicamento más vendido en el mundo, es empleado en la reducción de los niveles del colesterol y es un miembro de la familia de las estatinas inhibidoras de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa. Contiene una cadena lateral (3*R*,5*S*)-dihidroxihexanoato con dos centros quirales. El gran requerimiento por parte del mercado de medicamentos reductores de colesterol ha estimulado grandes esfuerzos para la síntesis eficiente y económica de la cadena lateral quiral, incluyendo la reducción asimétrica, catalizada por cetoreductasas, de precursores carbonílicos, la resolución cinética, promovida por lipasas, de los respectivos ésteres, la formación de enlaces carbono-carbono de aldehídos

mediada por aldolasas y la desimetrización del 3-hidroxi-glutaronitrilo racémico empleando nitrilasas (figura 11).

De acuerdo con los métodos reportados, la desimetrización catalizada por nitrilasas del 3-hidroxi-glutaronitrilo para obtener el ácido (*R*)-4-ciano-3-hidroxi-butírico ha mostrado grandes ventajas debido a que se puede llevar a cabo con rendimientos teóricos del 100%, además de que las nitrilasas son enzimas que no necesitan de cofactores para operar, y se puede partir de materias primas de bajo costo como la epíclorhidrina<sup>(21,22)</sup>.



**Figura 11. Diferentes rutas biocatalíticas empleadas comercialmente para la síntesis de objetivos intermediarios del Lipitor.** Se resalta la ruta que emplea una nitrilasa (rojo). ADH= Alcohol deshidrogenasa, CR= Carbonil reductasa, GDH= Glucosa deshidrogenasa, FDH= Formiato deshidrogenasa, DERA= Desoxiribosa-5-fosfato aldolasa y Bn= Bencilo. Imagen modificada de Thayer, 2006<sup>(23)</sup>.

### Inmovilización de enzimas

El término “enzimas inmovilizadas” hace referencia a “enzimas confinadas físicamente o localizadas en una región definida del espacio, con retención de sus actividades catalíticas y que pueden ser usadas repetida y continuamente”. Además de sus aplicaciones en procesos industriales, las técnicas de inmovilización son la base para la producción de diversos productos

biotecnológicos con aplicación en diagnóstico, cromatografía de bioafinidad y biosensores.

Los principales componentes de un sistema con una enzima inmovilizada consisten en la enzima, la matriz y el modo en que estas se unen. Las enzimas pueden ser unidades al soporte o matriz mediante un conjunto de interacciones, desde la adsorción física y uniones iónicas, hasta la formación de enlaces covalentes estables. Algunas de las propiedades tecnológicas de los sistemas de enzimas inmovilizadas se muestran en el cuadro 3<sup>(24)</sup>.

<b>Ventajas</b>	<b>Desventajas</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Reusabilidad del catalizador</li> <li>- Mayor facilidad en la operación del reactor</li> <li>- Mayor facilidad para la separación del producto</li> <li>- Elección más amplia del reactor</li> <li>- Mayor estabilidad operacional y en almacenamiento del catalizador</li> <li>- Disminución de la inhibición por productos de reacción</li> <li>- Mejores propiedades funcionales comparado con la correspondiente enzima soluble</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pérdida o reducción de la actividad</li> <li>- Limitación difusional</li> <li>- Costo adicional</li> </ul>

**Cuadro 3. Propiedades tecnológicas de los sistemas de enzimas inmovilizadas<sup>(24,25)</sup>.**

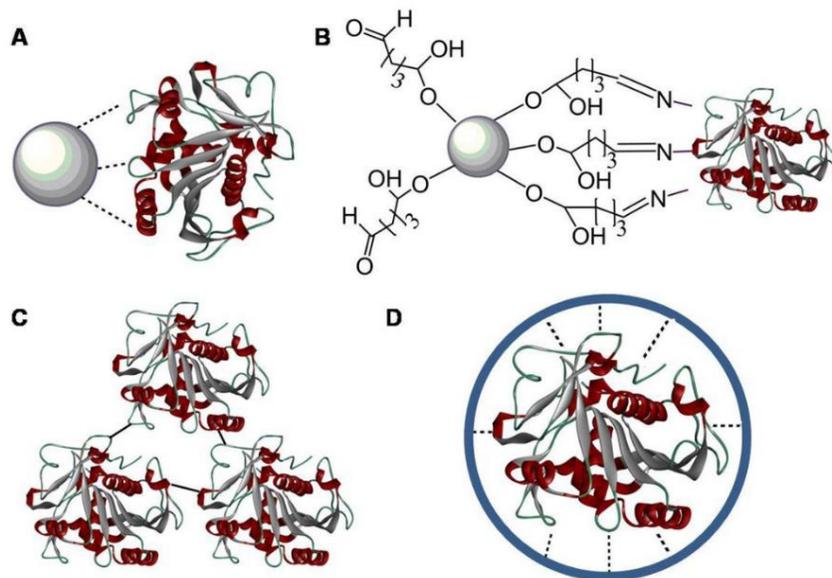
Existen un número de factores a considerar durante la elección de la estrategia de inmovilización enzimática, incluyendo:

- a) Tolerancia de la enzima a la inmovilización
- b) Ambiente químico y físico
- c) Grupos funcionales en la superficie de la proteína
- d) Tamaño de la enzima
- e) Carga de la proteína (*pI*)
- f) Polaridad de la proteína (regiones hidrofóbicas/regiones hidrofílicas)
- g) Necesidades de transporte de sustrato/producto

Además de los mencionados, existen factores relacionados con los que debe cumplir la matriz a emplear como soporte, tales como el tener una amplia superficie, ser mecánica y químicamente estable, resistencia al ataque microbiano, hidrofiliicidad y disponibilidad a bajo costo. No existe un método general que pueda ser aplicado para la inmovilización de cualquier enzima. Típicamente el enfoque usado es de ensayo y error, hasta que un sistema adecuado se alcanza<sup>(26,27)</sup>.

Las técnicas más frecuentes de inmovilización empleadas caen en cinco categorías (figura 12), cada una de estas con sus propias ventajas y desventajas:

- I. Adsorción y deposición no covalente
- II. Inmovilización vía interacciones iónicas
- III. Fijación covalente
- IV. Atrapamiento en geles poliméricos o cápsulas
- V. Entrecruzamiento de una enzima



**Figura 12. Representación de las diferentes técnicas de inmovilización.** (A) Adsorción no covalente y vía interacciones iónicas, (B) Fijación covalente a un soporte, (C) Entrecruzamiento y (D) Atrapamiento en geles o cápsulas<sup>(28)</sup>.

### *Adsorción y deposición no covalente*

La adsorción de enzimas en soportes puede proceder vía diferentes tipos de interacciones. Enzimas con amplias superficies lipofílicas interactuarán con soportes hidrofóbicos mediante fuerzas de van der Waals y cambios en la entropía, asegurando su inmovilización en el soporte. Por otro lado, residuos de azúcares en enzimas glicosiladas pueden asegurar la inmovilización vía puentes de hidrógeno, dado que grandes áreas de superficies hidrofílicas de la enzima interactuarán con soportes hidrofílicos. La ventaja de la inmovilización vía efectos entrópicos o puentes de hidrógeno es que la enzima no tiene que ser pretratada o químicamente modificada e incluso es posible usar preparaciones crudas de la enzima para estas inmovilizaciones.

Sin embargo, una desventaja significativa de la inmovilización por absorción es que la enzima tiende a separarse del soporte cuando se emplea en un medio acuoso. Este no es el caso si son usados disolventes orgánicos, debido a la insolubilidad intrínseca de las enzimas en tales medios. En el caso de la deposición, el soporte simplemente es adicionado a una disolución acuosa de la enzima y posteriormente el biocatalizador es recuperado por precipitación o evaporación de la fase acuosa. Como resultado, la enzima es depositada en el soporte sólido y no están involucradas fuerzas motrices hidrofóbicas o entrópicas en el proceso de inmovilización.

### *Inmovilización vía interacciones iónicas*

Dependiendo del pH de la disolución y el punto isoeléctrico de la superficie de la enzima, ésta puede adquirir cargas, las cuales son aprovechadas para unirse iónicamente a un soporte cargado. Esencialmente cualquier intercambiador de iones puede actuar como un soporte para inmovilización vía interacciones iónicas y fuertemente polares. Dependiendo de la carga predominante de la enzima, el intercambiador de iones necesita estar negativo (por ejemplo, por carboxilatos) o positivo (por ejemplo, por grupos amino protonados)<sup>(27)</sup>.

El método es simple y reversible, pero, en general, es difícil encontrar condiciones bajo las cuales la enzima permanezca fuertemente unida y completamente activa. Dentro de los problemas que surgen con este tipo de inmovilización están el uso de soportes altamente cargados que cuando los substratos o productos poseen carga propia se observan resultados cinéticos distorsionados como resultado de los fenómenos de partición y difusión. Por lo tanto, las propiedades de la enzima, tales como pH óptimo o estabilidad dependiente del pH, pueden cambiar. A pesar de que esto puede traer un problema, también puede ser útil para cambiar las condiciones óptimas de una cierta enzima hacia condiciones más alcalinas o ácidas, dependiendo de la aplicación<sup>(24)</sup>.

### *Fijación covalente*

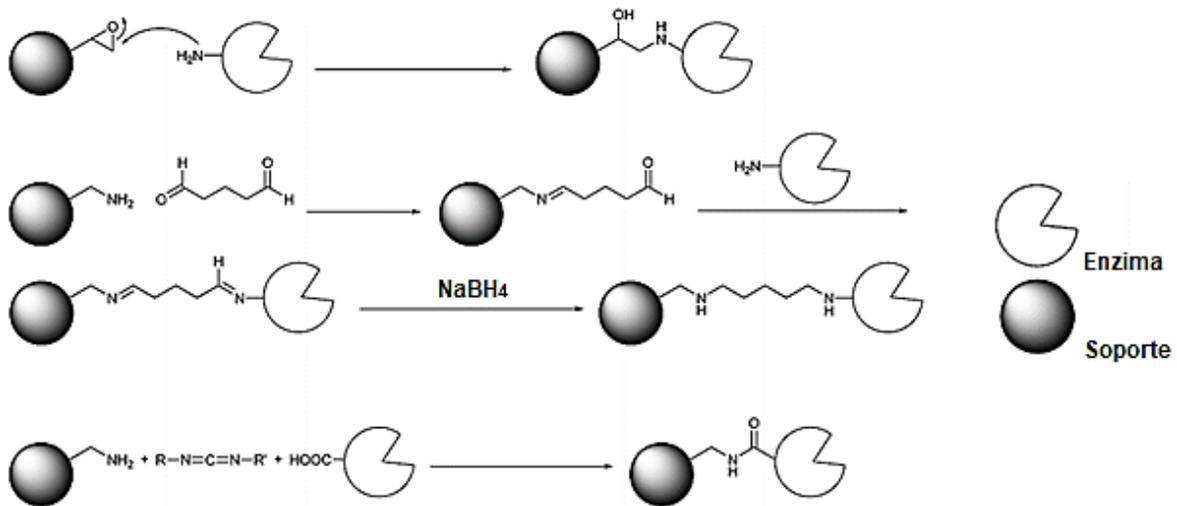
La inmovilización de proteínas por métodos basados en la formación de enlaces covalentes está entre los más usados. Una ventaja de estos métodos es que, debido a la naturaleza estable de los enlaces formados entre la enzima y la matriz, la enzima no es liberada en la disolución durante su uso. Sin embargo, con la finalidad de alcanzar altos niveles de actividad ya enlazada la enzima, los residuos esenciales para la actividad catalítica no deben involucrarse en la unión covalente con el soporte; esto puede ser un difícil requerimiento de cumplir en ciertos casos<sup>(24)</sup>.

Como regla de oro, la inmovilización covalente debe prevalecer cuando se trabaje en disoluciones acuosas y cuando factores desnaturizantes estén presentes. Esto se debe a que la formación de múltiples enlaces covalentes entre la enzima y el acarreador reduce la flexibilidad conformacional y vibraciones térmicas, previniendo así el desplegamiento y desnaturización de la proteína. Sobre todo, las enzimas covalentemente modificadas deben ser aplicadas en disolventes orgánicos o en reactivos hidrofóbicos puros para evitar la filtración.

Una clara desventaja de la unión covalente es que la enzima es modificada químicamente. Como es de esperarse, la inmovilización no ocurre de manera uniforme para todas las moléculas de enzima en un lote. Sin embargo, la fijación en varios puntos de las enzimas puede ser logrado mediante el enlazamiento estrecho al soporte. Esto no está limitado a enzimas monoméricas, también es aplicable para aquellas que son multiméricas.

Comúnmente, los grupos amino de la enzima son empleados para la inmovilización covalente. Sin embargo, otros grupos funcionales en la superficie de la enzima también puede ser utilizados, incluyendo grupos tiol, ácidos carboxílicos, así como residuos de azúcares. El grupo amino como nucleófilo puede atacar, por ejemplo, a epóxidos o aldehídos en el soporte. En el caso de los aldehídos se da la formación de iminas que pueden ser subsecuentemente reducidas (empleando borohidruro de sodio), asegurando una inmovilización irreversible. Grupos carbodiimida también pueden ser empleados, esencialmente para la formación de un enlace amida con un grupo ácido en el acarreador o viceversa (figura 13).

Como una variación adicional a los grupos mencionados, grupos reactivos en el soporte pueden ser enlazados vía espaciadores cortos o largos a la enzima. Estos grupos espaciadores permiten ampliar la flexibilidad conformacional de la enzima. Esto puede ser una ventaja para enzimas tales como las lipasas, las cuales son conocidas por someterse a cambios conformacionales cuando interactúan con el sustrato. Por otro lado, espaciadores cortos pueden conferir una mayor estabilidad térmica debido a que restringen la movilidad de la enzima, previniendo el desplegamiento<sup>(27)</sup>.



**Figura 13.** Diferentes grupos reactivos presentes en los soportes para inmovilización química. Se muestra el modo en que producen la unión covalente con los grupos amino o ácido de la superficie de la enzima<sup>(27)</sup>.

### *Atrapamiento en geles poliméricos o cápsulas*

La mejor manera de evitar cualquier influencia negativa sobre la estructura de una enzima es atrapándola o encapsulándola. Los métodos de atrapamiento están basados en la oclusión de una enzima entre una red polimérica que permite el paso a través de ella de sustrato y producto, pero retiene a la enzima. Existen diferentes enfoques para el atrapamiento de enzimas, tales como el atrapamiento en gel o fibras y la microencapsulación. El uso práctico de estos métodos está limitado por las limitaciones en transferencia de masa a través de las membranas o geles<sup>(24)</sup>.

### *Entrecruzamiento*

Un caso extremo de la unión covalente es el entrecruzamiento de enzimas, empleando un agente bifuncional tal como el glutaraldehído. En este caso, en lugar de fijar la enzima a un soporte externo, la enzima actúa como su propio soporte<sup>(27)</sup>. Este enfoque tiene claras ventajas: actividad enzimática altamente

concentrada en el catalizador, alta estabilidad y bajos costos de producción debido a la eliminación de un soporte adicional (generalmente costoso), por lo que a partir de finales de los 1960's esta metodología se volvió la más usada industrialmente para la inmovilización de enzimas por las siguientes décadas<sup>(29)</sup>.

### *Cristales enzimáticos entrecruzados (CLECs)*

Los CLECs proporcionan un aumento significativo en la estabilidad a la desnaturalización por calor, disolventes orgánicos y proteólisis, en comparación con las correspondientes enzimas solubles o en polvos liofilizados. Además, los CLECs son enzimas inmovilizadas altamente activas, robustas y de tamaño controlable de partícula, variando entre 1 y 100  $\mu\text{m}$ . Su alta estabilidad operacional y su fácil reciclaje, junto con sus altas actividades catalíticas y productividades volumétricas los hace adecuados para biotransformaciones industriales<sup>(29)</sup>.

### *Agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs)*

Una desventaja inherente de los CLECs es la necesidad de cristalizar a la enzima, lo cual es, a menudo, un procedimiento laborioso que requiere de enzima altamente pura. Sin embargo, se pueden obtener resultados semejantes con la simple precipitación de la enzima de disoluciones acuosas, empleando técnicas estándar, y entrecruzando los resultantes agregados físicos de moléculas de enzima, dando lugar a agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs). La purificación de proteínas por precipitación de disoluciones acuosas, por ejemplo, con sulfato de amonio o polietilenglicol, se usa frecuentemente como método primario para la purificación de proteínas, por lo que la preparación de CLEAs puede integrarse fácilmente dentro del protocolo de purificación, dado que éstos no requieren enzima altamente pura. Esto puede ser usado, por ejemplo, para el aislamiento directo de una enzima, purificada e inmovilizada en una forma adecuada para realizar biotransformaciones de un medio crudo de fermentación<sup>(29)</sup>.

Es bien conocido que la adición de sales, disolventes miscibles con agua o polímeros no iónicos a una disolución acuosa de proteína conduce a la precipitación de esta como agregados, sin perturbación de su estructura terciaria, lo que implica que no hay una desnaturalización. Estos agregados sólidos se mantienen unidos mediante uniones no covalentes, que fácilmente colapsan y se redisuelven cuando son dispersados en agua. El entrecruzamiento de estos agregados físicos produce CLEAs que se mantienen permanentemente insolubles mientras mantienen la superestructura preorganizada de los agregados y, por lo tanto, su actividad catalítica (figura 14)<sup>(5,29)</sup>.

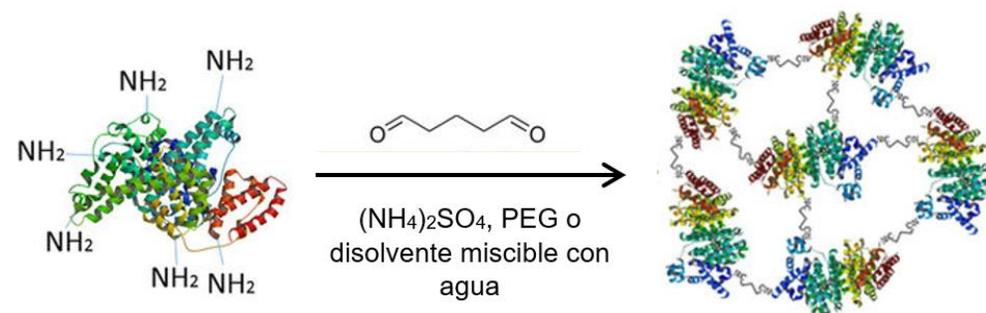


Figura 14. Esquematización del mecanismo general de formación de un CLEA<sup>(30)</sup>.

El glutaraldehído es generalmente el agente de entrecruzamiento de elección, debido a que no es costoso y es fácilmente asequible en cantidades comerciales. Éste se ha usado por décadas para el entrecruzamiento de proteínas. El entrecruzamiento ocurre mediante reacciones de los grupos amino libres de los residuos de lisina, en la superficie de las moléculas de enzima vecinas, con oligómeros o polímeros resultantes de condensaciones aldólicas del glutaraldehído. Esto puede involucrar la formación de bases de Schiff y adiciones de tipo Michael a grupos aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturados formados previamente. El modo en que ocurre el entrecruzamiento es también dependiente del pH de la mezcla<sup>(31)</sup>.

Otros dialdehídos pueden también ser usados como agentes entrecruzantes. Con algunas enzimas, por ejemplo, las nitrilasas, se observa algunas veces una baja o nula retención de la actividad cuando se emplea glutaraldehído como entrecruzante, siendo lo contrario cuando se usa

dextranpolialdehído, seguido de la reducción de las bases de Schiff con borohidruro de sodio para formar enlaces irreversibles de tipo amina<sup>(32)</sup>.

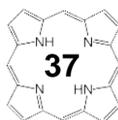
### *Ventajas de los CLEAs*

Los CLEAs tienen varias ventajas tanto económicas como ambientales en el contexto de la biocatálisis industrial. Además de las ya mencionadas previamente, como su estabilidad, bajos costos de producción y actividad enzimática altamente concentrada, también exhiben, generalmente, una mejoría en almacenamiento y una estabilidad operacional aumentada hacia la desnaturalización por calor, disolventes orgánicos y autoproteólisis. Además, este enfoque de inmovilización es aplicable a una amplia variedad de enzimas (lipasas, oxidoreductasas, liasas, etc), por lo que otra ventaja deriva en la posibilidad de co-inmovilizar dos o más enzimas para proporcionar CLEAs capaces de catalizar múltiples biotransformaciones, ya sea de forma independiente o en secuencia como procesos catalíticos en cascada.

Como con todas las enzimas inmovilizadas, uno podría esperar una pérdida en actividad debido a las limitaciones difusionales en un catalizador sólido. Sin embargo, los CLEAs son materiales altamente porosos en los cuales generalmente no se han observado limitaciones difusionales cuando se usan en transformaciones biocatalíticas en síntesis orgánica<sup>(29)</sup>.

### *Aplicaciones de los CLEAs*

Existen una gran cantidad de reportes acerca de enzimas inmovilizadas mediante el enfoque de los CLEAs. Ejemplo de esto es la preparación de CLEAs de las quimiotripsina, papaína y proteasa alcalina de *Bacillus licheniformis*. Esta última es una enzima económica usada en detergentes para ropa. Además, se ha usado ampliamente en síntesis orgánica en la resolución de ésteres de aminoácidos, aminas y en la síntesis de péptidos. Ejemplo de ello es el reportado por Quaedflieg y colaboradores, para la síntesis versátil y altamente selectiva de



ésteres de ácidos carboxílicos de aminoácidos *N*-protegidos y de péptidos usando un CLEA de una alcalasa (figura 15)<sup>(29,33)</sup>.



Figura 15. Esterificación de aminoácido *N*-protegidos con un CLEA de alcalasa<sup>(33)</sup>.

Quizás un ejemplo más preciso acerca de las ventajas de los CLEAs es el que se observó con la Penicilina G amidasa, una enzima de alto interés industrial, empleada en la síntesis de penicilinas y cefalosporinas semisintéticas. La enzima libre tiene una estabilidad térmica limitada, así como una baja tolerancia a disolventes orgánicos, mientras que el CLEA de la misma, preparado por precipitación con *t*-BuOH y entrecruzamiento con glutaraldehído, probó ser un catalizador efectivo para la síntesis de ampicilina, teniendo inclusive una productividad más alta que la de la enzima libre (figura 16)<sup>(29,34)</sup>.

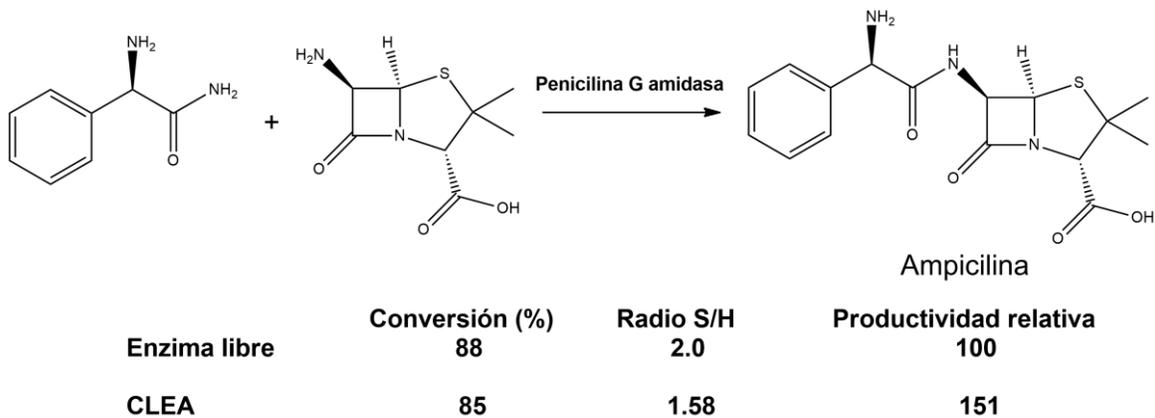


Figura 16. Síntesis de ampicilina empleando un CLEA de Penicilina G amidasa. Radio S/H= Radio de síntesis/hidrólisis. Modificada de Sheldon, 2007<sup>(29)</sup>.

*CLEMPAs (Agregados enzimáticos entrecruzados en partículas magnéticas)*

Dentro de los varios enfoques que se ha dado a los CLEAs, se puede destacar su formación en partículas magnéticas, conocidos como CLEMPAs. Este tipo de partículas facilitan la recuperación del catalizador, debido a que sólo se necesita de la aplicación de un campo magnético para conseguir esto. Tudorache y colaboradores inmovilizaron la lipasa de *Aspergillus niger* y encontraron como mejor agente precipitante al dimetilcarbonato y, mientras que como agente entrecruzante emplearon glutaraldehído, además de haber adicionado partículas magnéticas que formaron parte del biocatalizador (figura 17).

Mediante este diseño de CLEMPAs, se mejoró el comportamiento catalítico del biocatalizador en comparación con la partícula unida únicamente a partículas magnéticas. Además, el biocatalizador se usó exitosamente en 20 ciclos de reacción sin una pérdida significativa de la actividad catalítica<sup>(35)</sup>.

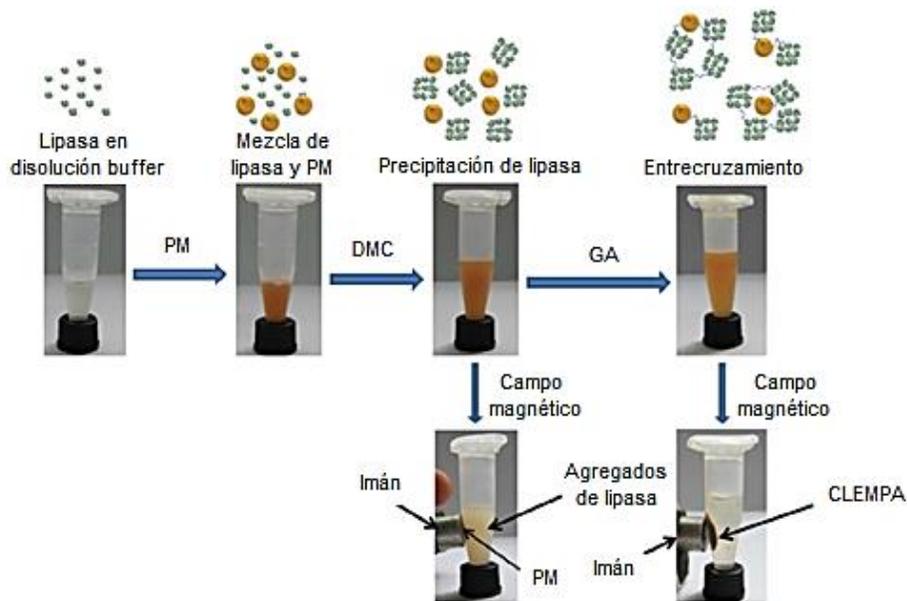


Figura 17. Esquema de preparación de un biocatalizador CLEMPA. PM= Partícula magnética, DMC= Dimetilcarbonato y GA= Glutaraldehído. Modificado de Tudorache, 2013<sup>(35)</sup>.

### Combi-CLEAs

Los procedimientos de conversión catalítica en cascada sin recuperación de productos intermedios son considerados importantes metodologías para la reducción de la huella ambiental de la síntesis orgánica. Bajo este enfoque, la síntesis industrial enzimática de ácidos 2-hidroxicarboxílicos enantioméricamente puros representa un interesante ejemplo. Chmura y colaboradores combinaron los procesos enzimáticos de hidrocianación e hidrólisis de nitrilos en una vía enzimática en cascada, mediante el enfoque de las Combi-CLEAs, para la obtención de ácido (S)-mandélico enantioméricamente puro. Para ello, ocuparon una hidroxinitrilo liasa (S) selectiva y una nitrilasa no selectiva que pudiera operar en valores de pH ligeramente ácidos, inmovilizando a ambas con sulfato de amonio como agente precipitante y con dextranpolialdehído como agente entrecruzante (figura 18)<sup>(36)</sup>.

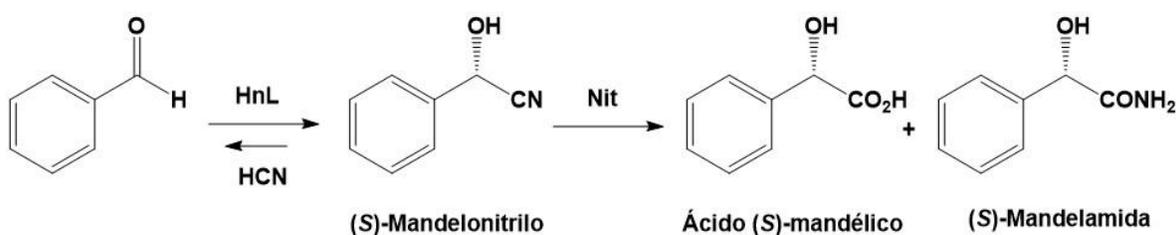


Figura 18. Proceso bioenzimático para la síntesis de ácido (S)-mandélico, empleando una hidroxinitrilo liasa (S) específica y una nitrilasa no específica en conjunto<sup>(36)</sup>.

### Dextrano

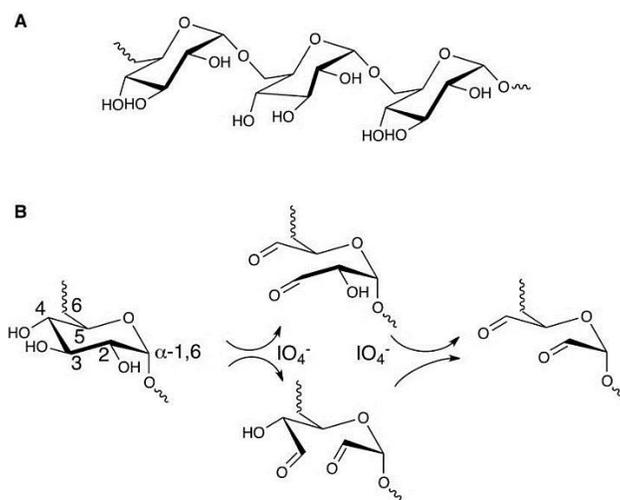
El dextrano es un polisacárido bacteriano que consiste esencialmente en residuos de *D*-glucopiranososa enlazados por enlaces  $\alpha$ -1,6 glucosídicos, con un pequeño porcentaje de residuos enlazados por enlaces  $\alpha$ -1,2,  $\alpha$ -1,3 y  $\alpha$ -1,4 como cadenas laterales. Además, es ampliamente usado para aplicaciones biomédicas debido a su biocompatibilidad, baja toxicidad, relativo bajo costo y facilidad de modificabilidad. Este polisacárido ha sido usado clínicamente por más de cinco

décadas como un expansor de volumen de plasma, potenciador de flujo periférico, agente antitrombótico, etc.

El dextrano es altamente soluble en agua y muy estable bajo condiciones suaves de acidez y basicidad. Éste contiene una gran cantidad de grupos hidroxilo que lo hacen adecuado para una derivatización y un subsecuente entrecruzamiento químico o físico<sup>(37)</sup>.

### *Modificación química de dextrano por oxidación. Obtención de dextranpolialdehído (DPA)*

La alta densidad de grupos hidroxilos en el dextrano hace posible diferentes tipos de modificaciones químicas del mismo. Dentro de las más importantes se encuentra su oxidación con iones peryodato, la cual es una reacción acuosa libre de catalizador que brinda un producto purificable mediante un simple paso de diálisis. Los residuos de glucosa del dextrano tienen dioles vecinales, presentando dos diferentes enlaces que se pueden oxidar, en el mismo residuo. La oxidación de cualquiera de esos residuos produce un aldehído en C<sub>3</sub>, que es susceptible a una segunda oxidación debido a la presencia de grupos hidroxilos en C<sub>2</sub> o C<sub>4</sub> (figura 19)<sup>(37)</sup>.



**Figura 19. Estructura y reacción de oxidación del dextrano. A)** Estructura química del dextrano, **B)** Reacción de oxidación del dextrano con peryodato de sodio<sup>(37)</sup>.

*Dextranpolialdehído como agente entrecruzante*

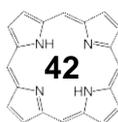
Como se mencionó anteriormente, el glutaraldehído es comúnmente el agente entrecruzante de elección para la preparación de CLEAs de una amplia variedad de enzimas. Sin embargo, no siempre se obtienen enzimas activas cuando se ocupa éste, resultando en una pérdida total de la actividad, debido, posiblemente, a una reacción del agente entrecruzante con los residuos que son cruciales para la actividad enzimática, como se ha observado con nitrilasas y alcohol deshidrogenasas. Además, con entrecruzantes tales como el glutaraldehído, esta inactivación es particularmente severa debido a la alta reactividad y pequeño tamaño de éste, permitiendo que su entrada al sitio activo de la proteína, dando acceso a todos los aminoácidos esenciales para la actividad catalítica. Por ello, se han empleado polialdehídos más voluminosos como agentes entrecruzantes, entre ellos el DPA, con la finalidad de evitar la pérdida total de actividad, obteniendo resultados positivos. Para evaluar el efecto del DPA como agente entrecruzante, Mateo y colaboradores inmovilizaron varias enzimas, empleando glutaraldehído y dextranpolialdehído, y compararon la actividad recuperada con ambos (cuadro 4)<sup>(32)</sup>.

Enzima	Actividad recuperada (%) <sup>a</sup>	
	Glutaraldehído	Dextranpolialdehído
Hidroxinitrilo liasa ( <i>P. amygdalus</i> )	10	10
Nitrilasa ( <i>P. fluorescens</i> )	0	50
Nitrilasa (BioCatalytics 1004)	0	60
Alcohol deshidrogenasa ( <i>L. brevis</i> )	0	7-10
Penicilina G acilasa ( <i>E. coli</i> )	48	85-90

<sup>a</sup>Con respecto a la enzima nativa

**Cuadro 4. Efecto del agente entrecruzante en la actividad recuperada de los CLEAs<sup>(32)</sup>.**

Los resultados fueron en general mucho más altos para las enzimas inmovilizadas con DPA que los obtenidos con glutaraldehído como entrecruzante. Éstos se atribuyen a las amplias dimensiones del DPA, que evitan la posible reacción con los residuos de aminoácidos catalíticamente relevantes<sup>(32)</sup>.



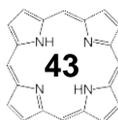
## Antecedentes

En el Laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de Proteínas (LFQIP), de la Facultad de Medicina, UNAM, se clonó, sobreexpresó y purificó la nitrilasa de *Rhodococcus* sp V51B. Esta enzima es estable y soluble en una concentración 200 mM de cloruro de sodio, mientras que, a menor fuerza iónica, tiende a formar agregados insolubles. La característica más importante de esta nitrilasa es que presenta actividad tanto para benzonitrilo, nitrilo aromático, como para valeronitrilo, nitrilo alifático, lo que la hace una enzima con gran potencial biocatalítico, debido a que la cantidad de nitrilasas que son capaces de hidrolizar ambos tipos de nitrilos son escasas<sup>(38,39)</sup>.

Con la finalidad de obtener y estudiar estructuras helicoidales en forma de espirales a partir de la nitrilasa recombinante de *R. sp* V51B, se generaron varias enzimas mutantes con el extremo C-terminal truncado en varias posiciones, entre ellas la posición  $\Delta$ 328, acortando la secuencia en 39 aminoácidos. Esta mutante se diseñó considerando el sitio de autoproteólisis reportado para la nitrilasa de *R. rhodochrous* J1, con la cual se comparte un 92% de identidad<sup>(14)</sup>.

Al comparar la actividad de la enzima silvestre y la mutante  $\Delta$ C328, se observó que ambas enzimas son capaces de transformar ambos sustratos en una relación 3:1, mostrando preferencia por el benzonitrilo. Sin embargo, la actividad de la mutante con respecto a la de la silvestre es diez veces mayor (figura 20).

Por análisis de dispersión dinámica de luz (DLS), bajo las mismas condiciones de pH, fuerza iónica y concentración de proteína, se determinó el tamaño para cada enzima, encontrando que la nitrilasa silvestre tienen un diámetro de entre 16-19 nm, correspondiente con un oligómero de 12 a 14 subunidades. El diámetro promedio de la mutante  $\Delta$ 328 fue de 170 nm. Por microscopía electrónica de transmisión y tinción negativa se observó que la mutante  $\Delta$ 328 se ensambla en filamentos helicoidales homogéneos con un diámetro de 11 nm, pero de longitud variable entre los 50 y 400 nm (figura 21).



Mediante ensayos de desnaturalización térmica, se determinó que la enzima mutante  $\Delta 328$  presenta una temperatura de fusión ( $T_m$ ) aparente de 70.9 °C, mientras que la de la enzima silvestre es de 65.4 °C<sup>(39)</sup>.

Finalmente, la mutante  $\Delta 328$  mantiene su actividad en concentraciones bajas de disolventes, tales como metanol, isopropanol y *n*-propanol, siendo esta una propiedad deseable debido a la baja solubilidad de algunos sustratos en medios completamente acuosos.

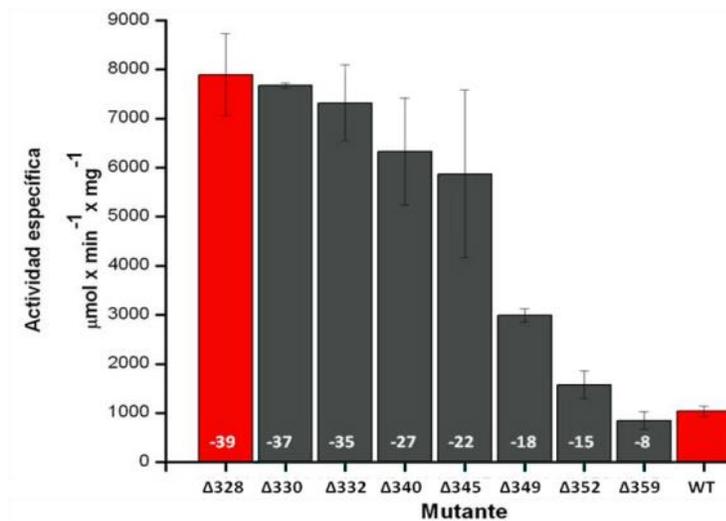


Figura 20. Comparación de las actividades específicas para las diferentes mutantes por delección en el C-terminal. Se resaltan en rojo a la mutante  $\Delta 328$  (izquierda) y a la enzima silvestre (derecha)<sup>(39)</sup>.

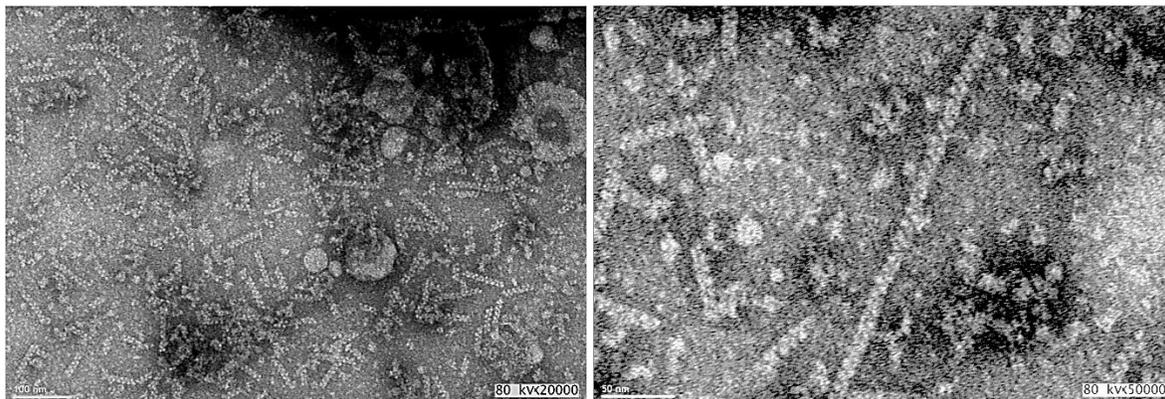


Figura 21. Micrografías obtenidas por microscopía electrónica de transmisión de nitrilasa mutante Nit $\Delta C328$ . Se observa la formación de filamentos helicoidales de longitud variable.

## Planteamiento del problema

La biocatálisis es considerada como el corazón de la industria biotecnológica, siendo una solución para la química verde debido a su excelente eficiencia catalítica y sus características benignas para el ambiente, empleando a las enzimas como maquinarias moleculares para llevar a cabo las transformaciones de interés.

Las nitrilasas constituyen enzimas de gran valor biotecnológico por su quimio-, regio- y enantioselectividad para la producción de ácidos carboxílicos de gran interés industrial. Sin embargo, la mayoría de las nitrilasas muestran una baja estabilidad y rápidamente se vuelven inactivas en condiciones agresivas, limitando sus aplicaciones industriales en la biocatálisis de nitrilos por la falta de robustez.

Por otra parte, la inmovilización enzimática es considerada a menudo como la clave para la optimización del desempeño operacional de una enzima en un proceso dado, ya que frecuentemente se consigue mejorar sus propiedades tales como estabilidad química y térmica, e incluso aumentar su actividad enzimática.

La nitrilasa mutante Nit $\Delta$ C328 de *Rhodococcus* sp V51B constituye un modelo interesante y adecuado de estudio para la inmovilización química debido a sus grandes propiedades biocatalíticas, tales como su aumentada actividad enzimática, considerable estabilidad térmica, tolerancia a disolventes en bajas proporciones y actividad hacia sustratos de naturaleza tanto alifática como aromática.

Por lo tanto, y en función de lo mencionado previamente, la inmovilización química, por medio de CLEAs, de la Nit $\Delta$ C328 de *R. sp V51B* proporcionará una mejoría en las propiedades biocatalíticas de esta enzima.

## Objetivos

### *Objetivo general*

- Caracterizar la actividad enzimática de filamentos catalíticos inmovilizados de la nitrilasa Nit $\Delta$ C328 de *Rhodococcus* sp V51B.

### *Objetivos particulares*

- Sobreexpresar la mutante Nit $\Delta$ C328 de *R. sp* V51B.
- Purificar la mutante Nit $\Delta$ C328 de *R. sp* V51B.
- Determinar la actividad enzimática de la mutante.
- Definir las condiciones de inmovilización óptimas para los filamentos enzimáticos.
- Determinar la reusabilidad de la enzima inmovilizada.
- Evaluar la estabilidad en almacenamiento de la enzima inmovilizada.
- Evaluar la actividad y estabilidad térmica de los entrecruzados.
- Caracterizar la actividad enzimática de los entrecruzados en diferentes valores de pH.
- Determinar la actividad enzimática de los entrecruzados en diferentes mezclas binarias agua - disolvente.
- Caracterizar la especificidad y selectividad de los entrecruzados por sustratos de diferente naturaleza.
- Determinar los parámetros cinéticos ( $K_M$  y  $V_{m\acute{a}x}$ ) de la enzima inmovilizada.

## **Hipótesis**

La inmovilización química de la nitrilasa mutante Nit $\Delta$ C328 de *Rhodococcus* sp V51B, por formación de CLEAs, mejorará las propiedades biocatalíticas de ésta, aumentando su robustez y desempeño operacional, haciéndola una herramienta útil en la obtención de ácidos carboxílicos de interés industrial.

## **Materiales**

### **Equipos**

- Agitador para microtubos Thermomixer® Comfort (Eppendorf)
- Autoclave Hirayama (Amerex Instruments)
- Baño termostatzado SWB25 (Thermo Scientific™)
- Bomba de vacío RZ 6 (Vacuubrand)
- Cámaras para electroforesis Amersham™ (GE Healthcare Life Sciences®)
- Centrífuga para microtubos 5424 R (Eppendorf)
- Centrífuga Sorvall RC 6+ (Thermo Scientific™)
- Concentrador por vacío Speed Vac SC110 (Savant™)
- Estufa
- Fuente de poder para electroforesis PS500XT (Hoefer®)
- Incubadora orbital INO-650 M (Prendo)
- Incubadora microbiológica
- Parrillas de agitación PC-410D (Corning®)
- Procesador ultrasónico de 500w Cole-Parmer®
- Recirculador de anticongelante
- Reostato
- Rotor Fiberlite F21-8x50y (Thermo Scientific™)
- Rotor SLA-3000 (Thermo Scientific™)
- Sonicador para degasado Bransonic® 2510 (Branson)
- Trampa de condensación refrigerada RT400 (Savant™)

### **Instrumentos**

- Balanza analítica BP221S (Sartorius)
- Balanza de dos platillos Harvard Trip® (OHAUS®)
- CLAR preparativo Waters 600S/2487/623 (Waters)
- CLAR analítico Alliance® e2695/2489/2414 (Waters)
- Columna de exclusión molecular Sephacryl™ S-300 55x3.5cm (GE Healthcare Life Sciences®)
- Columna de fase reversa Symmetry® C18 3.5µm – 4.6x75mm (Waters)
- Espectrofotómetro UV-Visible de doble haz Libra S60 (Biochrom)

## **Materiales**

- Lector de microplacas POLARstar Omega (BMG Labtech)
- Micropipetas de 10, 20, 100, 200  $\mu$ L y 1 y 5 mL (Eppendorf)
- Termómetro
- Potenciómetro pH 700 (Oakton®)
- Filtros de membrana Durapore® - HV con poro de 0.45  $\mu$ m (Merck)
- Filtros para jeringa Afrodisc® CR con poro de 0.2  $\mu$ m (Pall® Life Sciences)
- Filtros para jeringa Millex® - HV con poro de 0.45  $\mu$ m (Merck)

### **Material biológico**

- Células de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS
- Gen de Nit $\Delta$ C328 de *Rhodococcus* sp V51B
- Geles de poliacrilamida al 12%
- Gradillas
- Jeringas desechables
- Matraces aforados de 5, 10 y 25 mL
- Matraces Erlenmeyer con baffles de 2L

### **Medios de cultivo**

- Medio LB sólido
- Medio LB líquido
- Medio SOC
- Matraces Erlenmeyer de 100 y 250 mL
- Matraces Kitazato de 100, 250, 500 mL y 1L
- Membranas de diálisis con MWCO de 12,000 (Sigma-Aldrich®)

### **Material general**

- Barras magnéticas de agitación.
- Botellas de vidrio con tapa de 100, 250 y 500 mL
- Celdas de plástico y de cuarzo para espectrofotómetro
- Embudos Büchner
- Equipo para microdestilación
- Espátulas de acero inoxidable
- Papel filtro
- Pipetas de transferencia
- Placa de 96 pozos
- Placas de Petri desechables
- Probetas de 15, 100, 250, 500 mL y 1 y 5 L.
- Puntas para micropipeta
- Sistema de filtración de vacío (Millipore)
- Tubos de ensayo
- Tubos Eppendorf de 0.5 y 1.5 mL



- Tubos Falcon de 15 y 50 mL
- Vasos de precipitados de 50, 100, 250, 500 mL y 1 y 2 L.
- Albúmina sérica bovina (BSA)
- Antranilonitrilo
- Benzamida
- Benzonitrilo
- Buffer de carga 4x para electroforesis

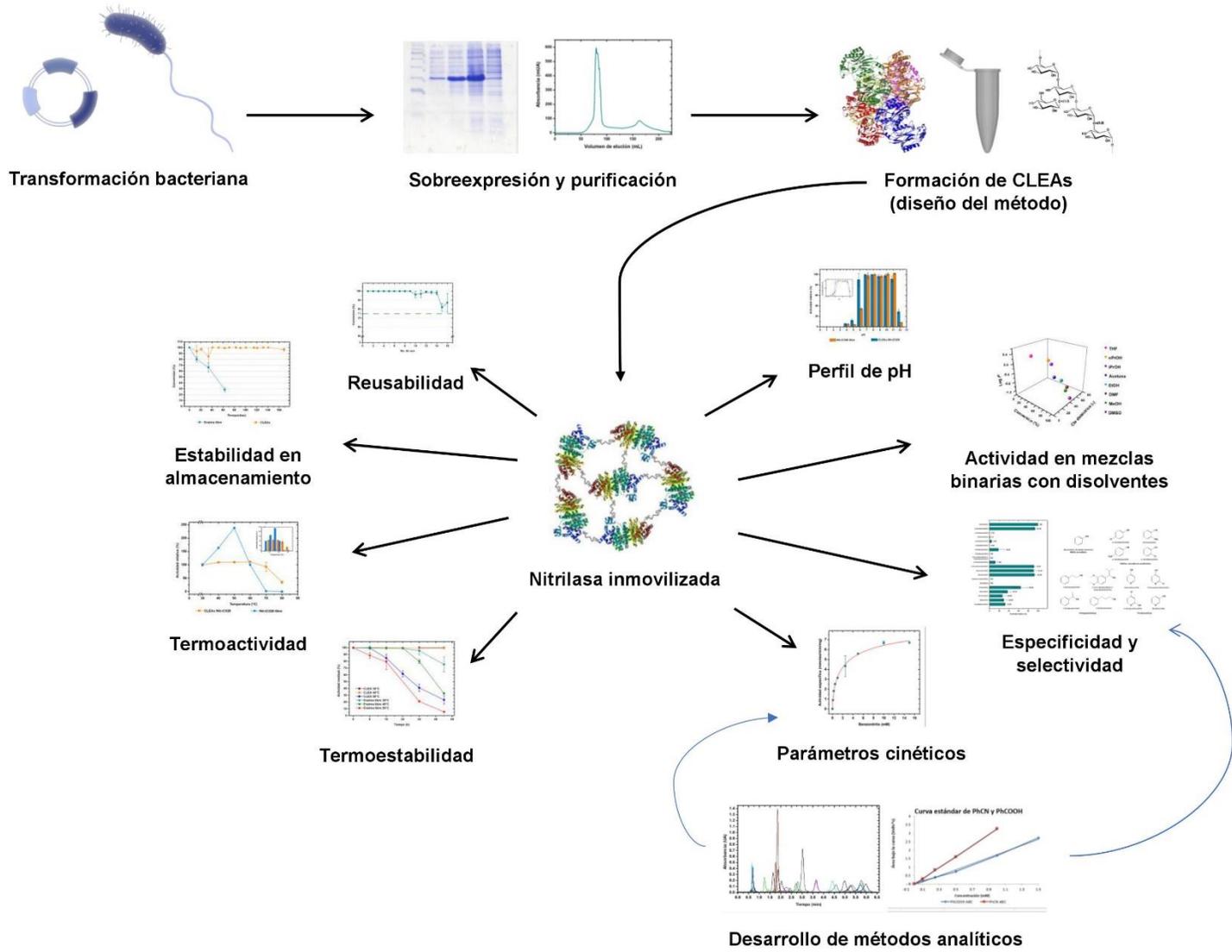
**Reactivos**

- 1,2-dimetoxietano
- 2-(3,4-dimetoxifenil)-2-isopropilacetronitrilo
- 2-cloroisonicotinonitrilo
- 2-fenilpropionitrilo
- 2-mercaptoetanol
- 2-metilglutaronitrilo
- 3-fenilpropionitrilo
- 4-cloropicolinonitrilo
- 4-fenilbutironitrilo
- Acetona
- Acetonitrilo
- Ácido 2-metilglutárico
- Ácido antranílico
- Ácido benzoico
- Ácido bicinconánico
- Ácido cítrico
- Ácido clorhídrico
- Ácido nicotínico
- Ácido *p*-nitrobenzoico
- Ácido propiónico
- Ácido succínico
- Acrilonitrilo
- Adiponitrilo
- Agua destilada y desionizada
- Buffer para sonicación
- Carbón activado
- CAPS
- CAPSO
- Cloranfenicol
- Cloruro de amonio
- Cloruro de potasio
- Cloruro de sodio
- Crotononitrilo
- Dextranos con PM de 150, 67.3 y 10 kDa
- Disolución desteñidora de geles de electroforesis
- Disolución LAEMLI para electroforesis
- Disolución teñidora de geles de electroforesis
- DMF
- DMSO
- EDTA disódico
- Etanol
- Fosfato de potasio dibásico
- Fosfato de potasio monobásico
- Hidróxido de potasio
- IPTG



- Isonicotinonitrilo
- Isopropanol
- Kanamicina
- Kit *Spectroquant*<sup>®</sup> para cuantificación de amonio (Merck)
- Laurilsulfato de sodio
- Metanol
- Nicotinonitrilo
- n-propanol
- o-clorobenzonitrilo
- o-ftaldialdehído
- p-clorobenzonitrilo
- p-nitrobenzonitrilo
- PEG con PM de 35 kDa
- Peryodato de potasio
- PMSF
- Propionitrilo
- Succinonitrilo
- Sulfato de amonio
- Sulfato de cobre
- THF
- Tris-base
- Valeronitrilo

**Esquema general de trabajo**



**Esquema general de trabajo**

## Métodos

### 1. Preparación de disoluciones, medios de cultivo y reactivos

#### a. Preparación de medios de cultivo

Se prepararon medios de cultivo LB sólidos y líquidos, esterilizándolos a 121 °C por 20 min en autoclave. Los medios sólidos, una vez que se encontraron a una temperatura adecuada, se suplementaron con kanamicina y cloranfenicol a concentraciones finales de 30 µg/mL y 34 µg/mL, respectivamente, mientras que a los medios líquidos se les adicionó únicamente kanamicina y hasta el momento previo de su uso, a la misma concentración.

#### b. Preparación de disoluciones buffer para elución, diálisis, ensayos de actividad y cuantificación por CLAR

Las disoluciones buffer empleadas para la purificación de la proteína por exclusión molecular, diálisis, ensayos de actividad y cuantificación constaron de lo siguiente:

- *Buffer para elución:*  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10 mM, NaCl 200 mM, EDTA 1mM y 2-mercaptoetanol 14.25 mM, pH final= 7. La disolución se filtró y desgasificó por vacío.
- *Buffer para diálisis:*  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  100 mM y KCl 100 mM, pH final= 7.8.
- *Buffer para actividad:*  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  100 mM, pH final= 7.8.
- *Buffer para cuantificación por CLAR:*  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM, pH final= 2.9. La disolución se filtró y se desgasificó por sonicación.

#### c. Oxidación de dextranos como agentes entrecruzantes

En un vaso de precipitados de 10 mL se colocaron 165 mg de dextrano, 372 mg de metaperyodato de potasio y se disolvieron en 5 mL de agua. Se mantuvieron con agitación por 90 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se



trasladaron a una membrana de diálisis y se dializaron en 4L de agua por 24 h, cambiando el agua 5 veces.

## **2. Transformación de células bacterianas competentes**

Células de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS quimiocompetentes fueron transformadas con el vector pET-24a(+), el cual tenía integrado al gen de la nitrilasa Nit $\Delta$ C328 de *R.sp* V51B, mediante la técnica de choque térmico. Para ello, 50  $\mu$ L de las células fueron mezclados con 2  $\mu$ L del ADN, se calentaron en un baño de agua a 42 °C por 45 s y después se colocaron 2 min en hielo, agregando finalmente 1 mL de medio SOC líquido e incubando las células por 45 min a 37 °C y 200 rpm. Se tomaron 400  $\mu$ L del medio y se sembraron en una placa con medio LB-kanamicina-cloranfenicol, incubándola por 12 h a 37 °C.

## **3. Sobreexpresión de la nitrilasa**

Para la inducción y sobreexpresión de la proteína, un tubo con 10 mL de medio LB-kanamicina se inoculó con una colonia fresca de las células de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS transformadas, incubándolos por 12 h a 37 °C y 200 rpm. Con este tubo se inoculó 1L de medio líquido LB-kanamicina, el cual se dejó en agitación a 200 rpm y a 37 °C hasta que las células alcanzaron una DO<sub>600</sub>  $\approx$  0.6-0.8. Posteriormente, se promovió la sobreexpresión de la proteína con la adición de IPTG a una concentración final de 0.4mM, incubando a 22 °C y 200 rpm por 8 h.

Pasado este tiempo, se centrifugó el cultivo por 20 min a 6,000 rpm y 4 °C y se desechó el sobrenadante y se conservó el pellet celular, el cual se resuspendió en 40 mL de buffer de lisis, suplementado con 40  $\mu$ L de PMSF al 8.7% en DMSO. La ruptura de las células se llevó a cabo por sonicación en frío con un procesador ultrasónico (15 ciclos de pulsos de 45 s con una amplitud del 45% e intervalos de



descanso de 2 minutos entre cada uno). El extracto total se centrifugó por 20 min a 15,000 rpm y 4 °C.

#### **4. Purificación de la nitrilasa**

##### *a. Precipitación con sulfato de amonio*

Se midió el sobrenadante obtenido de la centrifugación del lisado celular y se saturó al 20% de sulfato de amonio pulverizado (114 g/L), para dejar precipitando la proteína por al menos dos días a 4 °C.

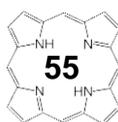
##### *b. Cromatografía de exclusión molecular*

El precipitado obtenido de la precipitación con sulfato de amonio se resuspendió y se centrifugó por 20 min a 15,000 rpm y 4 °C. Se desechó el sobrenadante y la pastilla obtenida se resuspendió en 2 mL de buffer de elución y se filtró con un filtro de 0.45 µm de tamaño de poro. El solubilizado se inyectó en un cromatógrafo Waters, llevando a cabo la separación en una columna Sephacryl™ S-300, equilibrada previamente con el buffer de elución. Todo el proceso se realizó a un flujo de 0.5 mL/min y con una detección a 280 nm.

Se analizaron por SDS-PAGE las fracciones que contenían a la proteína, de acuerdo con el cromatograma obtenido previamente y se colectaron las de mayor pureza y concentración.

##### *c. Concentración con PEG*

Las fracciones colectadas se introdujeron en una membrana de diálisis y se concentraron con PEG a 4 °C, hasta que comenzó a notarse agregación de la proteína, para posteriormente retirar la membrana del PEG y enjuagarla con agua para remover éste.



#### d. Diálisis

Se introdujo la membrana de diálisis con la proteína en un 1L de buffer de diálisis y se dializó por 24 h a 4 °C con un cambio del buffer.

### 5. Cuantificación de la proteína

La cuantificación de la proteína se llevó a cabo por el método del ácido bicinconínico<sup>(40)</sup>. La sal sódica de este ácido es capaz de formar un complejo morado intenso con iones  $\text{Cu}^+$  en un medio alcalino, que absorbe a 562 nm (figura 22). Los iones  $\text{Cu}^+$  son producidos por la reacción entre la proteína y  $\text{Cu}^{2+}$  alcalino (reacción de Biuret). Se construyó una curva de calibración de los 4  $\mu\text{g/mL}$  a los 40  $\mu\text{g/mL}$ , empleando albúmina sérica bovina (BSA) como estándar de referencia para la posterior cuantificación de la nitrilasa. Para la desnaturalización de la proteína de referencia y la obtenida de la purificación se utilizó SDS al 10%.

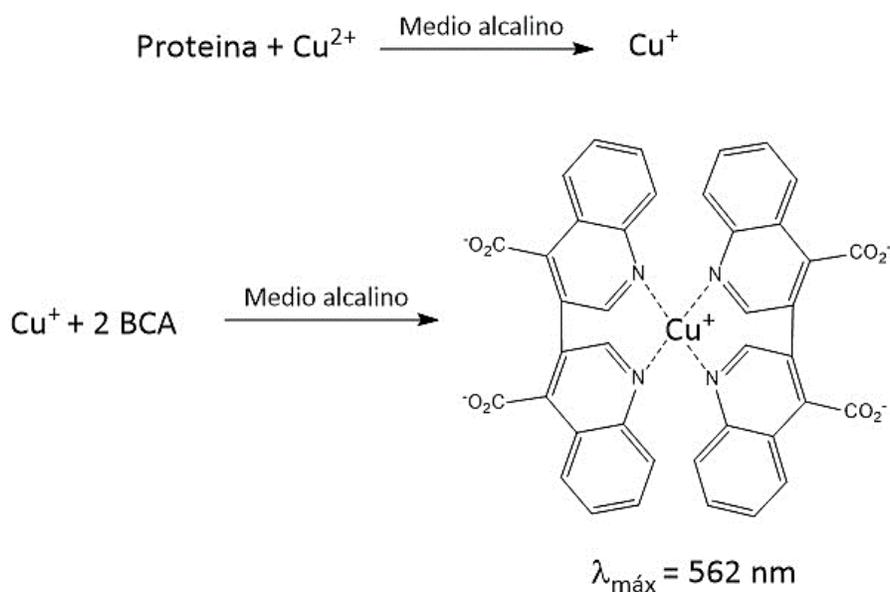
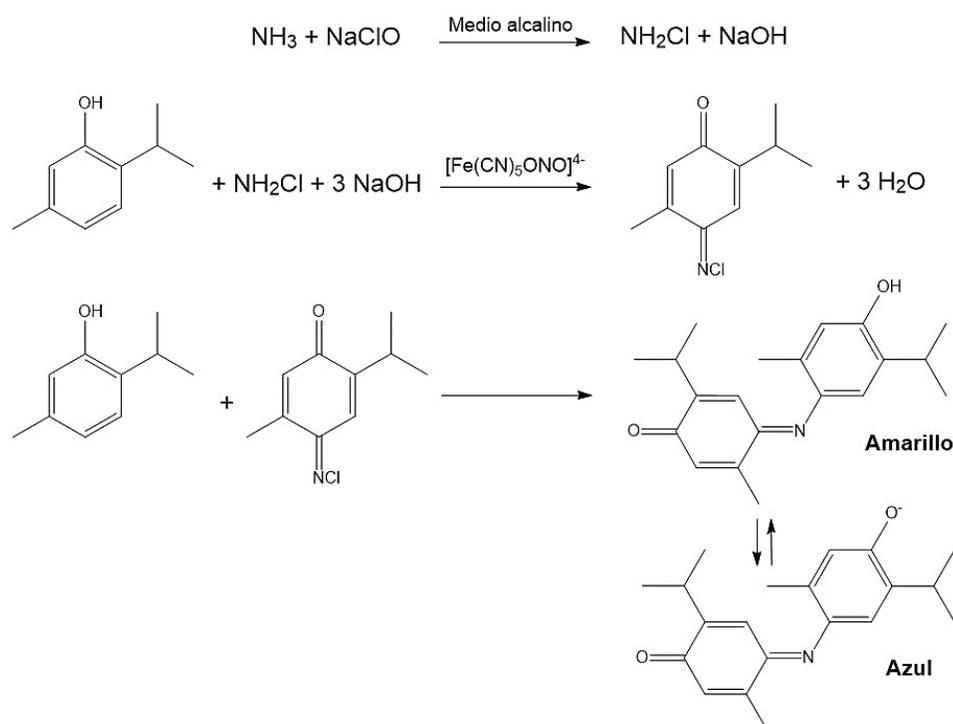


Figura 22. Formación del complejo morado entre el BCA y el ion cuproso generado de la reacción de Biuret. Modificado de Smith, 1985<sup>(40)</sup>.

## 6. Determinación de actividad enzimática

La determinación de la actividad enzimática se llevó a cabo con 5  $\mu\text{g}$  de enzima y se empleó benzonitrilo como sustrato estándar, a una concentración final de 1 mM en 1 mL de buffer de actividad, durante 10 min a 30 °C. Para finalizar la reacción, se adicionó 0.1 mL de HCl 2N y se cuantificó el amonio liberado con el kit *Spectroquant*<sup>®</sup>, el cual se basa en la reacción de cloración del amoniaco, para la formación de monocloramina, que en medio fuertemente básico reacciona con timol, produciendo un derivado de azul de indofenol que se puede medir a 690 nm (figura 23)<sup>(41)</sup>.



**Figura 23. Formación del derivado indofenólico a partir de amoniaco, hipoclorito, nitroprusiato y timol.**  
Modificado de Afkhami, 2008<sup>(42)</sup>.

## 7. Entrecruzamiento de la proteína (formación de CLEAs)

Con la finalidad de determinar las mejores condiciones de entrecruzamiento, se evaluaron los factores que pudieran repercutir en la efectividad de esta, tales como: 1) tamaño del agente entrecruzante, 2) relación

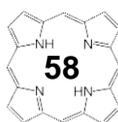


enzima/entrecruzante y 3) tipo de agente precipitante y concentración. Las metodologías que sirvieron como referencia fueron las reportadas por Mateo<sup>(32)</sup> y Kaul<sup>(43)</sup>, y se definió en lo general la siguiente metodología: se pusieron en tubos Eppendorf de 1.5 mL cantidades variables de proteína, DPA y agentes precipitantes (1,2-DME, *i*PrOH, *n*PrOH y (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Estas mezclas se agitaron a 750 rpm y 4 °C en un equipo de agitación Thermomixer® de 16 a 22 horas. Posteriormente, se centrifugaron los tubos a 15,000 rpm por 15 min y 4 °C, se desechó el sobrenadante y el pellet obtenido se resuspendió con un 1 mL de NaBH<sub>4</sub> 1 mg/mL, incubándolo con agitación bajo las mismas condiciones por una hora. Una vez concluida la reducción, se centrifugaron los tubos en las condiciones mencionadas, se lavaron dos veces con agua destilada, centrifugando por 10 min entre cada lavado, y se secaron en un concentrador por vacío SpeedVac™, almacenándolas en refrigeración hasta su uso.

**Nota:** El 1,2-dimetoxietano se trató previamente con borohidruro de sodio y se destiló, con la finalidad de remover impurezas (peróxidos) presentes comúnmente en este disolvente, las cuales pudieran tener un efecto negativo en la enzima durante el proceso de inmovilización.

### 8. Método general para caracterización de actividad enzimática de los CLEAs

Para la caracterización de la actividad enzimática de la nitrilasa inmovilizada, se realizaron los ensayos por triplicado para cada condición con el siguiente método: se resuspendieron los CLEAs en 990 µL de buffer de actividad y se colocaron en agitación en un Thermomixer® a 750 rpm y 30 °C, dejando que se atemperaran por 3 min, para posteriormente agregar 10 µL de benzonitrilo, a una concentración stock de 100 mM, y obtener una concentración final de 1 mM en la mezcla de reacción. Se incubó la reacción por 30 min. Pasado este tiempo, se colocaron en hielo los CLEAs y se centrifugaron por 10 min a 15,000 rpm y 4 °C, se tomaron 500 µL de la mezcla de reacción y se mezclaron con 100 µL de HCl 2N en un tubo eppendorf separado.



## 9. Caracterización de actividad enzimática de los CLEAs

### a. Reusabilidad

Se siguió el método general, se lavaron los CLEAs con agua destilada, se centrifugaron por 10 min a 14,000 rpm y 4 °C y se secaron al vacío entre cada ciclo. Este parámetro fue de utilidad en la determinación de la estabilidad operacional de los CLEAs.

### b. Estabilidad en almacenamiento

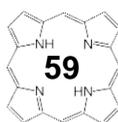
Esta característica se monitoreó por un periodo aproximado de 5 meses, en que se evaluó la actividad enzimática de los CLEAs de un mismo lote cada diez días, de acuerdo con el método general. El objetivo fue evaluar cómo se mantiene la actividad de los CLEAs en función del tiempo durante un almacenamiento en condiciones óptimas.

### c. Termoestabilidad

Se calentaron CLEAs a temperaturas de 30, 40 y 50 °C por periodos desde 8 hasta 48 h. Después de estos tiempos se llevaron a temperatura estándar del método general para medir la actividad tras el calentamiento. La finalidad de esta prueba fue evaluar la capacidad de la enzima de mantener su actividad tras un periodo de calentamiento.

### d. Termoactividad

Se calentaron por 10 min los CLEAs en un rango de temperaturas que fue de los 30 a los 80 °C, de acuerdo con el método general en esas condiciones de temperatura. El objetivo fue evaluar la activación térmica de los CLEAs, así como su estabilidad en estas temperaturas mientras catalizan la reacción.



*e. Actividad en mezclas binarias con disolventes*

Se prepararon mezclas binarias del buffer de actividad con MeOH, EtOH, iPrOH, nPrOH, DMSO, DMF, Acetona y THF en proporciones del 10 al 50%, para evaluar la actividad de los CLEAs en estos medios. Con este parámetro se evaluó la tolerancia de la enzima inmovilizada a disolventes.

**Nota:** El THF se trató previamente con borohidruro de sodio y se destiló para evitar efectos en la actividad enzimática por parte de impurezas oxidantes (peróxidos) comunes en este disolvente.

*f. Actividad en diferentes valores de pH*

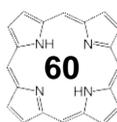
Se prepararon disoluciones buffer con valores de pH entre 4 y 12 para evaluar la actividad de la enzima inmovilizada en dichos medios. Los amortiguadores y valores de pH en que se ocuparon éstos se muestran en el cuadro 5.

Valor(es) de pH	Amortiguador
4,5 y 5.5	Ácido cítrico (C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> )
6, 7 y 8	Fosfato monobásico de potasio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )
9	TRIS (C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> )
10	CAPS (C <sub>9</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>3</sub> S)
11 y 12	Fosfato monobásico de potasio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )

**Cuadro 5. Amortiguadores empleados en cada valor de pH para evaluar la actividad en dichos medios.**  
Todos se manejaron a concentraciones de 50 mM.

*g. Especificidad y selectividad*

Se probaron nitrilos de diferente naturaleza (aromáticos, heterocíclicos, alifáticos, dinitrilos, etc), disueltos en las mezclas adecuadas de buffer de



actividad-disolvente y se evaluó la conversión del sustrato en periodos de 10 min, de acuerdo con el método general.

La cuantificación, ya sea por CLAR o por fluorometría, dependió de las características de cada nitrilo.

*h. Determinación de parámetros cinéticos  $K_M$  y  $V_{máx}$*

Dado que la agregación e inmovilización de la enzima constituye un proceso desordenado, los CLEAs de un mismo lote presentan pequeñas diferencias que repercuten en los valores individuales obtenidos de sus parámetros cinéticos. Por tal motivo, primero se realizó una prueba de actividad de 5 minutos a todos los CLEAs de un mismo lote, agrupándolas en grupos de 4 en función de la semejanza de los resultados obtenidos, con la finalidad de evitar variaciones posteriores que complicaran el ajuste a una regresión no lineal y, por lo tanto, se dificultara la determinación de los valores de  $K_M$  y  $V_{máx}$ .

Posterior a esto, se determinó la actividad específica a cada uno de los grupos formados en un rango de concentraciones de 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 10 y 15 mM de benzonitrilo, usando cada CLEA en dos concentraciones diferentes y empleando tiempos de reacción de 1.5 min, de acuerdo con el método general. La cuantificación del amonio generado se llevó a cabo por fluorometría, según el método descrito en el punto 11 de este apartado.

## **10. Caracterización de la actividad enzimática de la enzima libre**

Con el objetivo de comparar los resultados obtenidos para la nitrilasa inmovilizada, todos los experimentos previamente descritos se realizaron con la enzima libre, con algunas condiciones modificadas y bajo la metodología siguiente: por triplicado, en tubos eppendorf de 1.5 mL se colocaron 5  $\mu$ g de enzima, disueltos en 990  $\mu$ L de buffer de actividad y se pusieron en agitación en un Thermomixer® a 750 rpm y 30 °C, para que se atemperaran por 3 min.



Posteriormente, se agregaron 10  $\mu\text{L}$  de benzonitrilo 100 mM y se dejó la reacción por 10 min. Pasado este tiempo, se adicionaron 200  $\mu\text{L}$  de HCl 2N, se mezclaron y se conservaron únicamente 600  $\mu\text{L}$  de esta mezcla.

La única prueba en la que se modificó el tiempo de reacción fue en la termoactividad, el cual fue de 5 min.

Las pruebas de determinación de parámetros cinéticos y especificidad y selectividad no se realizaron.

## **11. Desarrollo de métodos analíticos para cuantificación por CLAR y fluorometría.**

### *a. Síntesis de estándares (ácidos carboxílicos)*

Con el fin de obtener los productos esperados de las hidrólisis enzimáticas, así como de desarrollar los métodos cromatográficos adecuados, se hidrolizaron químicamente los nitrilos a sus correspondientes ácidos. Los nitrilos pueden ser hidrolizados por catálisis básica o ácida, ya sea mediante el calentamiento en disoluciones hidroalcohólicas de hidróxido de potasio o sodio al 25%, o en disoluciones concentradas de ácido clorhídrico o de sulfúrico al 20-75%<sup>(44)</sup>. En esta ocasión se escogió la hidrólisis básica, por lo que se disolvieron 150 mg de los nitrilos que fueron solubles en 5 mL de la mezcla hidroalcohólica previamente descrita y se calentaron a 65 °C por 6 h, acidificando una vez pasado este tiempo con ácido clorhídrico y recogiendo por filtración el producto obtenido. Para confirmar que se llevó la hidrólisis del nitrilo hasta el ácido, se determinó el amonio liberado por el método del indofenol.

### *b. Métodos para CLAR*

Se prepararon stocks 100 mM de cada uno de los nitrilos y ácidos carboxílicos en el disolvente adecuado. A partir de estos stocks, se realizaron



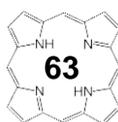
diluciones 1 mM de cada uno diluyendo con una mezcla 1:1 de acetonitrilo-buffer de fosfatos 50 mM pH 2.9 y se hicieron barridos en la región UV entre los 190 y los 400 nm, registrando los máximos de absorción para cada compuesto.

Una vez determinados los máximos de absorción, así como cuales compuestos presentaban una fuerte absorción en el UV, se procedió a determinar la composición de la mezcla de elución óptima para la posterior cuantificación. Para ello, se prepararon nuevamente diluciones 1 mM pero con buffer de actividad y, en aquellos compuestos que lo requirieron, se adicionó la cantidad mínima necesaria para evitar su cristalización y/o precipitación. Se tomaron 500  $\mu$ L de estas diluciones, se acidificaron con 100  $\mu$ L de HCl 2N y se mezclaron con 600  $\mu$ L de una mezcla 1:1 de acetonitrilo-buffer de fosfatos 50 mM pH 2.9. Las muestras con los compuestos se filtraron y se procesaron en un cromatógrafo Alliance<sup>®</sup>, equipado con una columna Symmetry<sup>®</sup> C<sub>18</sub>, se inyectaron 10  $\mu$ L de muestra y se eluyeron a un flujo de 1 mL/min a 30 °C, empleando como fase de elución buffer de fosfatos 50 mM pH 2.9 - acetonitrilo en un rango de 60:40 a 95:5, dependiendo del compuesto analizado.

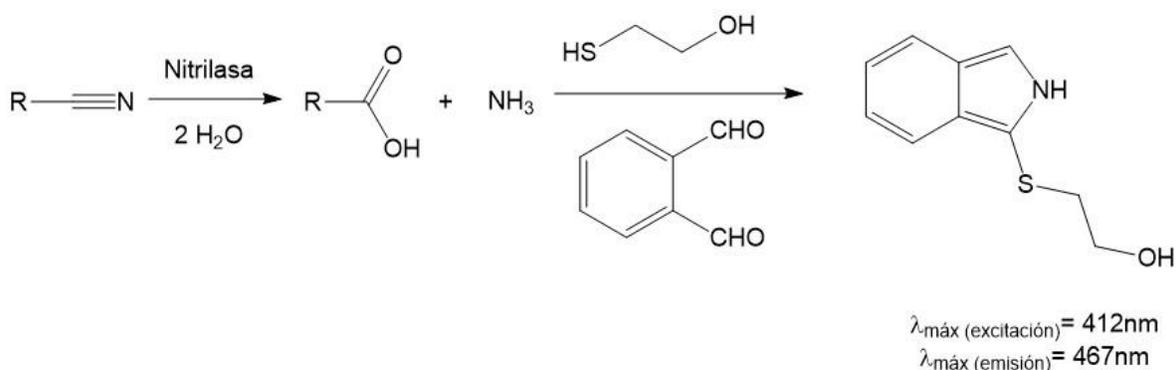
Finalmente, ya definidas las condiciones en las que se harían las cuantificaciones, se construyeron curvas estándar de 0 a 1.2 mM para cada compuesto.

### *c. Método fluorométrico*

Para aquellos compuestos que no presentaron una fuerte absorbancia en el UV y, por lo tanto, no fue posible su cuantificación por CLAR, la actividad sobre estos fue medida por cuantificación del amonio liberado, empleando una versión modificada de los métodos reportados por Banerjee<sup>(45)</sup> y Seffernick<sup>(46)</sup>. Estos se basan en la reacción entre el ión amonio, el *o*-ftalaldehído y el 2-mercaptoetanol, produciendo un derivado del indano que emite a una longitud de onda de  $\lambda_{\text{máx.}}$  (emisión) 467 nm cuando es excitado a  $\lambda_{\text{máx.}}$  (excitación) 412 nm (figura 24). También se empleó este método para la determinación de los parámetros cinéticos.



El método consistió en tomar 10  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción y verterlos en una placa de 96 pozos, adicionando posteriormente 200  $\mu\text{L}$  del colorante fluorescente (*o*-ftalaldehído 3.75 mM y 2-mercaptoetanol 3.6 mM disueltos en buffer de fosfatos 50 mM pH 7.4) y se incubó esta mezcla por 20 min en la oscuridad. La intensidad de la fluorescencia fue medida con excitación a 430 nm y emisión a 485 nm, en un lector de microplacas POLARstar Omega. Con el mismo método se construyó una curva estándar con cloruro de amonio, previamente secado, de 0 a 3 mM.



**Figura 24.** Reacción para la generación de un indano cuantificable por fluorescencia, a partir del amonio liberado de la hidrólisis enzimática

**Nota:** La emisión y la excitación no se trabajaron en sus máximos respectivos debido a que los filtros con lo que se contaba no operaban en esas longitudes de onda, por lo que se eligieron aquellas que fueran las más cercanas.

## 12. Análisis y ajuste de datos de parámetros cinéticos

### *Parámetros cinéticos (Ajuste a modelo de Hill)*

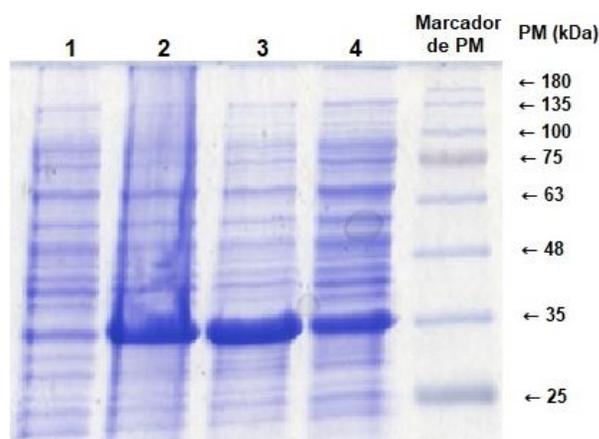
Los datos obtenidos de las velocidades iniciales ( $V_0$ ) calculadas en todas las concentraciones de sustrato empleadas se ajustaron a una regresión no lineal con un modelo cinético de Hill, ya que se mostraron mejores resultados que los obtenidos con un modelo de Michaelis-Mentel. De dicha regresión se calcularon los valores de  $K_M$ ,  $V_{m\acute{a}x}$  y  $n_H$ <sup>(48)</sup>.

$$V_0 = V_{m\acute{a}x} \frac{x^n}{k^n + x^n} \quad \text{Ec (1)}$$

## Resultados y discusión

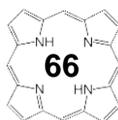
### Sobreexpresión y purificación de la proteína

Se transformaron células quimiocompetentes de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS con el gen de la nitrilasa Nit $\Delta$ C328 de *R. sp* V51B, integrado en un vector pET-24a (+). Para la sobreexpresión se probaron las condiciones de inducción a 37 °C por 4 h y a 22 °C por 8 h, encontrando que con estas últimas se obtenía una cantidad mayor de proteína, además de ser más activa, por lo que se definieron como las condiciones óptimas de trabajo. En la figura 25 se observa el seguimiento a la proteína durante su proceso de producción, la cual corresponde con el peso esperado para la nitrilasa (36.22 kDa), comparado con la banda más próxima que es la de 35 kDa.

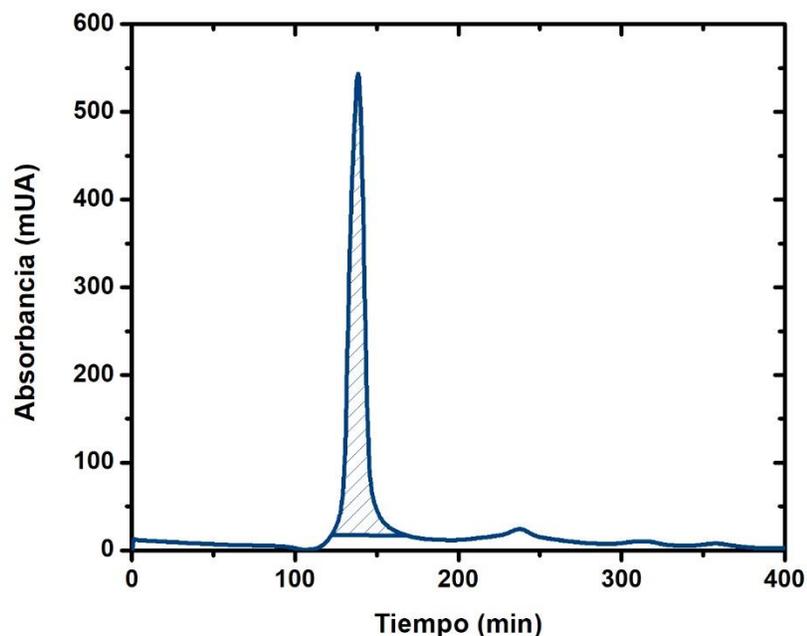


**Figura 25.** Gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 12.5% del seguimiento al proceso de sobreexpresión y solubilidad de la proteína Nit $\Delta$ C328 de *R. sp* V51B. 1) Antes de inducir, 2) después de inducir, 3) extracto total después del lisado y 4) sobrenadante después de lisar y centrifugar.

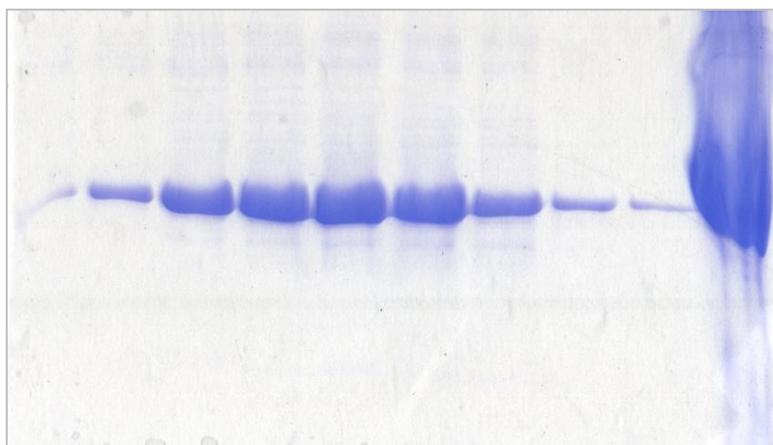
Dado que la proteína forma filamentos de gran tamaño, para su purificación bastó un primer paso de precipitación salina diferencial con sulfato de amonio al 20%, seguido de cromatografía de exclusión molecular, con lo que se obtuvo proteína con una pureza adecuada para las siguientes etapas experimentales. Como se observa en el cromatograma del segundo paso de purificación, la proteína eluye entre los 120 y los 170 min (figura 26), observándose su alta pureza en el gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 12.5% de las fracciones seleccionadas,



donde también se observa que el precipitado obtenido en el paso previo ya tenía a la enzima con una pureza considerable (figura 27). El rendimiento final tras la concentración con PEG y la diálisis fue de 12 mg de proteína por litro de cultivo bacteriano.



**Figura 26. Cromatograma de la purificación por exclusión molecular de la nitrilasa.** La región rayada corresponde a las fracciones seleccionadas donde se encontraba la proteína.



**Figura 27. Gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 12.5% de las fracciones seleccionadas tras la purificación por exclusión molecular.** Del lado derecho se observa una muestra del precipitado obtenido que posteriormente se inyectó en el cromatógrafo.

Actividad específica de la nitrilasa

La prueba de actividad constituye un parámetro crítico para una adecuada caracterización de la enzima inmovilizada, ya que demuestra que la enzima posee un plegamiento correcto y que, de no encontrarse en óptimas condiciones previo a su inmovilización, los resultados determinados no denotarían el efecto real que tiene esta modificación sobre la enzima.

Los valores obtenidos de actividad muestran, como se había hecho mención previamente, que la inducción por 8 h a 22 °C produce proteína con mejores características, ya que la actividad determinada es superior por casi el doble a la reportada previamente (cuadro 6)<sup>(39)</sup>.

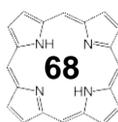
Condiciones de inducción	Actividad específica ( $\mu$ moles de amonio/min/mg de proteína)
8 h a 22 °C	18606.66 $\pm$ 1325.55
4 h a 37 °C	9785.35 $\pm$ 637.76

**Cuadro 6. Actividades específicas determinadas para las dos condiciones de inducción probadas.**

Esta mejoría en el proceso de sobreexpresión de la proteína constituye una ventaja significativa para la inmovilización debido a que las nitrilasas son enzimas sensibles en los procesos de inmovilización química<sup>(32)</sup>, por lo que su actividad se ve disminuida con la modificación química producida por dicho proceso, por lo tanto, el resultado obtenido podría contrarrestar parcialmente la pérdida de actividad por la inmovilización con una actividad aumentada en la enzima libre.

Entrecruzamiento de la proteína (formación de CLEAs)

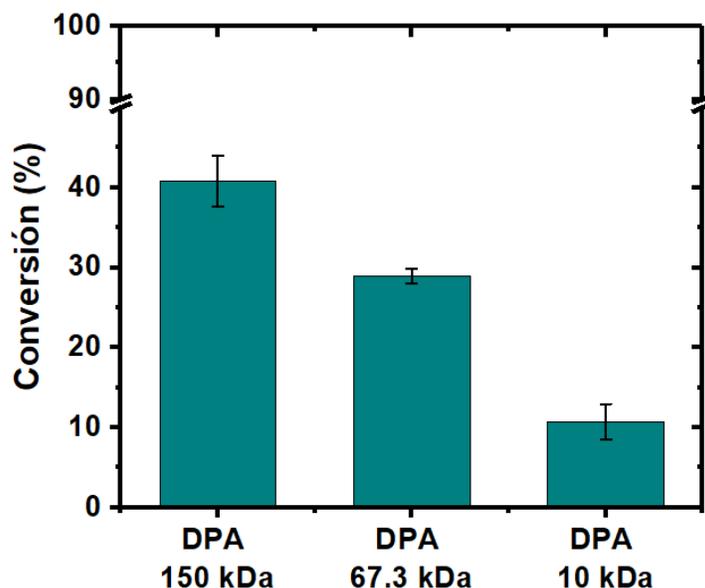
Para definir las condiciones idóneas de inmovilización que permitieran mantener la actividad de la enzima por más tiempo y mejorara la estabilidad mecánica y química de ésta, se manejaron un conjunto de variables que pudieran afectar el proceso y al producto deseado, tomando como metodologías de



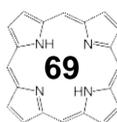
referencia las reportadas por Mateo<sup>(32)</sup> y Kaul<sup>(43)</sup>, variando una condición a la vez y eligiendo como parámetros de contraste el porcentaje de conversión, la reusabilidad y la apariencia física. Las variables estudiadas fueron:

*a) Tamaño del agente entrecruzante*

El tipo de agente entrecruzante, por su tamaño y naturaleza química, es un elemento crucial para obtener CLEAs activos. En las nitrilasas, en particular, se ha demostrado la incompatibilidad que tienen con el glutaraldehído, ya que con éste generalmente hay una recuperación baja o nula de la actividad debido a que se trata de enzimas que poseen en el sitio catalítico una lisina esencial para que se lleve a cabo la transformación del nitrilo, situación que se ha resuelto con entrecruzantes más voluminosos como el DPA, que difícilmente accede a dicho sitio. Con la finalidad de evaluar si el DPA, a pesar de su naturaleza polimérica, tiene un efecto dependiendo de su tamaño, se utilizaron tres tamaños diferentes: 150, 67.3 y 10 kDa.



**Figura 28.** Efecto del tamaño del DPA en la conversión del benzonitrilo tras la inmovilización.



Como se aprecia en la figura 28, el efecto es bastante notorio, ya que mientras mayor sea el tamaño del DPA, mayor es la actividad obtenida en los entrecruzados. Este efecto podría relacionarse con la capacidad del polímero, en función de su tamaño, de asociarse a una mayor cantidad de unidades monoméricas que forman los filamentos, estabilizándolos y evitando su desensamble, fenómeno que se sabe es importante para la actividad, ya que el ensamblaje en oligómeros de orden superior, en el caso de las nitrilasas, constituye un hecho necesario para que se lleve a cabo la catálisis de una manera eficiente<sup>(2,39,49)</sup>.

Se buscó usar un DPA de mayor tamaño (250 kDa), resultando en polímeros de escasa solubilidad en el agua, aun en la forma parcialmente oxidada con peryodato de sodio, lo cual imposibilitó la formación de los CLEAs. A partir de este punto, al hablar de DPA se hará referencia al polímero de 150 kDa.

*b) Radio enzima/entrecruzante*

El radio enzima/entrecruzante es evidentemente un factor importante. Si la cantidad de entrecruzante es demasiado baja, no ocurre un entrecruzamiento suficiente y, por lo tanto, no se forman CLEAs insolubles. Por otro lado, si la cantidad es demasiado alta, resulta en un entrecruzamiento excesivo con una completa pérdida de la flexibilidad de la enzima que es necesaria para su actividad<sup>(31)</sup>. Con estos antecedentes, se trabajaron dos concentraciones de enzima y dos de DPA, las cuales fueron de 50 y 100  $\mu\text{g}$  de enzima y de 1.65 y 3.3 mg de DPA por CLEA.

El resultado obtenido concuerda con lo discutido previamente, ya que el hecho de adicionar el doble de agente entrecruzante disminuyó la actividad desde el primer uso, como se observa en la figura 29, lo cual posiblemente se deba a una pérdida en la flexibilidad de la enzima. En el caso de una adición del doble de proteína, el efecto en los primeros dos usos no es muy diferente, ya que se observaron conversiones similares a pesar de la diferencia de carga de proteína



por CLEA. Sin embargo, posterior a estos usos hay un abatimiento significativo en la conversión por parte de los CLEAs con una carga doble de proteína. Una posible explicación podría ser que el mismo exceso de proteína evita un entrecruzamiento más extenso de las multisubunidades de los filamentos, lo que con cada uso podría implicar pérdidas de las unidades no estabilizadas y por ende una disminución en la actividad<sup>(49)</sup>.

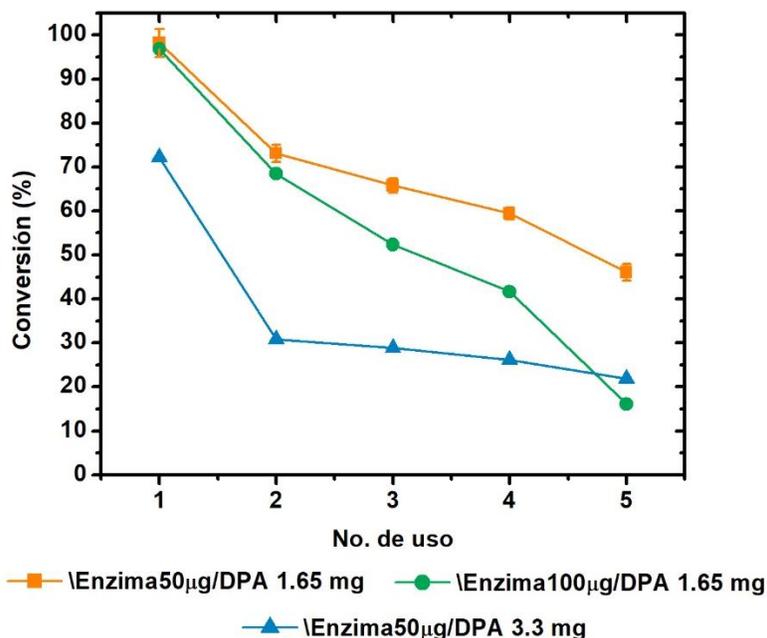


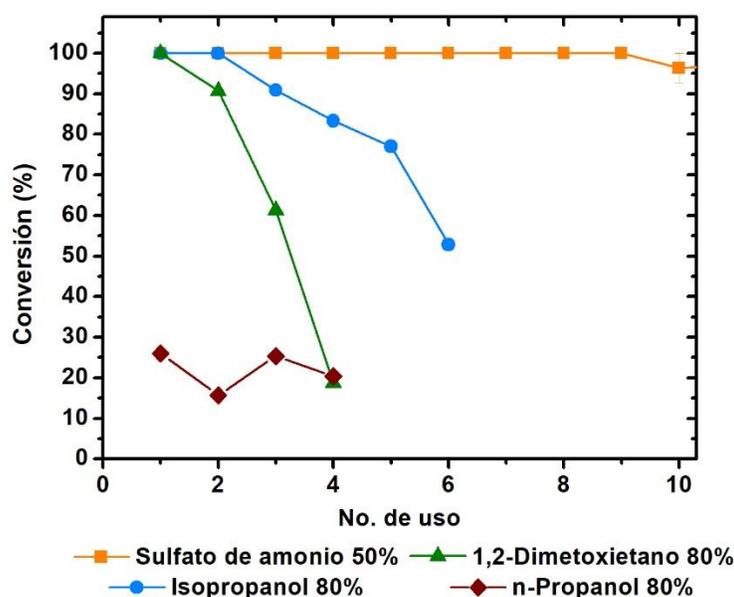
Figura 29. Relación enzima/entrecruzante y efecto de la carga de cada uno por CLEA en la actividad obtenida.

### c) Tipo de agente precipitante y concentración

La naturaleza del agente precipitante tiene un efecto importante en la conformación de la proteína y, por lo tanto, en la actividad recuperada. Por consiguiente, es necesario evaluar diversos agentes con la finalidad de encontrar el que tenga la máxima compatibilidad con la enzima y con el entrecruzante. Para ello, se emplearon tres disolventes (1,2-dimetoxietano, isopropanol y *n*-propanol) y una sal (sulfato de amonio), observándose que esta última, empleándose a una saturación del 50% (313 mg/mL), brindó muchos mejores resultados que los otros tres mencionados (figura 30).



Los mecanismos por los que actúan ambos tipos de precipitantes tienen sus semejanzas y diferencias. Los disolventes miscibles con agua disminuyen la constante dieléctrica del medio y solvatan directamente a la proteína, reduciendo el agua enlazada a esta e incrementando las fuerzas de atracción entre las diferentes cargas de las moléculas proteicas, lo que disminuye su solubilidad. El sulfato de amonio a concentraciones elevadas produce un efecto denominado “salting-out”, el cual está basado en la solvatación preferencial por la sal, aumentando la tensión superficial del medio, lo que conlleva a una autoasociación de la proteína que forma los agregados<sup>(50,51)</sup>.



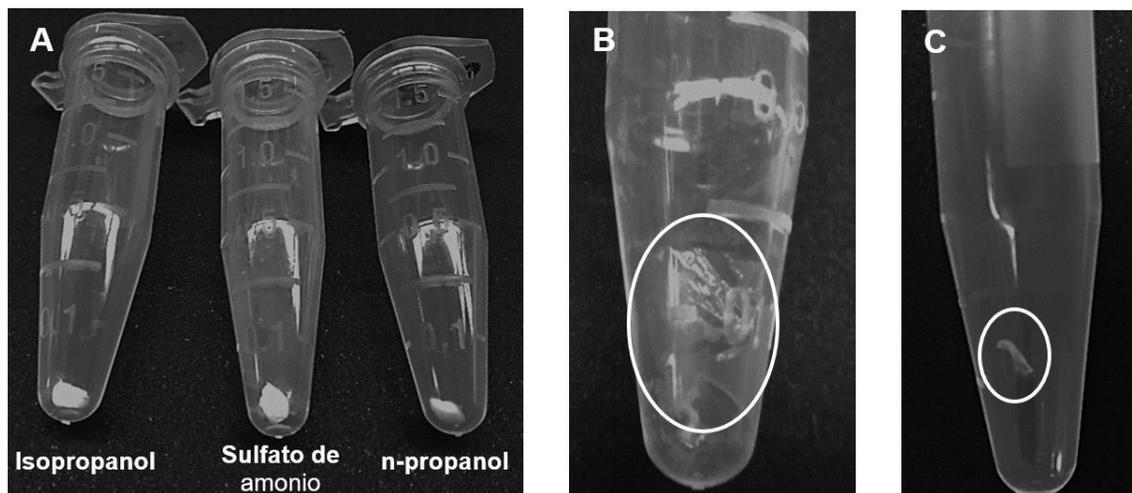
**Figura 30. Efecto del agente precipitante en la formación de los CLEAs de la nitrilasa.**

En general, los disolventes orgánicos muestran una marcada tendencia por desnaturalizar las proteínas, particularmente en concentraciones altas<sup>(50)</sup>, produciendo agregados con conformaciones desfavorables de la enzima<sup>(31)</sup>, lo cual explica por qué en casos como el *n*-propanol desde el primer uso no se tuvieron conversiones altas o por qué con el isopropanol y el 1,2-dimetoxietano la actividad tuvo un abatimiento rápido conforme aumentaron los usos (figura 30). Un estudio más profundo acerca del efecto que tuvo la naturaleza independiente de cada

disolvente sobre los CLEAs y la enzima libre se detallará en el estudio de la tolerancia a disolventes.

En el caso del sulfato de amonio la agregación se da de una forma más controlada y lenta, además de que, debido al aumento de la fuerza iónica y la tensión superficial del medio, la enzima disminuye su área superficial, adoptando la conformación que minimiza el contacto con el disolvente, que corresponde con la conformación plegada, siendo la idónea al momento de inmovilizarse<sup>(51)</sup>.

Además del efecto en la actividad, cada agente precipitante tuvo un efecto en la apariencia de los entrecruzados. En general, los disolventes produjeron entrecruzados con una apariencia algodonosa y que formaban una sola macropartícula, además de ser más grandes que los producidos con sulfato de amonio, con excepción del DME (figura 31). Con el sulfato de amonio los entrecruzados tenían dos apariencias, la cual dependía de la saturación de sulfato de amonio empleada, ya que al 35% se formaban principalmente laminillas que se adherían a las paredes del microtubo, mientras que al 50% de saturación se formaba mayoritariamente una macropartícula de fácil disgregación, junto con una cantidad menor de laminillas en los alrededores del microtubo (figura 31).



**Figura 31. Apariencia física los CLEAs obtenidos con cada agente precipitante empleado. A)** Apariencia de los entrecruzados obtenidos con isopropanol, sulfato de amonio y n-propanol. Se observa una menor traslucidez en el microtubo donde se formaron los entrecruzados con sulfato de amonio debido a la presencia de laminillas adheridas en las paredes internas, **B)** CLEA con forma laminar formado con sulfato de amonio al 35% de saturación, **C)** CLEA formado con DME como agente precipitante.



Este efecto en las propiedades de las partículas nuevamente se le podría asociar al mecanismo de precipitación por parte del agente precipitante. Dado que los disolventes producen una agregación casi instantánea, la formación de una macropartícula continua es favorecida, mientras que con el sulfato de amonio el proceso se lleva en forma paulatina, favoreciendo la formación de micronúcleos. Dichas propiedades físicas tienen interesantes repercusiones, ya que, a pesar de que el manejo de las partículas de gran tamaño es más sencillo, el aumento en la superficie de contacto que poseen los entrecruzados producidos con sulfato de amonio propicia una conversión más acelerada, pues los problemas por difusión son menores, siendo uno de los principales problemas a resolver durante una inmovilización.

#### Caracterización de la actividad enzimática de la enzima inmovilizada

Una vez definidas las condiciones con las que se inmovilizó la enzima, se procedió a la caracterización intensiva de los CLEAs, por medio del estudio de los siguientes aspectos:

#### *Reusabilidad*

Con este parámetro se estudió principalmente la estabilidad mecánica y operacional de los CLEAs, la cual ya se había venido probando desde el diseño del método de inmovilización, pero sin llegar a un uso más extenso de los entrecruzados.

En la figura 32 se muestra la cantidad de usos que se pudieron dar a los CLEAs en los que se conservó más del 75% de la actividad bajo las condiciones establecidas. El resultado, bajo ese criterio, fue de 16, aunque se conserva un 100% de actividad hasta los 9 usos y arriba del 90% hasta los 14, valores que son mayores a los observados para otras nitrilasas inmovilizadas, como la reportada por Kaul, en el que sólo obtuvieron hasta 5 ciclos con una conversión mayor al 90%<sup>(43)</sup>. También los valores determinados son superiores para CLEAs de otras



enzimas con otros soportes, como la alcalasa reportada por Nuijens, donde observaron pérdida de actividad desde el quinto uso, o la nitrilo hidratasa estudiada por Pawar, en la que, tras una inmovilización con PVA/quitosan-glutaraldehído, la enzima pierde la mitad de su capacidad tras seis ciclos<sup>(33,52)</sup>.

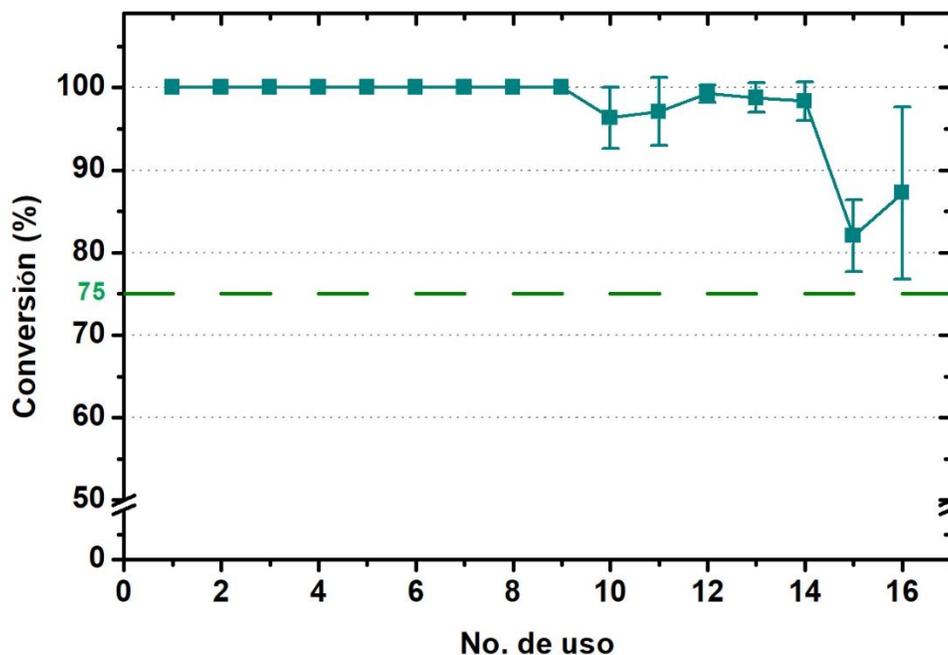


Figura 32. Determinación de la reusabilidad de los CLEAs. La línea segmentada verde ( — ) representa el límite establecido del 75% de conversión mínimo.

### Estabilidad en almacenamiento

Las enzimas de interés industrial deben de ser estabilizadas para su envío y almacenamiento, lo cual se alcanza con su inmovilización, por lo que el estudio de su estabilidad en almacenamiento nos permite conocer el tiempo de viabilidad que posee la enzima previo a su aplicación en un proceso dado o durante su aplicación en procesos con intervalos de tiempo entre sí.

El estudio de esta propiedad se llevó a cabo por un periodo de 169 días, es decir, cinco meses y medio, aproximadamente, analizando a la par los CLEAs de un mismo lote y la misma enzima libre empleada para la formación de estos. La figura 33 muestra los resultados obtenidos, donde inmediatamente se observa la

diferencia entre la enzima libre e inmovilizada, ya que la primera perdió cerca del 35% de su actividad en el primer mes, mientras que la segunda mostró una retención del 85% de la actividad, aunque en posteriores mediciones se observó el 100% nuevamente, por lo que posiblemente ese resultado se debió a una falta de difusión en el medio de reacción por parte de la enzima inmovilizada. Para el segundo mes la enzima libre ya sólo mantuvo un 30% de su actividad inicial, mientras que la inmovilizada siguió mostrando el mismo valor inicial, hecho que se mantuvo hasta el final del estudio, donde mostró una pérdida de apenas el 3% de actividad, bajo las condiciones previamente definidas de trabajo.

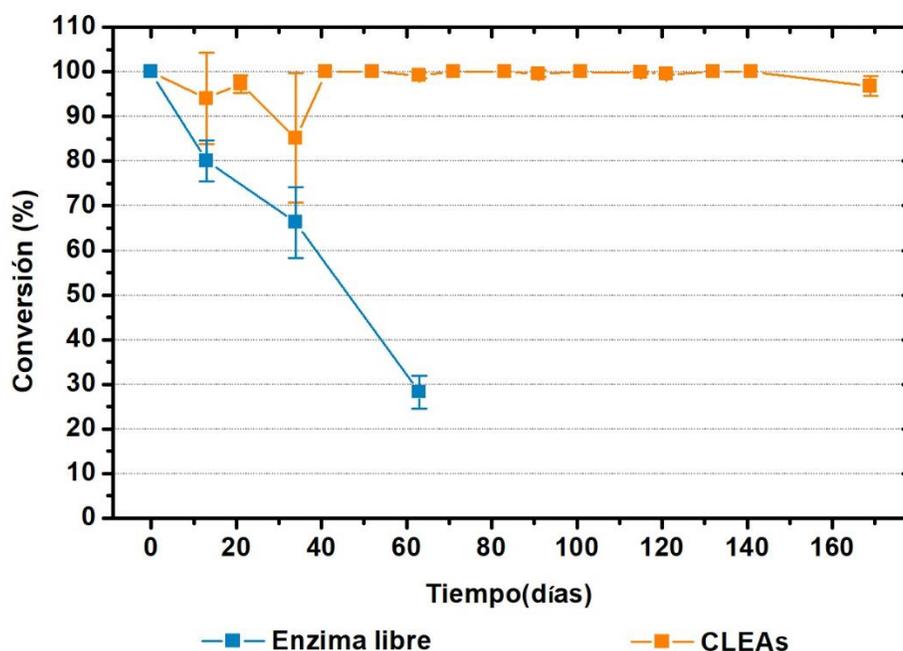


Figura 33. Comparativo de estabilidad en almacenamiento para los CLEAs y la nitrilasa libre.

Este aumento en la estabilidad probablemente se deba a dos razones: 1) el aumento en la rigidez estructural como efecto del entrecruzamiento en diversos puntos de los filamentos, 2) este mismo entrecruzamiento de las multisubunidades evita el desensamble de los oligómeros, cuestión que seguramente con el paso del tiempo sufre la enzima libre, resultando en una pérdida de actividad.

### *Termoestabilidad*

La estabilidad térmica es una propiedad de las sustancias de resistir cambios irreversibles en su estructura física o química, debido a altas temperaturas o por tiempos de calentamiento prolongados. Esta propiedad también forma parte de algunas proteínas, por lo que, para que estas sean consideradas termoestables, deben resistir cambios en su estructura debido al calor aplicado.

El estudio de esta propiedad es importante por varias razones. Por ejemplo:

1. La velocidad de las reacciones enzimáticas (así como el de la mayoría de las químicas) generalmente se acelera al calentar, por lo que el uso de altas temperaturas puede ser económicamente ventajoso.
2. El empleo de altas temperaturas en reactores enzimáticos reduce drásticamente la probabilidad de contaminación bacteriana.
3. Desde el punto de vista de la productividad, a menudo es deseable disolver tanto sustrato como sea posible, aumentando en la mayoría de los casos la solubilidad de estos con temperatura<sup>(53)</sup>.

Sin embargo, en la mayoría de los casos la aplicación de estas condiciones en un proceso se ven limitadas a la estabilidad de la enzima. Una de las estrategias más usadas para abordar esta problemática es la inmovilización de la enzima, ya que una consecuencia común de dicha modificación es que la estabilidad térmica de la proteína se ve alterada<sup>(24)</sup>. Dicha alteración se mide a través de la actividad enzimática a una temperatura dada y en diferentes intervalos de tiempo.

Con la finalidad de medir y comparar la estabilidad térmica de la nitrilasa libre e inmovilizada, se analizó este parámetro a tres temperaturas (30, 40 y 50 °C), en un periodo de 44 h. Los resultados se muestran en la figura 34, en la que se observa que, tanto para la enzima inmovilizada como para la libre, mientras mayor es la temperatura, menor es el tiempo que mantiene su actividad inicial. En términos de la energía suministrada, dicho efecto se puede asociar a que, a una



mayor temperatura, la transferencia energética es mayor, lo cual produce una desestabilización de la enzima en menor tiempo, finalizando en la consecuente forma inactiva.

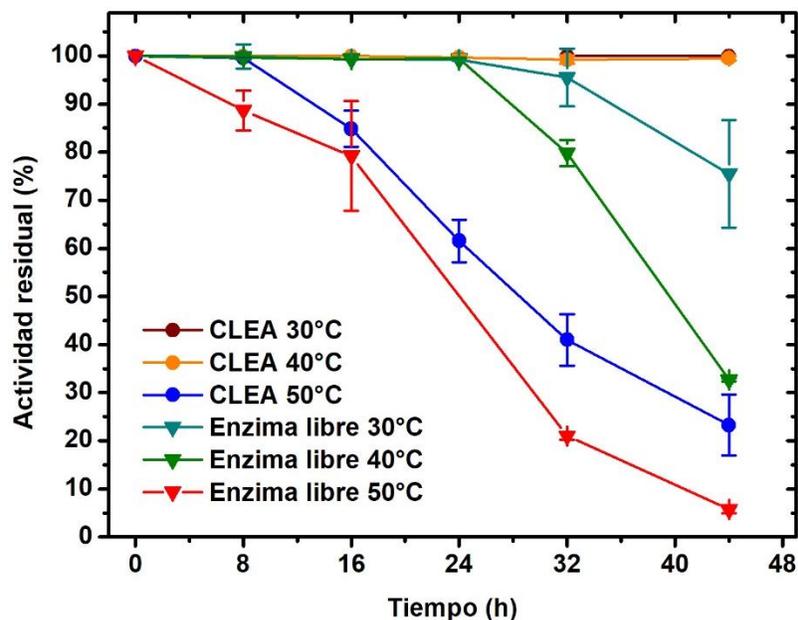
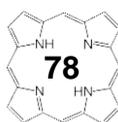


Figura 34. Seguimiento de la actividad residual tras el calentamiento a tres temperaturas (30, 40 y 50 °C) de la nitrilasa inmovilizada y la enzima libre.

De un modo general, la enzima al momento de inmovilizarse adquiere un estado de mayor rigidez, lo que implica una disminución en los movimientos y vibraciones moleculares, resultando en un aumento en la estabilidad en todos los casos, particularmente a 30 y a 40 °C, como se observa en la figura 34, ya que tras 44 horas de calentamiento la forma libre ya presentaba pérdidas en actividad del 25 y 75%, respectivamente, mientras que la forma inmovilizada mantenía su actividad inicial. Estos resultados se deben a que, debido a la rigidez estructural, la alta barrera cinética que se crea tras la inmovilización previene la transición hacia el estado desplegado de la enzima, prefiriéndose así la estructura plegada<sup>(54,55)</sup>.

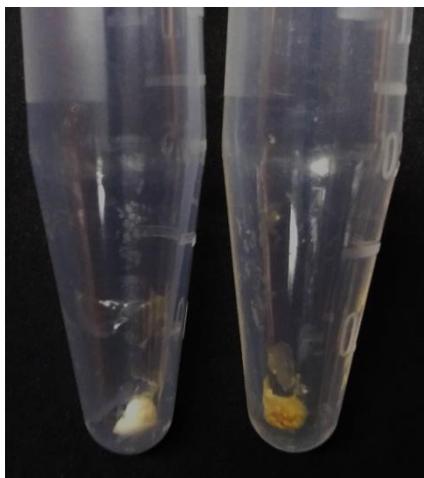
A pesar de que la rigidez del soporte previene el desplegamiento, ésta no provee una completa protección contra la inactivación térmica, como se ha demostrado en otros estudios en lo que se ha observado que el sitio activo de algunas enzimas se encuentra en una de las regiones más flexibles de la proteína



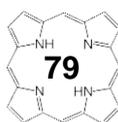
completa, lo que lo hace más frágil<sup>(54,56)</sup>. Este fenómeno podría explicar porque a 50 °C, bajo las condiciones en las que se llevó el estudio, también se observó una pérdida de actividad en la nitrilasa inmovilizada (figura 34), por lo que a esa temperatura el sitio activo pudo haberse afectado.

Además de lo discutido, la estabilización de una enzima contra la inactivación térmica significa: 1) una reducción en la constante de inactivación térmica ( $k_d$ ), 2) un incremento en la vida media de termoinactivación ( $t_{1/2}$ ) ó 3) un aumento en la temperatura que es necesaria para alcanzar en cierto grado la termoinactivación, todas bajo condiciones definidas<sup>(53)</sup>. A modo de corroborar los datos obtenidos, se trataron de ajustar los resultados obtenidos a un modelo de decaimiento exponencial de la actividad, dado que es el más común, sin embargo, los resultados no mostraron un ajuste adecuado a dicho modelo, por lo que la desactivación de la enzima, tanto libre como inmovilizada, no se es de primer orden.

Con respecto a la apariencia física (figura 35) de los entrecruzados tras los intensos tiempos de calentamiento, éstos adquirirían una coloración amarillenta, posiblemente por la oxidación de la matriz de soporte, formada por azúcares.



**Figura 35. Cambio en la apariencia física de los CLEAs de la nitrilasa tras el calentamiento exhaustivo.** Del lado derecho se encuentra un CLEA sin calentar exhaustivamente y del izquierdo uno al finalizar la prueba de termoestabilidad.



### Termoactividad

Cuando la velocidad inicial de reacción se grafica contra la temperatura, se obtiene una curva con forma de campana, en la que se observa cómo conforme aumenta la temperatura, la velocidad de reacción aumenta; sin embargo, de forma concomitante, existe una inactivación de la enzima que disminuye la velocidad inicial, debido a la pérdida de estabilidad<sup>(47,57)</sup>.

Los experimentos realizados, en un rango de temperaturas de 30 a 80 °C, mostraron el fenómeno previamente descrito, aunque la altura de dicha campana y su amplitud fueron característicos de cada estado de la enzima, como se observa en la figura 36.

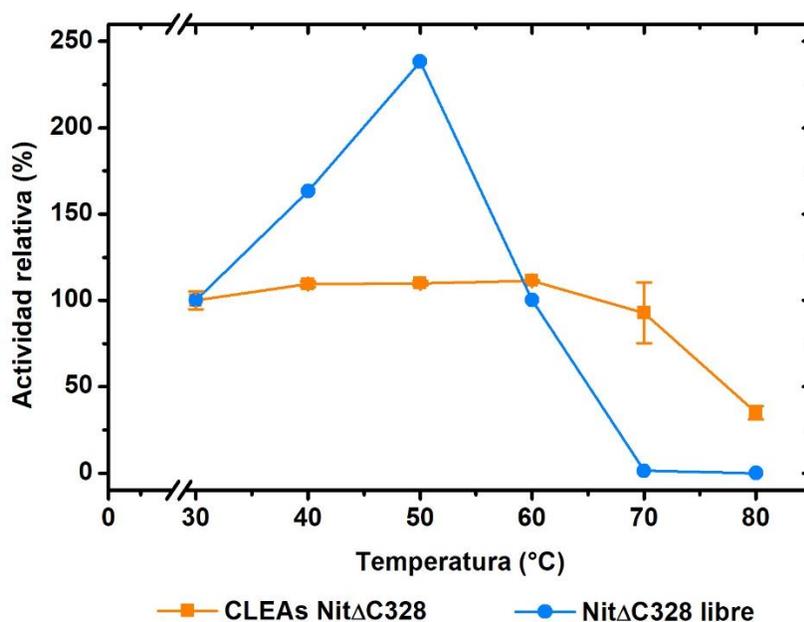
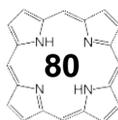


Figura 36. Perfil de actividad de la nitrilasa libre e inmovilizada en función de la temperatura.

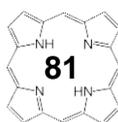
El aumento en la actividad como función de la temperatura fue mucho más marcado en la enzima libre que en la inmovilizada, ejemplo de ello es la actividad observada a los 50 °C, donde para la enzima libre fue 140% mayor que la vista a 30 °C, mientras que en el caso de la enzima inmovilizada fue apenas 10% mayor. Dicho efecto se correlaciona con la movilidad que tiene la enzima en ambos estados, pues libre posee una mayor entropía, lo que se traduce en una mayor



flexibilidad que le permite tener un mayor número de recambio a mayor temperatura, mientras que la inmovilización implica una pérdida o limitación en dicha flexibilidad y, por lo tanto, el número de recambio no se ve tan promovido por la temperatura. Una vez que se rebasaron los 50 °C, se comienza a observar el segundo fenómeno asociado al aumento en la temperatura, que es la pérdida de estabilidad de la enzima, en donde a los 60°C la enzima libre regresó a su tasa de conversión normal, mientras que la enzima inmovilizada mostró un 12% más de actividad, el cual pareció ser el grado máximo de activación. Este aumento en la actividad de la enzima inmovilizada, a pesar de que fue mínimo, demuestra la necesidad, nuevamente, de un aumento en la energía suministrada para vencer la brecha que impone la inmovilización en términos de la actividad de la enzima.

A su vez, la actividad residual a 70 y 80 °C mostró diferencias significativas entre la enzima libre y la inmovilizada, esto con respecto a la estabilidad, pues a la primera temperatura la actividad enzimática de la nitrilasa soluble fue casi despreciable, cercana al 2%, pudiendo atribuirse tal decaimiento a que ya se estaba trabajando prácticamente en el valor de la  $T_m$  (70.9 °C)<sup>(39)</sup>, en el cual se considera que la mitad de la proteína ha perdido estructura y, por lo tanto, actividad. Por otro lado, a 80 °C, una vez rebasado dicho valor de  $T_m$ , la actividad fue nula, mientras que la nitrilasa inmovilizada había perdido apenas 7% de la actividad inicial a 70 °C y conservaba el 35% de esta a los 80 °C, lo que implica una ganancia en su estabilidad termodinámica.

Estos resultados son de gran interés, ya que la nitrilasa presenta un proceso de desnaturalización por calor irreversible<sup>(39)</sup>, es decir, no recupera estructura aun cuando se disminuye la temperatura, por lo que la pérdida de actividad una vez rebasados los 70 °C es absoluta, mientras que con la inmovilización de la enzima se conserva una cantidad significativa de actividad. A modo de confirmar si la inmovilización realmente previene el desplegamiento<sup>(54)</sup>, tal como se hipotetizó en el apartado de termoestabilidad, los CLEAs que se emplearon en un ciclo de reacción a 80 °C se ocuparon para un segundo ciclo a 30 °C, observando que la actividad en este último fue de apenas el 2%, con lo que



podemos asumir que tras el calentamiento a 80 °C hay una pérdida de estructura en algún nivel, como podría ser en el sitio activo de la proteína, aunque no se pueden emitir resultados definitivos sin una caracterización estructural apropiada.

### Actividad en diferentes valores de pH

Así como ha sido reconocido que la catálisis enzimática depende de la temperatura, también se sabe que está influenciada por alteraciones en la concentración de iones hidronio. La forma en que actúa el nivel de acidez del medio en la enzima es mediante alteraciones en su estructura. Cuando el pH de un medio en particular cambia, se produce una alteración en la conformación de la enzima, la cual puede ser benéfica o perjudicial para, por lo que, si graficáramos la velocidad de reacción inicial contra el valor de pH del medio, obtendríamos una campana similar a la que se produce en termoactividad, definiendo un rango de pH en el cual la actividad es máxima<sup>(57)</sup>.

Con el objetivo de analizar las variaciones de la actividad enzimática en función de la acidez del medio, se trabajó en un intervalo de valores de pH de 4 a 12; los resultados se muestran en la figura 37.

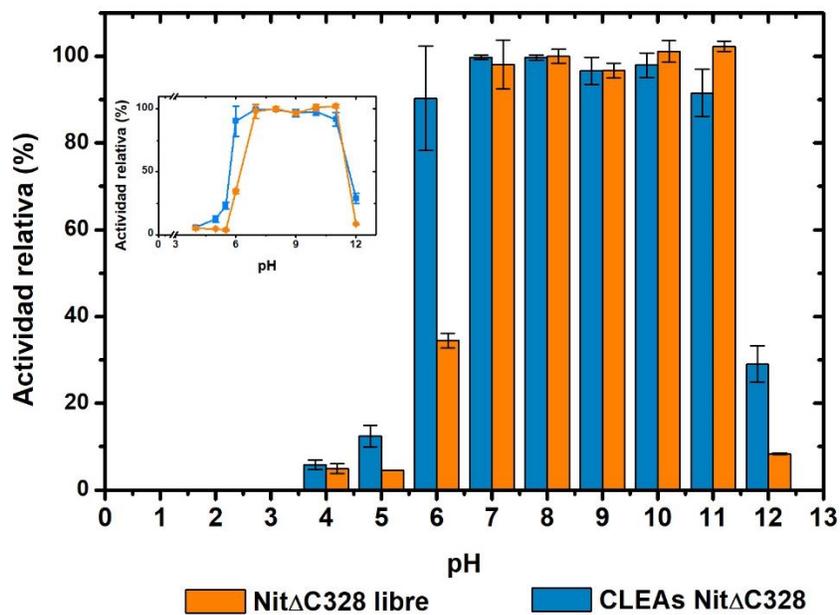
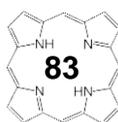


Figura 37. Perfil de pH para la nitrilasa libre e inmovilizada.

Los cambios más notables se observaron en los extremos del intervalo de pH escogido, ya que a un valor de pH de 6 la nitrilasa inmovilizada conservó un 60% más de actividad que la enzima libre, mientras que a un valor de pH 12, a pesar de que la actividad relativa era baja en ambas formas de la proteína, la forma inmovilizada tenía un 30% de actividad, mientras que la forma soluble menos del 10%. El valor límite de acidez de trabajo para la nitrilasa inmovilizada fue de 5.5, donde la actividad fue cercana al 25%, mientras que la enzima libre tenía ya sólo el 3%.

Como se mencionó previamente, la concentración de iones hidronio altera la estructura de la enzima y algunas veces la del mismo sustrato, debido a la formación de enlaces adicionales o a la ruptura de los ya existentes. Si se hace un análisis de los intervalos de pH en los cuales la enzima libre conserva más de un 30% de su actividad, se observa que estos se encuentran entre los valores de pKa del segundo carboxilo del ácido glutámico y aspártico (4.25 y 3.65, respectivamente<sup>(7)</sup>) y de las cadenas laterales de la lisina y la arginina (10.53 y 12.68, respectivamente<sup>(7)</sup>). Esto sugiere que, al acercarse a tales valores de pH, los aminoácidos mencionados previamente comienzan a modificar sus cargas, con lo que se perturban las interacciones a nivel de estructura terciaria, como puede ser en el sitio activo, pero también en la cuaternaria, enfocándonos en las diferentes superficies de interacción que presenta la nitrilasa para la oligomerización (figura 38). Estas modificaciones pueden afectar el grado de asociación entre monómeros, dímeros y oligómeros, lo que resulta en una pérdida de actividad.



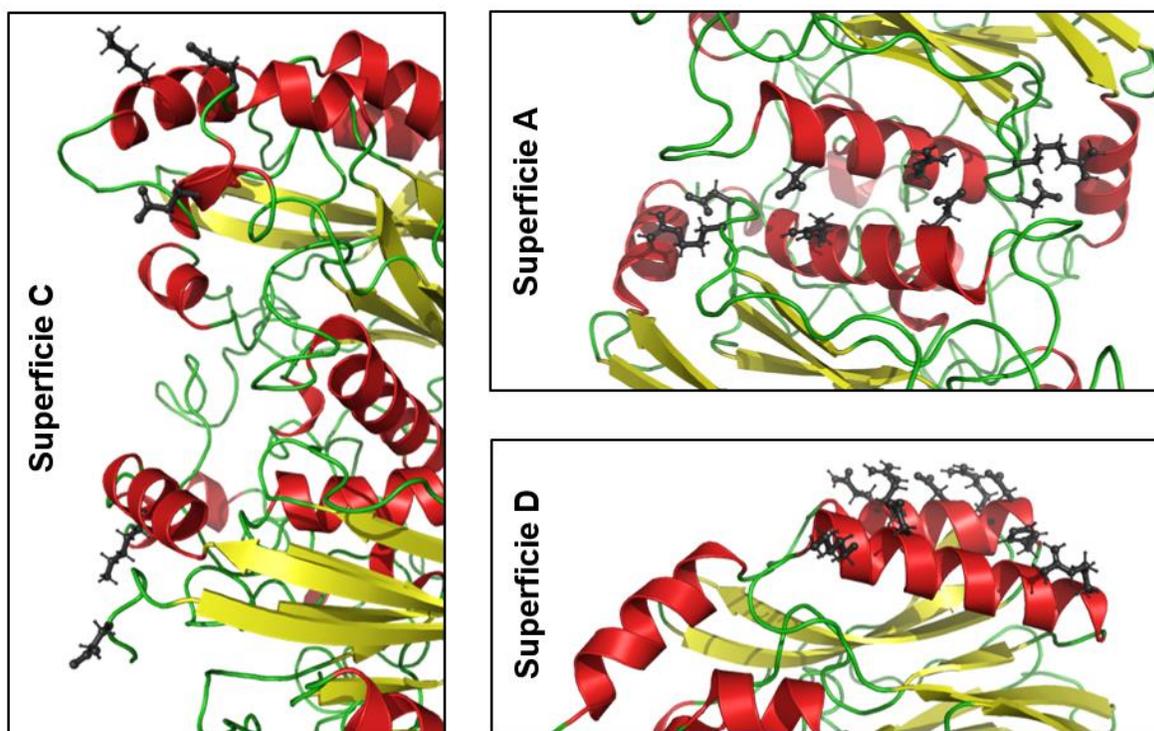


Figura 38. Superficies de interacción en un modelo de un dímero de la nitrilasa Nit $\Delta$ C328 construido por homología. Se destacan en negro los aminoácidos con cadena lateral ionizable en cada una de las superficies de interacción.

Este último fenómeno se ha observado en otras nitrilasas, como la CynD de *B. pumilus* C1, la cual a un pH de 8 forma oligómeros pequeños, pero a pH de 5.4 forma filamentos de gran tamaño<sup>(15)</sup>.

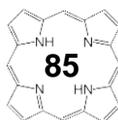
Todos estos cambios también se esperaban en la enzima inmovilizada, ya que, a pesar de que la modificación química por parte del DPA se dirige a los grupos amino ionizables de las cadenas laterales de las lisinas, sus propiedades ácido-base no se ven afectadas en gran medida, conservando su carácter básico. Sin embargo, nuevamente la restricción con respecto a la movilidad y flexibilidad de la enzima hace que, a pesar de que se generen cargas que pudiesen ser desfavorables para la estructura de la nitrilasa, no haya modificaciones tan severas en la estructura en los mismos valores de pH que con la enzima libre.

El aumento en el rango alcalino en el cual aún puede operar la nitrilasa Nit $\Delta$ C328 constituiría una gran ventaja en otras aplicaciones, como la biorremediación, si presentara promiscuidad por otros sustratos, como el cianuro. Los residuos industriales que contienen este compuesto, generados principalmente por la industria minera, se mantienen en valores de pH altamente alcalinos, con el fin de evitar la volatilización del cianuro de hidrógeno ( $pK_a=9.3$ ) y mantenerlo en su forma disociada<sup>(58)</sup>. Lamentablemente, la especificidad de la nitrilasa estudiada en este trabajo es tal, que no muestra actividad mínima en la degradación de cianuro, a diferencia de las CynD que muestran una promiscuidad por los nitrilos, pero que poseen una estabilidad insuficiente en los valores de pH necesarios para su aplicación efectiva en biorremediación.

### *Actividad en mezclas binarias con disolventes*

Muchos de los actuales enfoques en tecnología enzimática involucran el uso de medios no convencionales, como los que contienen disolventes orgánicos. Los medios no acuosos o parcialmente acuosos permiten incrementar la cantidad de sustrato en disolución, cambiar el equilibrio termodinámico a favor de la síntesis sobre la hidrólisis, disminuir la contaminación microbiana, entre otras<sup>(25,59)</sup>. Sin embargo, como se mencionó previamente, los disolventes tienen una marcada tendencia por desnaturalizar a las proteínas, dependiendo de la naturaleza de los mismos, por lo que representa un reto para la instauración de un proceso biocatalítico utilizando enzimas a gran escala.

Con la finalidad de mejorar las propiedades de las enzimas solubles, la inmovilización, una vez más, se muestra como una solución efectiva, en medios no convencionales. Para probarlo, se estudió la actividad de la nitrilasa inmovilizada en mezclas binarias con ocho disolventes a cinco concentraciones diferentes, los cuales se clasificaron en función de su naturaleza estructural como polares próticos y apróticos.



Los resultados mostraron que las mezclas binarias en las que la enzima tuvo una mayor actividad fueron las que contenían metanol y DMSO, ambos siendo los más polares de sus respectivas categorías. Por otro lado, en las que se observó una menor actividad fueron las que tenían *n*-propanol y THF, que, en contraposición con los primeros, eran los de menor polaridad de sus clasificaciones correspondientes (figura 39). Además, se evaluó la actividad de la nitrilasa libre en dichos medios, observando que se conservó un perfil de tolerancia semejante, así como una marcada disminución de la actividad en concentraciones superiores al 10% en *n*-propanol, isopropanol, DMF y acetona, en comparación con la enzima inmovilizada. (figura 40).

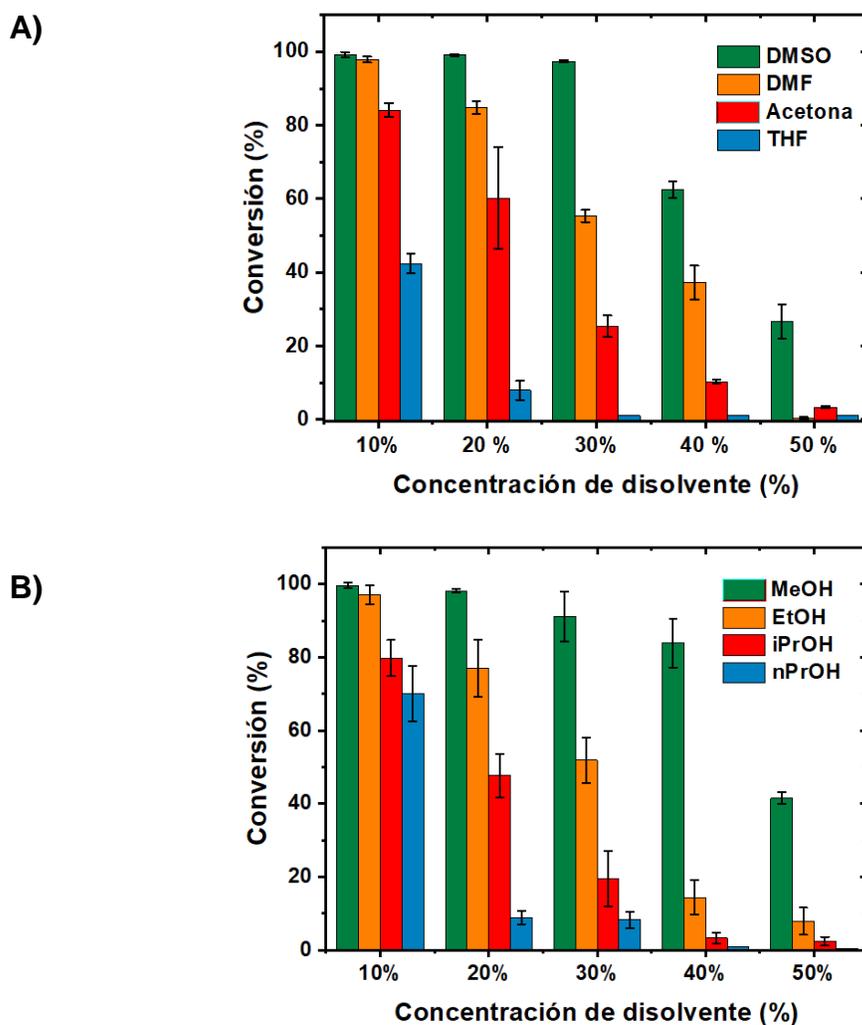


Figura 39. Evaluación de la actividad de la nitrilasa inmovilizada en mezclas binarias a diferentes concentraciones. **A)** Disolventes polares apróticos, **B)** Disolventes polares próticos

## Resultados y discusión

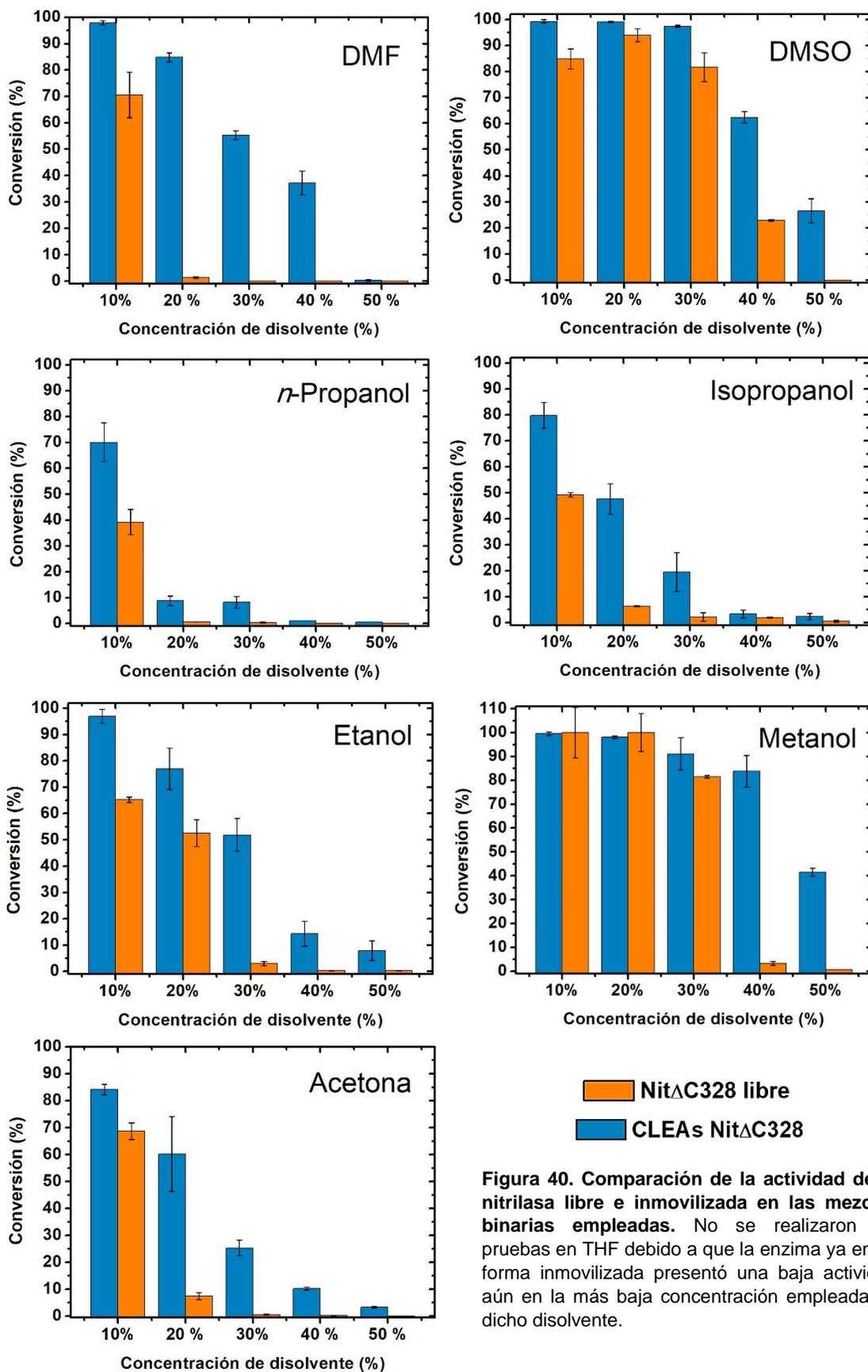


Figura 40. Comparación de la actividad de la nitrilasa libre e inmovilizada en las mezclas binarias empleadas. No se realizaron las pruebas en THF debido a que la enzima ya en su forma inmovilizada presentó una baja actividad aún en la más baja concentración empleada de dicho disolvente.

Organizando los disolventes de acuerdo con la actividad que presentaron en ellos los CLEAs, la serie quedaría de la siguiente forma:



Como se mencionó previamente, se observó que había una relación entre la polaridad del medio y la actividad observada, por lo que, para hacer una correlación más efectiva de estas variables, se hizo una comparación de la actividad vista en mezclas al 10% de cada disolvente y la constante dieléctrica de cada uno de ellos (figura 41-A y C).

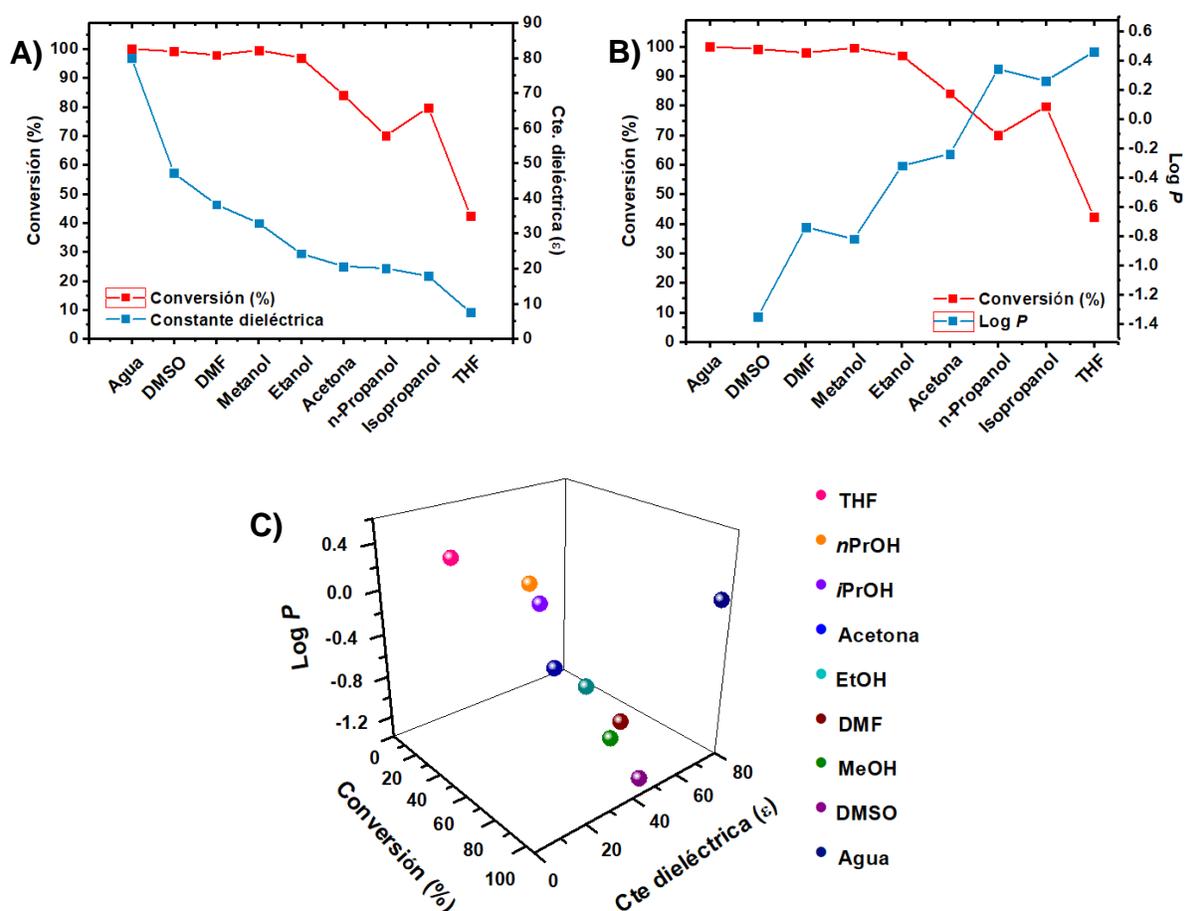
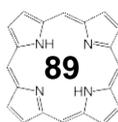


Figura 41. Relación entre la actividad de los CLEAs en cada mezcla y: A) la constante dieléctrica y B) el Log *P* del disolvente ocupado en cada una. C) Correlación entre coeficiente de partición, constante dieléctrica y actividad. Los valores de las constantes dieléctricas y Log *P* son los reportados por Smallwood<sup>60</sup>.

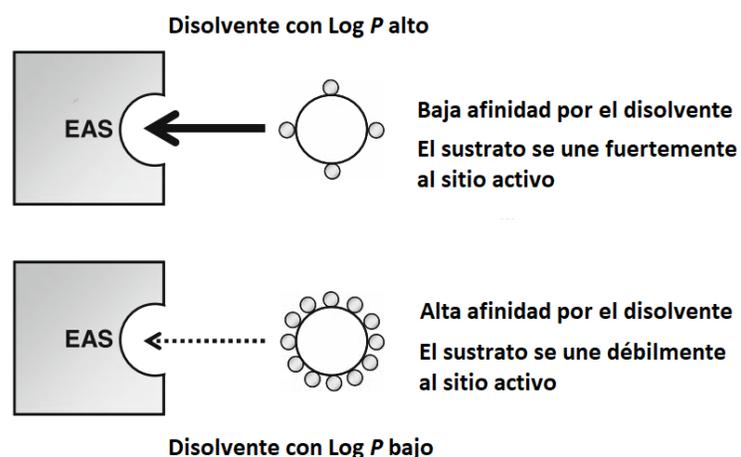
Como se esperaba, conforme disminuyó el valor de la constante dieléctrica, menor fue la actividad observada para los CLEAs. Es bien sabido que las fuerzas electrostáticas son uno de los factores que correlacionan con la estructura y función de una proteína. Además, se sabe que las enzimas tienden a ser estructuralmente más flexibles en disolventes con constantes dieléctricas grandes, por lo que una mayor flexibilidad estructural facilitaría una mejor interacción enzima-sustrato, resultando en una mejor conversión<sup>(61-63)</sup>. Por lo tanto, se puede decir que disolventes con constantes dieléctricas bajas debieran ser agregados al medio en concentraciones bajas, mientras que disolventes con constantes dieléctricas altas pueden ser adicionados en concentraciones más altas, sin pérdidas significativas de la capacidad catalítica de la enzima<sup>(61)</sup>, tal como se observó tanto en la nitrilasa libre como en la inmovilizada.

Por otro lado, además de la constante dieléctrica del medio, se ha encontrado que existe una correlación entre la actividad enzimática y la hidrofobicidad del disolvente, expresado mediante su coeficiente de partición ( $\log P$ ). Algunos autores atribuyen el efecto en la actividad enzimática a la habilidad de los disolventes orgánicos por distorsionar la capa acuosa alrededor de la enzima, más que a la enzima misma, aunque no se descartan las distorsiones producidas por estos sobre las fuerzas no covalentes que mantienen la estructura secundaria y terciaria de la enzima<sup>(63-65)</sup>. Así como con la constante dieléctrica, se graficó la actividad contra el  $\log P$  de cada disolvente (figura 41-B y C), observándose que entre más hidrofílico era este, mayor era la actividad de la enzima, aunque cabe aclarar que dicho comportamiento sólo puede correlacionarse a concentraciones bajas del disolvente. Es bien conocido que al utilizar disolventes puros la relación es inversa, es decir, entre más hidrofóbico es el disolvente, mayor es la tolerancia que tiene la enzima<sup>(59,66,67)</sup>.

Otro efecto importante, y que quizá tiene más peso en concentraciones bajas de disolvente, es el que tiene la hidrofobicidad del disolvente sobre la disponibilidad del sustrato por parte del sitio activo de la enzima, dado que la naturaleza de las interacciones entre el disolvente y el sustrato limitan la



asociación de este último con la enzima, reflejándose en la actividad enzimática. Aunque no se determinó en este estudio, se ha observado que cuando se emplean disolventes con valores de  $\text{Log } P$  altos, el valor de la  $K_M$  aumenta, lo que indica que hay una pérdida gradual de la afinidad de la enzima por el sustrato conforme aumenta la hidrofobicidad del disolvente. Por otro lado, entre menor sea el valor de  $\text{Log } P$ , menor es el grado de afectación sobre la  $K_M$  (figura 42)<sup>(61,64)</sup>. Un fenómeno similar, aunque no con valores de  $K_M$ , se observó en este trabajo, pues con los disolventes con mayores coeficientes de partición la actividad fue menor, mientras que con aquellos que tenían valores negativos del  $\text{Log } P$ , las conversiones bajo las mismas condiciones fueron mejores.



**Figura 42. Representación esquemática para la explicación de la dependencia entre la  $K_M$  y el  $\text{Log } P$  del disolvente.** La flecha gruesa en la parte superior indica la unión fuerte entre el sustrato y la enzima, además de la facilidad de difusión del primero hacia el sitio activo, mientras que la flecha delgada y punteada de la parte inferior muestra la unión débil de el sustrato a la enzima, así como la limitación por parte del disolvente para la difusión al sitio activo de la enzima. Imagen modificada de Kaul, 2008<sup>61</sup>.

Finalmente, un aspecto más que discutir es la diferencia en estabilidad entre la nitrilasa libre e inmovilizada en estos medios, enfocándonos a nivel de estructura cuaternaria. En otras enzimas transformadoras de nitrilos, específicamente la nitrilohidratasa (NHasa) de *G. pallidus* RApc8, se ha observado la función de “puente” de siete moléculas de agua involucradas en el mantenimiento de la geometría de las estructuras diméricas  $\alpha$  y  $\beta$ . Por ello, se

sugiere que la disrupción de moléculas de agua involucradas ya sea en la interfase del dímero o la asociación dímero-dímero, pueden acelerar la inactivación de la enzima *vía* disociación de la estructura cuaternaria. Este fenómeno también se podría extrapolar a la nitrilasa de *R. sp V51B*, ya que en general en todos los disolventes se vio menor actividad en la forma no inmovilizada (figura 40). Por lo tanto, se podría suponer que medios binarios favorecen la disociación de la enzima y la subsecuente pérdida de actividad, y se puede evitar con la estabilización de la estructura cuaternaria por la unión covalente en múltiples puntos de la enzima<sup>(68,69,70)</sup>.

### *Especificidad y selectividad*

Como se mencionó en los antecedentes, una particularidad de la Nit $\Delta$ C328 es su capacidad de hidrolizar nitrilos tanto alifáticos como aromáticos, propiedad que una cantidad reducida de nitrilasas presentan, debido a su alta especificidad por alguno de los tipos principales de nitrilos<sup>(3)</sup>. Con la finalidad de llevar a cabo un análisis más completo, se analizó la especificidad y selectividad de la nitrilasa inmovilizada con un total de 20 sustratos, los cuales se clasificaron en función de sus características estructurales (figura 43). Algunos de estos compuestos son precursores de ácidos carboxílicos de interés industrial o sintones para otro tipo de compuestos relevantes, ejemplo de ello es el nicotinonitrilo, precursor directo del ácido nicotínico o vitamina B3, el cual junto con sus derivados juegan un papel importante como farmacóforos, ejerciendo variedad de actividades biológicas<sup>(71)</sup>. Otro ejemplo es el ácido *p*-clorobenzoico, proveniente del *p*-benzonitrilo, que se ha usado como un indicador de radicales libres<sup>(72)</sup>. Finalmente, se han reportado derivados del ácido 2-fenilpropiónico, el cual se puede obtener a partir de 2-fenilpropionitrilo, los cuales han mostrado propiedades inhibitorias de las ciclooxigenasas (COX) y como agentes antibacterianos<sup>(73)</sup>.



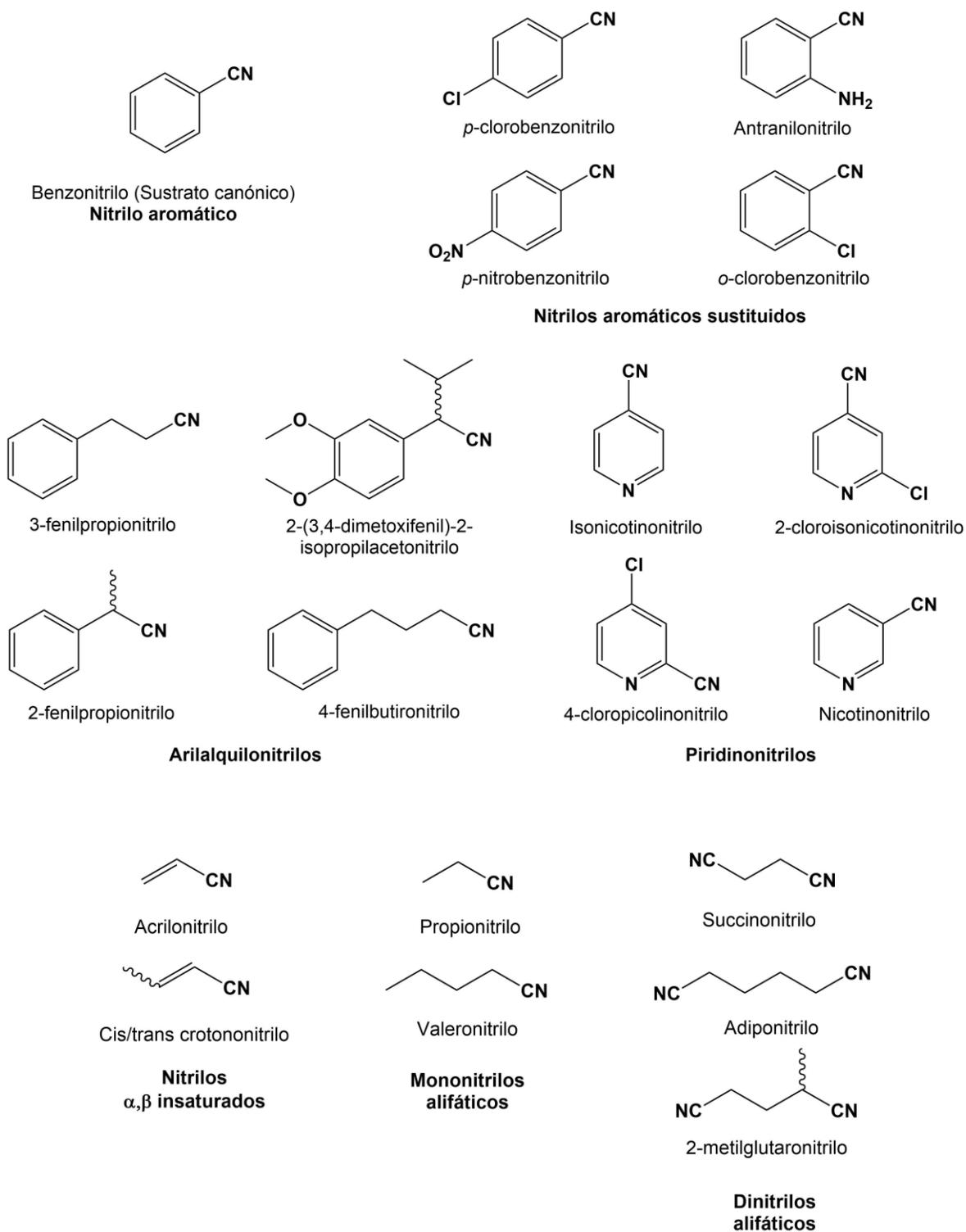


Figura 43. Estructura, nombres triviales y clasificación de los sustratos empleados para la caracterización de la especificidad y selectividad de la nitrilasa inmovilizada.

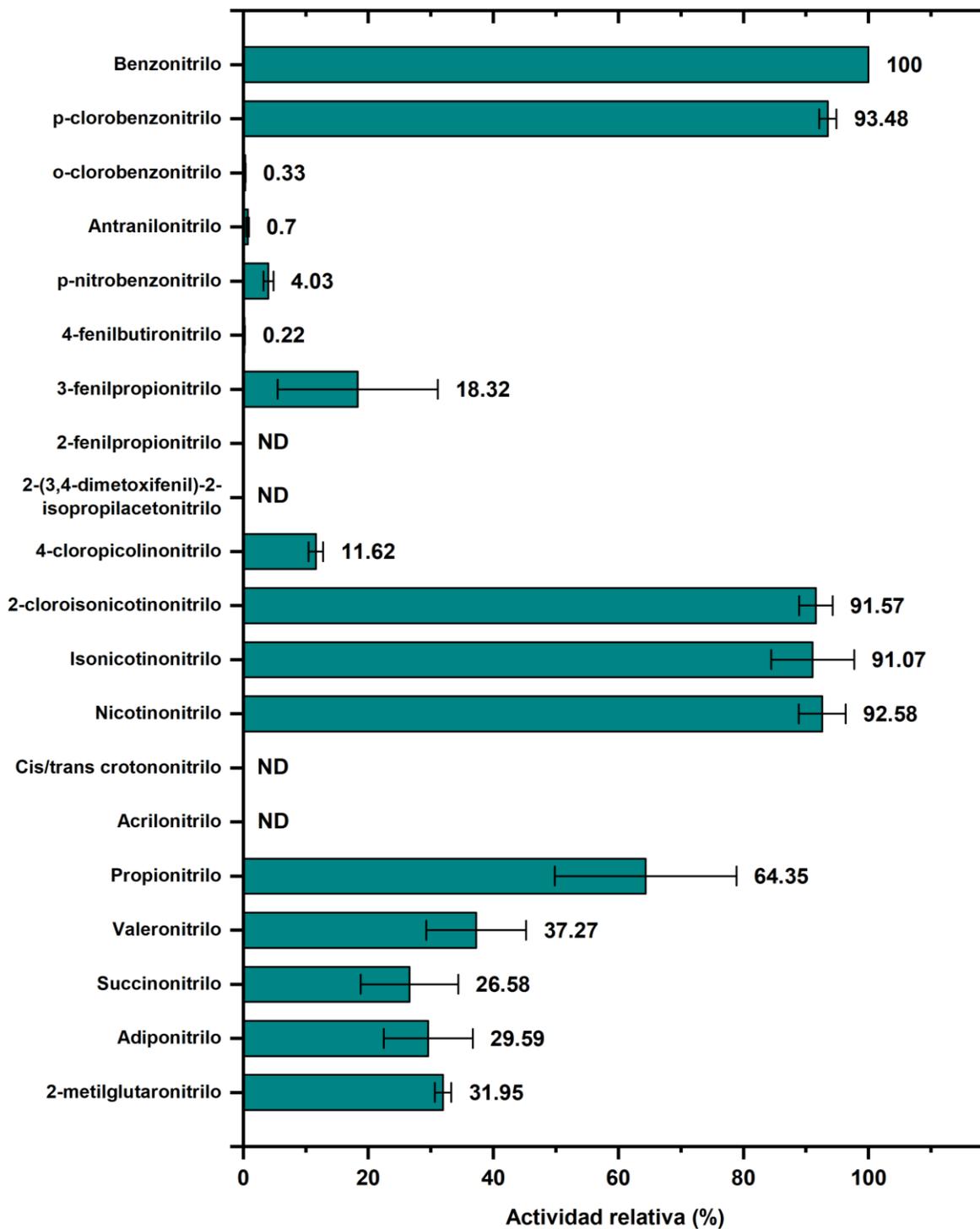
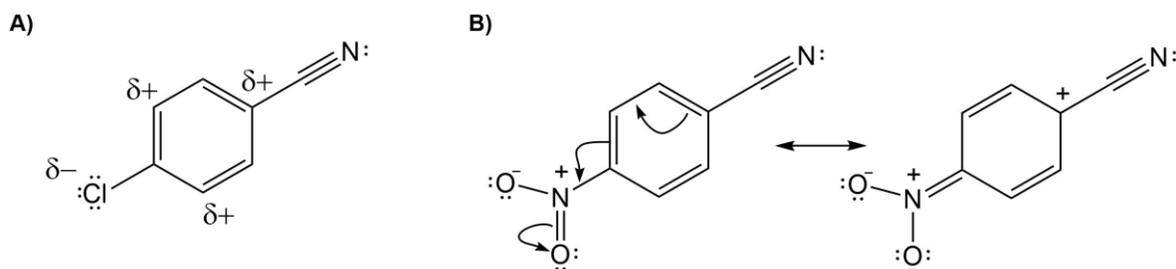


Figura 44. Comparativo de las actividades observadas para los 20 sustratos evaluados con la nitrilasa inmovilizada. ND= No detectable.

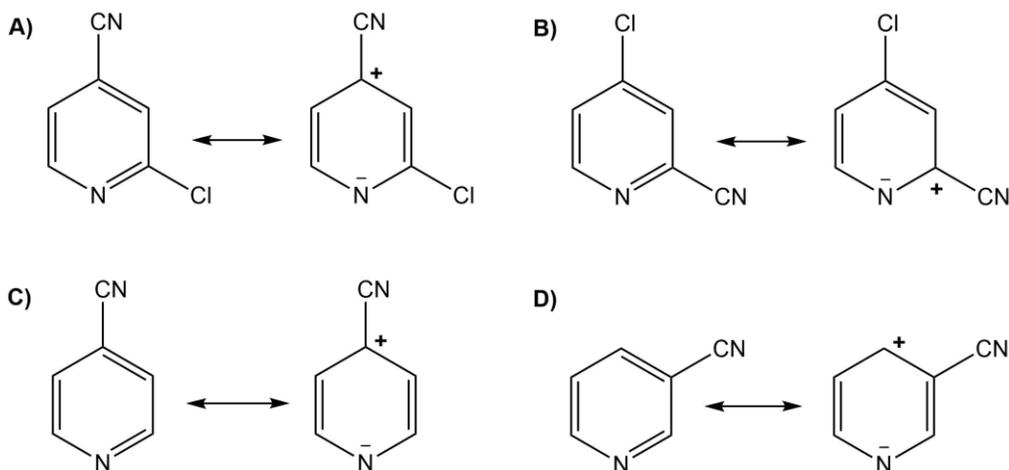
Los resultados muestran que el sustrato preferido de la enzima inmovilizada es el benzonitrilo (figura 44), mismo que se usó durante todo el proceso de caracterización, aunque en general se observó una preferencia por los compuestos aromáticos. Sin embargo, dependiendo de los sustituyentes y los patrones de sustitución, la actividad fue variable. Ejemplo de ello se aprecia en la selectividad que tuvo la enzima sobre dos compuestos isómeros, el *o*-clorobenzonitrilo y el *p*-clorobenzonitrilo, ya que mientras para el primero la actividad fue prácticamente despreciable (de sólo un 0.33%), para el segundo fue apenas un 6% más baja que para el benzonitrilo. La misma escasa actividad se observó con el antranilonitrilo, el cual también presenta una relación *orto* entre los sustituyentes del anillo. Dicho fenómeno se puede atribuir al impedimento estérico que generan los grupos cloro y amino en la posición *orto*<sup>(74,75)</sup>, dificultando que la cisteína catalítica lleve a cabo su papel en una forma eficiente.

Con respecto a la naturaleza del sustituyente, se esperaba que al emplear un nitrilo aromático con un sustituyente que hiciera aún más reactivo a éste (por ejemplo, un grupo nitro), la actividad relativa sería mayor que la vista para el benzonitrilo (figura 45). Sin embargo, contrario a lo esperado, la actividad observada para el *p*-nitrobenzonitrilo fue mucho menor que para el *p*-clorobenzonitrilo, apenas del 4%. Dicho resultado podría atribuirse a los efectos estéricos producidos por parte del grupo nitro, que enmascararían los efectos electrónicos generados por este mismo<sup>(75)</sup>.



**Figura 45. Estructuras con indicaciones de los sitios de mayor inestabilidad para el *p*-clorobenzonitrilo y el *p*-nitrobenzonitrilo.** A) Dipolos que se generan en el anillo aromático por el efecto inductivo del cloro en el *p*-clorobenzonitrilo. B) Estructuras de resonancia para el *p*-nitrobenzonitrilo. La figura de la derecha indica la carga positiva aleadaña al grupo ciano, por la cual se hipotetizaba que se presentaría una mayor actividad.

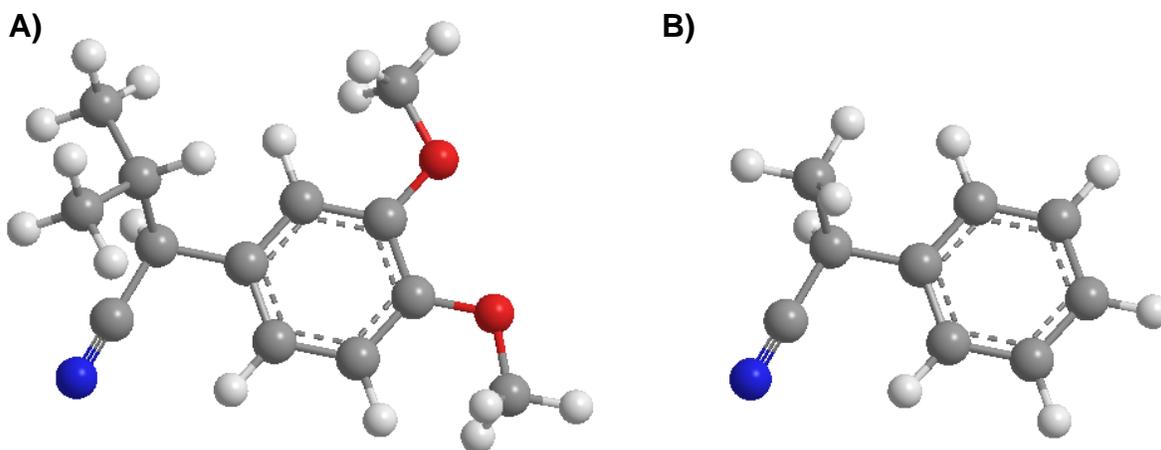
En el caso de los piridinonitrilos, el nitrógeno que se encuentra en el anillo ejerce un efecto electroattractor, por lo que se esperaban actividades altas en todos los casos, particularmente en los que tenían al grupo ciano en posición 2 y 4 con respecto al nitrógeno (figura 46). Esto se cumplió en la mayoría de los casos, excepto con el 4-cloropicolinonitrilo, el cual tiene al grupo ciano en posición 2 con respecto al nitrógeno, hecho que no se ajustó a lo esperado. Dicho resultado podría asociarse con la relación 1,2 que tienen el nitrógeno del anillo y el grupo ciano, asumiendo que el primero tuviera propiedades como un *orto* sustituyente y por ello la disminución en la actividad<sup>(75)</sup>.



**Figura 46. Estructuras de resonancia más importantes para los piridinonitrilos.** Se observa la contribución del nitrógeno para aumentar la reactividad del grupo ciano por generación de cargas en el carbono alfa a este. **A)** 2-cloroisonicotinonitrilo, **B)** 4-cloropicolinonitrilo, **C)** Isonicotinonitrilo y **D)** Nicotinonitrilo, en el cual no se genera una carga en el carbono alfa al ciano en ningún momento.

Analizando los arilalquilonitrilos, se pueden observar dos tendencias: 1) entre más corta la cadena alifática, mayor es la actividad. Ejemplo de ello es que para el 3-fenilpropionitrilo se obtuvo un 18% de actividad relativa, mientras que para el 4-fenilbutionitrilo fue de apenas un 0.22%, 2) la presencia de un sustituyente en el carbono alfa al nitrilo, al menos del tipo alifático, abate completamente la actividad, ya que no se observó conversión alguna del 2-fenilpropionitrilo y el derivado del fenilacetionitrilo empleado, los cuales presentan en el carbono alfa un grupo metilo

y un grupo isopropilo, respectivamente. Este efecto se puede atribuir al impedimento estérico generado por estos grupos, especialmente el isopropilo, el cual es particularmente voluminoso (figura 47). Sin embargo, debido a la falta de más derivados con otros grupos funcionales en el carbono alfa, como aminos o hidroxilos, no se puede definir si también depende de la naturaleza de este sustituyente.



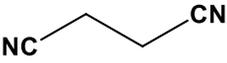
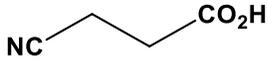
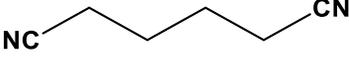
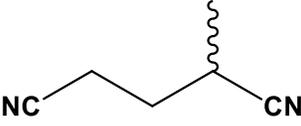
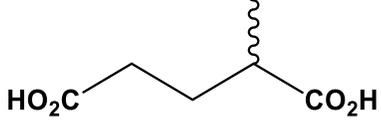
**Figura 47. Estructuras químicas de los derivados del fenilacetnitrilo con sustituyentes alquílicos en el carbono alfa al nitrilo.** Se aprecia el impedimento estérico generado por dichos grupos, particularmente en la figura A. **A)** 2-(3,4-dimetoxifenil)-2-isopropilacetnitrilo y **B)** 2-fenilpropionitrilo.

Por otro lado, a pesar de que las conversiones fueron bajas para los arilalquilnitrilos lineales, el hecho de que sí haya existido actividad constituye una ventaja enorme con respecto a la hidrólisis química de estos compuestos, ya que se intentó hacer en condiciones alcalinas, sin conseguirla a pesar de haberse empleado tiempos excesivos de calentamiento.

Con respecto a los nitrilos  $\alpha,\beta$ -insaturados no se observó actividad alguna, lo cual fue inesperado por el relativo parecido estructural con los nitrilos aromáticos (ambos tipos son planos y presentan conjugación), por lo que se tenía la expectativa de tener una actividad considerable. Este fenómeno ya se había reportado para el acrilonitrilo con la nitrilasa de *R. rhodochrous* J1, la cual sin la adición de sulfato de amonio no mostró conversión alguna, pero tras la adición de la sal al 10% se observó una actividad relativa del 7.45% con respecto al

benzonitrilo<sup>(74)</sup>. Conocido esto, se probó la adición de sulfato de amonio al 10% y también subir la concentración de los nitrilos a 50 mM, suponiendo que la afinidad fuese sumamente baja, sin embargo, no se obtuvo mejoría. En el caso del crotononitrilo, para la misma nitrilasa se reportó una actividad relativa del 1.7% sin sal y del 11.5% con sal en el medio<sup>(74,76)</sup>, aunque en este estudio tampoco se observó transformación alguna con la nitrilasa inmovilizada para este sustrato.

Finalmente, en relación con los nitrilos alifáticos, la tendencia vista fue que entre más corto el nitrilo, mayor la actividad presentada hacia este, ya que la conversión que se presentó para el propionitrilo fue, en términos prácticos, casi el doble que la vista para el valeronitrilo. Por otro lado, con los dinitrilos no se observó una diferencia significativa en la velocidad de conversión de los tres probados, pero sí en la cantidad de grupos ciano hidrolizados (cuadro 7).

Nombre y estructura del nitrilo empleado	Moléculas de amonio liberadas	Nombre y estructura del producto obtenido
 Succinonitrilo	1	 Ácido 4-cianopropiónico
 Adiponitrilo	2	 Ácido adípico
 2-metilglutaronitrilo	2	 Ácido 2-metilglutárico

**Cuadro 7. Productos obtenidos, de acuerdo con la cantidad de amonio liberado, de la hidrólisis enzimática de los dinitrilos.**

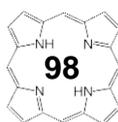
Por el comportamiento observado, podemos asumir que la cantidad de carbonos máxima que puede haber entre los dos grupos ciano para que se consiga la monohidrólisis es de dos, ya que al elevar esta cantidad se dio la hidrólisis de los dos grupos ciano, es decir, ya no es regioselectiva. Este comportamiento también

se ha observado en la nitrilasa de *R. rhodochrous* N.C.I.B. 11216, mientras que en la de *Arabidopsis thaliana* se presenta regioselectividad hasta con cuatro carbonos entre los grupos ciano para conseguir la monohidrólisis<sup>(77,78)</sup>.

Otro aspecto más que se evaluó con estos compuestos fue la enantioselectividad, ya que el 2-metilglutaronitrilo es un compuesto quiral, por lo que se esperaba que la conversión de este no fuera total. Sin embargo, fue completa, lo que sugiere que la enzima, al menos en su forma inmovilizada, no es enantioselectiva. A pesar de ello, se requiere mayor información a nivel de estructura de los productos para confirmar esa premisa, ya que, aunque se hicieron intentos por obtener muestras para determinar por métodos espectroscópicos de mayor alcance su estructura, como RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C y polarimetría, la inhibición a concentraciones altas (mayores a 7.5 mM) de estos sustratos que presentó la enzima dificultó su aislamiento, debido a su alta solubilidad en agua.

#### *Determinación de parámetros cinéticos $K_M$ y $V_{máx}$*

Finalmente, se determinaron los parámetros cinéticos para la enzima inmovilizada y se compararon con los de la enzima libre. Al igual que con otras mutantes de la nitrilasa silvestre, la Nit $\Delta$ C328 muestra una cinética que no se ajusta a un modelo de Michaelis-Menten, sino a uno de Hill, en el que se aprecian los efectos de cooperatividad<sup>(79)</sup>. Haciendo un análisis visual de los gráficos de las cinéticas de la nitrilasa libre e inmovilizada, se observa el cambio en la cooperatividad que implicó la inmovilización, ya que con la enzima libre se construye una curva con forma sigmoidea (figura 48-A), indicativo de una cooperatividad positiva, con un coeficiente de Hill ( $n_H$ ) de 2.40 (cuadro 8), similar al reportado para otras enzimas de la superfamilia nitrilasa<sup>(80)</sup>. Por otro lado, la nitrilasa inmovilizada arroja una curva hiperbólica (figura 48-B), que significa una cooperatividad negativa, con un  $n_H$  de 0.63. En términos de estructura y función, estos valores quieren decir que en el caso de la nitrilasa libre, conforme se une una molécula de sustrato a alguna unidad del oligómero, la afinidad por este va



umentando y por ello el valor de  $n_H$  es mayor a 1. En el caso contrario, que es en el de la nitrilasa inmovilizada, al determinarse un valor de  $n_H$  menor a 1, la unión de una primer molécula de sustrato hace que se disminuya la afinidad por una segunda<sup>(48)</sup>. Dicha transición se puede atribuir a que la inmovilización, por ser un proceso no homogéneo, produce heterogeneidad de sitios catalíticos, lo que en una disminución en el coeficiente de Hill por la variación en la afinidad por sustrato<sup>(81)</sup>.

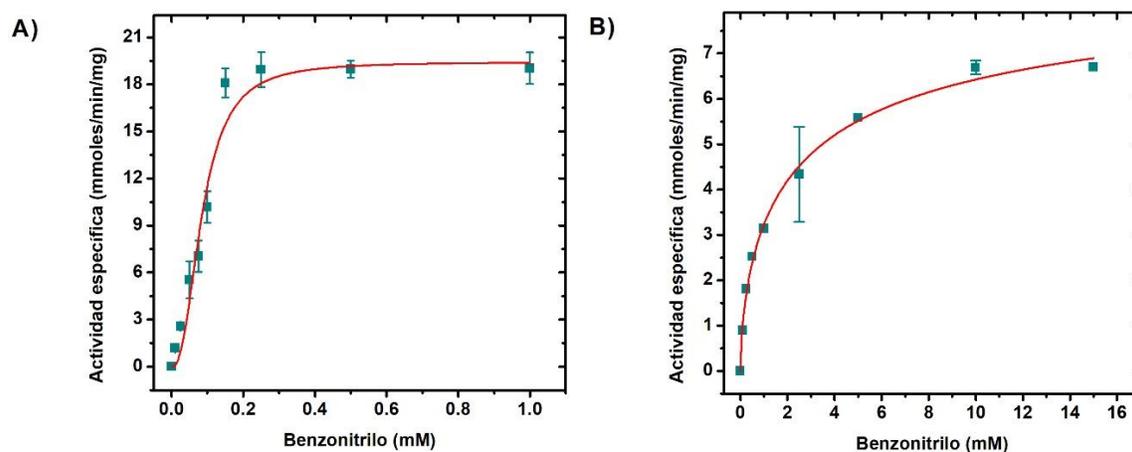
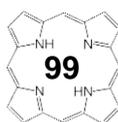


Figura 48. Cinética enzimática de la nitrilasa libre (A) y la nitrilasa inmovilizada (B). La línea roja corresponde al ajuste a un modelo de Hill.

	Nitrilasa libre	Nitrilasa inmovilizada	Relación Nit CLEA/Nit libre
$K_M$ (mM)	$0.09 \pm 0.01$	$2.62 \pm 1.05$	29.11
$V_{m\acute{a}x}$ (mmol/min/mg)	$19.79 \pm 1.09$	$9.17 \pm 0.98$	0.46
$n_H$	$2.40 \pm 0.54$	$0.63 \pm 0.07$	-
$r^2$ del ajuste	0.964	0.994	-

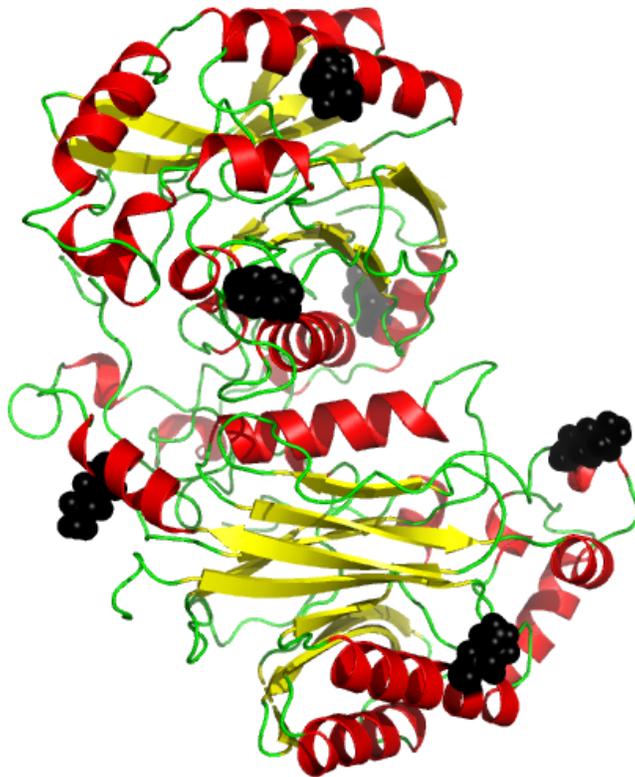
Cuadro 8. Parámetros cinéticos para la nitrilasa libre e inmovilizada.

Con respecto a la afinidad y a la velocidad máxima de catálisis que puede alcanzar la enzima en sus dos formas, en ambos criterios la inmovilización involucra una pérdida, un resultado en cierto modo esperado por la naturaleza sensible de las nitrilasas a estos procesos<sup>(31)</sup>. En términos de proporciones, la



enzima tras la inmovilización presentó una  $K_M$  29 veces mayor que la que tenía previamente, lo que indica una pérdida de afinidad mayor en un orden de magnitud. Por otro lado, la velocidad máxima que puede alcanzar la enzima inmovilizada es cercana a la mitad de la que tiene la enzima libre (cuadro 8).

Estos resultados también podemos atribuirlos a que existe una baja cantidad de lisinas que no forman parte de los sitios de interacción entre subunidades (3 por monómero), ni de regiones internas de la nitrilasa como el pocket catalítico (figura 49), las cuales son las que sufren la modificación tras la inmovilización. Se ha encontrado que las enzimas que tienen menor número de lisinas son más propensas a la inactivación<sup>(82)</sup>, lo cual pudo haber sido un factor importante que repercutió en los valores obtenidos de  $K_M$ ,  $V_{m\acute{a}x}$  y  $n_H$ .



**Figura 49. Modelo construido por homología de un dímero de la Nit $\Delta$ C328 de *Rhodococcus* sp V51B. Se resaltan en negro las lisinas que se encuentran en las superficies expuestas a la inmovilización.**

*Discusión final de la inmovilización y la caracterización cinética de la Nit $\Delta$ C328*

La primera observación científica que condujo al descubrimiento de las enzimas inmovilizadas fue en 1916, cuando se demostró que la invertasa exhibía la misma actividad en su forma disuelta que cuando se absorbía en un sólido como el carbón activado o el hidróxido de aluminio. Desde entonces la inmovilización de enzimas se ha estudiado ampliamente, al grado que desde 1960 a la fecha se han publicado más de 5,000 publicaciones y patentes en esta área, lo cual demuestra el continuo interés en estas técnicas<sup>(83)</sup>.

Los resultados y su respectiva discusión demuestran los pros y los contras que conllevó la inmovilización por formación de CLEAs de la nitrilasa empleada en este estudio. Dentro de las desventajas se encontraron la pérdida de afinidad y velocidad máxima de catálisis con respecto a la enzima libre, lo que podría implicar mayores tiempos de operación en un proceso dado. Sin embargo, algunas propiedades mejoraron considerablemente, tales como su tolerancia a disolventes hidrofílicos en mezclas binarias, particularmente a la DMF y la acetona, la estabilidad mecánica, e incluso aumentó en 10 °C la temperatura media de fusión a la cual la enzima libre ya no presentó actividad alguna, mostrándonos estos resultados las indiscutibles ventajas de la estabilización de una enzima mediante su inmovilización.

Otra desventaja importante, aunque que ya no correspondiente al método, sino a la enzima empleada en este estudio, es la falta de estereoselectividad de esta, al menos en su forma inmovilizada, ya que dicha propiedad se considera crucial para su aplicación en un proceso, pues es uno de los principales motivos por lo que se opta por la biocatálisis sobre la síntesis química convencional.

Por otro lado, un aspecto más a considerar es que la metodología diseñada, además de ser mejor que las que se emplearon como referencia, es aplicable para la inmovilización de otras nitrilasas u otras enzimas, ya que, bajo una metodología semejante en la que únicamente se ajustó la cantidad de sulfato de amonio empleado para la agregación proteica, se logró inmovilizar una cianuro

dihidratasa, mejorando significativamente sus propiedades, con lo que se demuestra la extensibilidad del método.

Finalmente, a pesar de que los resultados mostraron mayores ventajas que desventajas aún quedan muchos elementos por estudiarse, algunos inherentes a la enzima, como mutaciones que permitan ampliar el rango de sustratos sobre los que tiene acción la enzima, y otros relacionadas con la matriz soporte y el proceso de inmovilización, tales como probar otros aditivos y condiciones, todo esto con la finalidad de optimizar aún más a este biocatalizador, consiguiendo que tenga una robustez idónea para una potencial aplicación en una industria que está creciendo a pasos agigantados, la biotecnológica y, en específico, la biocatálisis.

## **Conclusiones**

- Se optimizaron las condiciones de sobreexpresión de la nitrilasa Nit $\Delta$ C328 de *Rhodococcus* sp V51B.
- Se definieron como condiciones óptimas de inmovilización la precipitación salina y el entrecruzamiento con DPA de 150 kDa.
- Se mejoraron las estabildades operacional, cinética y termodinámica de la enzima con su inmovilización por entrecruzamiento.
- En bajas concentraciones de disolvente, existe una correlación entre la actividad observada para nitrilasa inmovilizada y la constante dieléctrica y el coeficiente de partición del disolvente empleado.
- Se determinó la especificidad y selectividad de la nitrilasa inmovilizada, mostrándose una alta preferencia por sustratos aromáticos que no estén sustituidos en posiciones *orto*.
- La nitrilasa inmovilizada mostró regioselectividad para la monohidrólisis de dinitrilos con compuestos de hasta cuatro carbonos de longitud.
- La inmovilización de Nit $\Delta$ C328 implicó una reducción de 29 veces menor afinidad por el benzonitrilo y una disminución a la mitad de la velocidad máxima de catálisis, así como una transición de cooperatividad positiva a cooperatividad negativa.
- El método de inmovilización es aplicable a otro tipo de nitrilasas, sólo siendo necesarios algunos ajustes como la saturación de sulfato de amonio a emplear para la agregación proteica.

## **Perspectivas**

- Optimizar aún más las condiciones de inmovilización con el uso de nuevos aditivos y condiciones, tales como la adición de sustrato para promover la oligomerización y llevarla a cabo en condiciones alcalinas.
- Analizar por microscopía diferencial de barrido las características físicas de los entrecruzados.
- Caracterizar con un rango más amplio de sustratos la especificidad y selectividad de la nitrilasa inmovilizada.
- Desarrollar métodos analíticos de mayor alcance para identificación y cuantificación más precisa de los productos de hidrólisis.
- Aplicar el método de inmovilización diseñado a otras nitrilasas de enantioselectividad conocida.
- Diseñar un proceso en cascada para la producción de derivados de ácido ópticamente activos al acoplar el sistema nitrilasa con una lipasa.

## Referencias

1. Buchholz K, Collins J. The roots - A short history of industrial microbiology and biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2013;97(9):3747–62.
2. Thuku RN, Brady D, Benedik MJ, Sewell BT. Microbial nitrilases: Versatile, spiral forming, industrial enzymes. *J Appl Microbiol.* 2009;106(3):703–27.
3. Gong JS, Lu ZM, Li H, Shi JS, Zhou ZM, Xu ZH. Nitrilases in nitrile biocatalysis: Recent progress and forthcoming research. *Microb Cell Fact.* 2012;11(1):1.
4. Duque J. *Biotecnología: Panorama de un sector.* La Coruña, España: Netbiblo; 2010. 112 p.
5. Patel RN. *Biocatalysis in the Pharmaceutical and Biotechnology Industries.* Patel RN, editor. London: CRC Press; 2006. 893 p.
6. Montiel C, Bustos I. Procesos enzimáticos amigables con el ambiente. *Revista Digital Universitaria.* 2014;15:1–9.
7. Berg J, Tymoczko J, Stryer L. *Biochemistry.* 7a ed. New York: W.H Freeman and Company; 2012. 1224 p.
8. Sheldon RA, Van Rantwijk F. *Biocatalysis for Sustainable Organic Synthesis.* *Aust J Chem.* 2004;57:281–9.
9. Pace HC, Brenner C. The nitrilase superfamily: classification, structure and function. *Genome Biol.* 2001;2(1):1–9.
10. Singh R, Sharma R, Tewari N, Geetanjali, Rawat DS. Nitrilase and its application as a “green” catalyst. *Chem Biodivers.* 2006;3(12):1279–87.
11. Raczynska JE, Vorgias CE, Antranikian G, Rypniewski W. Crystallographic analysis of a thermoactive nitrilase. *J Struct Biol.* 2011;173(2):294–302.
12. Zhang L, Yin B, Wang C, Jiang S, Wang H, Yuan YA, et al. Structural insights into enzymatic activity and substrate specificity determination by a single amino acid in nitrilase from *Syechocystis* sp. PCC6803. *J Struct Biol.* 2014;188(2):93–101.
13. Sewell BT, Thuku RN, Zhang X, Benedik MJ. Oligomeric structure of nitrilases: Effect of mutating interfacial residues on activity. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1056:153–9.
14. Thuku RN, Weber BW, Varsani A, Sewell BT. Post-translational cleavage of recombinantly expressed nitrilase from *Rhodococcus rhodochrous* J1 yields a stable, active helical form. *FEBS J.* 2007;274(8):2099–108.
15. Jandhyala D, Berman M, Meyers PR, Sewell T, Willson RC, Benedik MJ, et al. CynD , the Cyanide Dihydratase from *Bacillus pumilus*: Gene Cloning

- and Structural Studies CynD , the Cyanide Dihydratase from *Bacillus pumilus*: Gene Cloning and Structural Studies. Society. 2003;69(8):4794–805.
16. Kimani SW, Agarkar VB, Cowan DA, Sayed MFR, Sewell BT. Structure of an aliphatic amidase from *Geobacillus pallidus* RAPc8. Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr. 2007;63(10):1048–58.
  17. Fernandes BCM, Mateo C, Kiziak C, Chmura A, Wacker J, Van Rantwijk F, et al. Nitrile hydratase activity of a recombinant nitrilase. Adv Synth Catal. 2006;348(18):2597–603.
  18. Jiang S, Zhang L, Yao Z, Gao B, Wang H, Mao X, et al. Switching a nitrilase from *Syechocystis* sp. PCC6803 to a nitrile hydratase by rationally regulating reaction pathways. Catal Sci Technol. 2017;7(5):1122–8.
  19. Kiziak C, Conradt D, Stolz A, Mattes R, Klein J. Nitrilase from *Pseudomonas fluorescens* EBC191: Cloning and heterologous expression of the gene and biochemical characterization of the recombinant enzyme. Microbiology. 2005;151(11):3639–48.
  20. Bhalla TC, Miura A, Wakamoto A, Ohba Y, Furuhashi K. Asymmetric hydrolysis of  $\alpha$ -aminonitriles to optically active amino acids by a nitrilase of *Rhodococcus rhodochrous* PA-34. Appl Microbiol Biotechnol. 1992;37:184–190.
  21. Ye Q, Bao J, Jian-Jiang Z. Bioreactor Engineering Research and Industrial Applications I. Vol. 155, Advances in biochemical engineering/biotechnology. 2016. 247 p.
  22. Sophie Bergeron, David A. Chaplin, John H. Edwards †, Brian S. W. Ellis †, Catherine L. Hill, Karen Holt-Tiffin \*, et al. Nitrilase-Catalysed Desymmetrisation of 3-Hydroxyglutaronitrile: Preparation of a Statin Side-Chain Intermediate. Org Process Res Dev. 2006;10(3):2002–6.
  23. Thayer AM. Competitors Want to Get a Piece of Lipitor. Chem Eng News. 2006;84(33):26–7.
  24. Brena B, González-Pombo P, Batista-Viera F. Immobilization of enzymes: a literature survey. Methods Mol Biol. 2013;1051:15–31.
  25. Iyer P V., Ananthanarayan L. Enzyme stability and stabilization-Aqueous and non-aqueous environment. Process Biochem. 2008;43(10):1019–32.
  26. Minteer SD. Enzyme Stabilization and Immobilization. Methods and Protocols. Minteer SD, editor. St. Louis, USA: Humana Press; 2011. 229 p.
  27. Hanefeld U, Gardossi L, Magner E. Understanding enzyme immobilisation. Chem Soc Rev. 2009;38(2):453–68.
  28. Singh RK, Tiwari MK, Singh R, Lee JK. From protein engineering to immobilization: Promising strategies for the upgrade of industrial enzymes.

- Int J Mol Sci. 2013;14(1):1232–77.
29. Sheldon RA. Enzyme immobilization: The quest for optimum performance. *Adv Synth Catal.* 2007;349(8–9):1289–307.
  30. Ma X, Sun X, Hargrove D, Chen J, Song D, Dong Q, et al. A Biocompatible and Biodegradable Protein Hydrogel with Green and Red Autofluorescence: Preparation, Characterization and in Vivo Biodegradation Tracking and Modeling. *Sci Rep.* 2016;6(July 2015):1–12.
  31. Sheldon RA. Cross-linked enzyme aggregates as industrial biocatalysts. *Org Process Res Dev.* 2011;15(1):213–23.
  32. Mateo C, Palomo JM, Van Langen LM, Van Rantwijk F, Sheldon RA. A New, Mild Cross-Linking Methodology to Prepare Cross-Linked Enzyme Aggregates. *Biotechnol Bioeng.* 2004;86(3):273–6.
  33. Nuijens T, Cusan C, Kruijtz JAW, Rijkers DTS, Liskamp RMJ, Quaedflieg PJLM. Versatile selective  $\alpha$ -carboxylic acid esterification of N-protected amino acids and peptides by alcalase. *Synthesis (Stuttg).* 2009;(5):809–14.
  34. Illanes A, Wilson L, Caballero E, Fernández-Lafuente R, Guisán JM. Crosslinked penicillin acylase aggregates for synthesis of  $\beta$ -lactam antibiotics in organic medium. *Appl Biochem Biotechnol.* 2006;133(3):189–202.
  35. Tudorache M, Nae A, Coman S, Parvulescu VI. Strategy of cross-linked enzyme aggregates onto magnetic particles adapted to the green design of biocatalytic synthesis of glycerol carbonate. *RSC Adv.* 2013;3(12):4052.
  36. Chmura A, Rustler S, Paravidino M, Van Rantwijk F, Stolz A, Sheldon RA. The combi-CLEA approach: Enzymatic cascade synthesis of enantiomerically pure (S)-mandelic acid. *Tetrahedron Asymmetry.* 2013;24(19):1225–32.
  37. Maia J, Evangelista, Marta B, Gil, Helena, Ferreira L. Dextran-based materials for biomedical applications. M.H.Gil, editor. *Carbohydrates applications in Medicine.* Kerala: Research Signpost; 2014. 31-53 p.
  38. Leyva Hernández E. Clonación y expresión del gen NitA de *Rhodococcus pyridinovorans*.pdf. Universidad Nacional Autónoma de México; 2009.
  39. Gómez Aguilar A. Estructuración y activación de la nitrilasa de *Rhodococcus* sp V51b inducidas por modificaciones en el extremo C-terminal. Universidad Nacional Autónoma de México; 2016.
  40. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 1985;150(1):76–85.
  41. Bolleter WT, Bushman CJ, Tidwell PW. Spectrophotometric Determination of Ammonia as Indophenol. *Anal Chem.* 1961;33(4):592–4.
  42. Afkhami A, Norooz-Asl R. Micelle-mediated extraction and

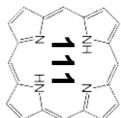
- spectrophotometric determination of ammonia in water samples utilizing indophenol dye formation. *J Braz Chem Soc.* 2008;19(8):1546–52.
43. Kaul P, Stolz A, Banerjee UC. Cross-linked amorphous nitrilase aggregates for enantioselective nitrile hydrolysis. *Adv Synth Catal.* 2007;349(13):2167–76.
  44. Beignet JCSR, Collier SJ, Dakin J, Evano G. *Science of Synthesis: Houben-Weyl. Methods of molecular transformations.* Vol. 20a, Thieme. New York: Thieme; 2006. 638 p.
  45. Banerjee A, Sharma R, Banerjee UC. A rapid and sensitive fluorometric assay method for the determination of nitrilase activity. *Biotechnol Appl Biochem.* 2003;37(3):289.
  46. Seffernick JL, Samanta SK, Louie TM, Wackett LP, Subramanian M. Investigative mining of sequence data for novel enzymes: A case study with nitrilases. *J Biotechnol.* 2009;143(1):17–26.
  47. Bassetti FJ, Bergamasco R, Moraes FF, Zanin GM. Thermal stability and deactivation energy of free and immobilized invertase. *Brazilian J Chem Eng.* diciembre de 2000;17(4–7):867–72.
  48. Cattoni DI, Chara O, Kaufman SB, Flecha FLG. Cooperativity in binding processes: New insights from phenomenological modeling. *PLoS One.* 2015;10(12):1–14.
  49. Guisan J. *Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells.* Segunda. Walker J, editor. Nueva Jersey: Humana Press; 2006. 449 p.
  50. Green AA, Hughes WL. Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous solutions of salts and organic solvents. *Methods Enzymol.* 1955;1(C):67–90.
  51. Wingfield PT. Protein Precipitation Using Ammonium Sulfate. *Curr Protoc Protein Sci.* 2001;1–10.
  52. Pawar S V., Yadav GD. Enantioselective enzymatic hydrolysis of rac-mandelonitrile to r -mandelamide by nitrile hydratase immobilized on poly(vinyl alcohol)/chitosan- glutaraldehyde support. *Ind Eng Chem Res.* 2014;53(19):7986–91.
  53. Klivanov AM. Stabilization of Enzymes against Thermal Inactivation. *Adv Appl Microbiol.* 1983;29(C):1–28.
  54. Bromberg A, Marx S, Frishman G. Kinetic study of the thermal inactivation of cholinesterase enzymes immobilized in solid matrices. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics.* 2008;1784(6):961–6.
  55. Balcão VM, Vila MMDC. Structural and functional stabilization of protein entities: State-of-the-art. *Adv Drug Deliv Rev.* 2015;93:25–41.
  56. Tsou CL. Location of the active sites of some enzymes in limited and flexible

- molecular regions. Trends Biochem Sci. 1986;11(10):427–9.
57. Fromm HJ. Initial Rate Enzyme Kinetics. 1a ed. Vol. 32, Molecular biology, biochemistry, and biophysics. Berlín: Springer-Verlag; 1975. 324 p.
  58. Park JM, Trevor Sewell B, Benedik MJ. Cyanide bioremediation: the potential of engineered nitrilases. Appl Microbiol Biotechnol. 2017;101(8):3029–42.
  59. Stepankova V, Bidmanova S, Koudelakova T, Prokop Z, Chaloupkova R, Damborsky J. Strategies for stabilization of enzymes in organic solvents. ACS Catal. 2013;3(12):2823–36.
  60. Smallwood IM. Handbook of organic solvent properties. Int J Adhes Adhes. 1997;17(2):177.
  61. Kaul P, Banerjee UC. Predicting enzyme behavior in nonconventional media: Correlating nitrilase function with solvent properties. J Ind Microbiol Biotechnol. 2008;35(7):713–20.
  62. Affleck R, Haynes CA, Clark DS. Solvent dielectric effects on protein dynamics. Biochemistry. 1992;89(June):5167–70.
  63. Carrea G, Riva S. Properties and Synthetic Applications of Enzymes in Organic Solvents. Angew Chem Int Ed Engl. 2000;39:2226–54.
  64. Ryu K, Dordick JS. How do the organic solvent affect peroxidase structure and function? Biochemistry. 1992;31(9):2588–98.
  65. Wu JC, Lee SS, Mahmood MMB, Chow Y, Talukder MMR, Choi WJ. Enhanced activity and stability of immobilized lipases by treatment with polar solvents prior to lyophilization. J Mol Catal B Enzym. 2007;45(3–4):108–12.
  66. Klibanov AM. Improving enzymes by using them in organic solvents. Nature. 2001;409(6817):241–6.
  67. Serdakowski AL, Dordick JS. Enzyme activation for organic solvents made easy. Trends Biotechnol. 2008;26(1):48–54.
  68. Chiyanzu I, Cowan DA, Burton SG. Immobilization of *Geobacillus pallidus* RAPc8 nitrile hydratase (NHase) reduces substrate inhibition and enhances thermostability. J Mol Catal B Enzym. 2010;63(3–4):109–15.
  69. Fernandez-Lafuente R, Hernández-Jústiz O, Mateo C, Terreni M, Alonso J, Garcia-López JL, et al. Stabilization of a tetrameric enzyme ( $\alpha$ -amino acid ester hydrolase from *Acetobacter turbidans*) enables a very improved performance of ampicillin synthesis. J Mol Catal - B Enzym. 2001;11(4–6):633–8.
  70. Fernandez-Lafuente R. Stabilization of multimeric enzymes: Strategies to prevent subunit dissociation. Enzyme Microb Technol. 2009;45(6–7):405–18.
  71. Sinthupoom N, Prachayasittikul V, Prachayasittikul S, Ruchirawat S, Prachayasittikul V. Nicotinic acid and derivatives as multifunctional

- pharmacophores for medical applications. *Eur Food Res Technol.* 2014;240(1):1–17.
72. Pi Y, Schumacher J, Jekel M. The use of para-chlorobenzoic acid (pCBA) as an ozone/hydroxyl radical probe compound. *Ozone Sci Eng.* 2005;27(6):431–6.
  73. Karaca Gençer H, Acar Çevik U, Kaya Çavuşoğlu B, Sağlık BN, Levent S, Atlı Ö, et al. Design, synthesis, and evaluation of novel 2-phenylpropionic acid derivatives as dual COX inhibitory-antibacterial agents. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2017;32(1):732–45.
  74. Kobayashi M, Nagasawa T, Yamada H. Nitrilase of *Rhodococcus rhodochrous* J1: Purification and characterization. *Eur J Biochem.* 1989;182(2):349–56.
  75. Mahadevan S, Thimann V. Nitrilase II. Substrate Specificity and Possible Mode of Action. *Arch Biochem Biophys.* 1964;107:62–8.
  76. Nagasawa T, Wieser 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(1):138–44.
  77. Bengis-Garber C, Gutman A. Selective hydrolysis of dinitriles into cyano-carboxylic acids by *Rhodococcus rhodochrous* N.C.I.B. 11216. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1989;32:11–6.
  78. Effenberger F, Oßwald S. Selective hydrolysis of aliphatic dinitriles to monocarboxylic acids by a nitrilase from *Arabidopsis thaliana*. *Synthesis (Stuttg).* 2001;(12):1866–72.
  79. Quintana JC. Caracterización cinética y estructural de una mutante carboxilo-terminal de la nitrilasa de *Rhodococcus pyridinovorans*. UNAM; 2015.
  80. Piotrowski M, Janowitz T, Kneifel H. Plant C-N hydrolases and the identification of a plant N-carbamoylputrescine amidohydrolase involved in polyamine biosynthesis. *J Biol Chem.* 2003;278(3):1708–12.
  81. Solomatin S V., Greenfeld M, Herschlag D. Implications of Molecular Heterogeneity for the Cooperativity of Biological Macromolecules. *Nat Struct Mol Biol.* 2011;18(6):732–4.
  82. Dwevedi A. *Enzyme Immobilization: Advances in Industry, Agriculture, Medicine and the Environment.* Suecia: Springer; 2016. 132 p.
  83. Homaei AA, Sariri R, Vianello F, Stevanato R. Enzyme immobilization: An update. *J Chem Biol.* 2013;6(4):185–205.

Compuesto	Longitudes de onda de máxima absorción (nm) / Absorbancia	Compuesto	Longitudes de onda de máxima absorción (nm) / Absorbancia
2-(3,4-dimetoxifenil)-2-isopropilacetoniitrilo	228	Ácido 2-(3,4-dimetoxifenil)-2-isopropilacético	ND
2-cloroisonicotinonitrilo	212 (2.563), 221 (2.597), 286 (3.102)	Ácido 2-cloroisonicotínico	204 (3.562), 213 (3.597), 217 (3.581)
2-fenilpropionitrilo	206 (2.222), 212 (2.152)	Ácido 2-fenilpropiónico	ND
2-metilglutaronitrilo	194 (0.086), 196 (0.077)	Ácido 2-metilglutárico	192 (0.028), 214 (0.069)
3-fenilpropionitrilo	206 (2.178), 209 (2.115)	Ácido 3-fenilpropiónico	ND
4-cloropicolinonitrilo	219 (3.358), 229 (>4)	Ácido 4-cloropicolínico	206 (3.594), 217 (2.898), 228 (3.188)
4-fenilpropionitrilo	206 (2.188), 213 (2.119)	Ácido 4-fenilbutírico	ND
Acronitrilo	203 (2.062), 205 (2.097)	Ácido acrílico	ND
Adiponitrilo	193 (0.073)	Ácido adípico	197 (0.265)
Antranilonitrilo	220 (3.269), 243 (3.484)	Ácido antranílico	214 (3.078), 230 (3.129), 327 (2.772)
Crotononitrilo	206 (2.244), 215 (2.198)	Ácido crotónico	ND
Isonicotinonitrilo	207 (2.918), 209 (2.893), 217 (2.731)	Ácido isonicotínico	205 (3.592), 212 (3.661), 261 (3.567)
Nicotinonitrilo	219 (3.253), 226 (3.373)	Ácido nicotínico	205 (3.514), 214 (3.512), 260 (3.58)
o-clorobenzonitrilo	213 (2.798), 229 (3.636)	Ácido o-clorobenzoico	205 (3.45), 220 (3.385), 228 (3.468)
p-clorobenzonitrilo	207 (2.904), 230 (3.904), 243 (3.649)	Ácido p-clorobenzoico	206 (3.508), 222 (3.716), 243 (3.967)
p-nitrobenzonitrilo	212 (3.551), 237 (>4), 272 (>4)	Ácido p-nitrobenzoico	ND
Propionitrilo	196 (0.128), 194 (0.124)	Ácido propiónico	197 (0.01)
Succinonitrilo	194 (0.09)	Ácido succínico	192 (0.05)
Valeronitrilo	193 (0.122)	Ácido valérico	192 (0.023), 220 (0.01)

Cuadro 9. Máximos de absorción determinados para todos los compuestos analizados. ND= No determinado.





Compuesto	Proporción de elución buffer – acetonitrilo	Longitud de onda de detección (nm)	Tiempo de retención (min)	Pendiente ( $\beta_1$ )	Ordenada al origen ( $\beta_0$ )	Coefficiente de determinación ( $r^2$ )
Ácido 2-(3,4-dimetoxifenil)-2- isopropilacético	60:40	228	ND	ND	ND	ND
2-(3,4-dimetoxifenil)-2- isopropilacetónitrilo			6.52			
Ácido 2-cloroisonicotínico	80:20	220	2.07	1395414.2	-8475.2	0.9960
2-cloroisonicotinonitrilo			5.96	1573269.8	-6403.0	0.9939
Ácido 2-fenilpropiónico	60:40	213	ND	ND	ND	ND
2-fenilpropionitrilo			4.64	1214804.1	-10933.0	0.9986
Ácido 3-fenilpropiónico	60:40	213	2.21	ND	ND	ND
3-fenilpropionitrilo			3.67	1649339.6	-31069.0	0.9948
Ácido 4-cloropicolínico	80:20	220	1.29	1398900.5	-33920.2	0.9997
4-cloropicolinonitrilo			5.71	1748037.8	20471.6	0.9805
Ácido 4-fenilbutírico	80:20	213	3.01	ND	ND	ND
4-fenilbutironitrilo			5.75	2220687.6	-67027.8	0.9978
Ácido acrílico	95:5	205	ND	ND	ND	ND
Acrlonitrilo			2.33			
Ácido antranílico	70:30	220	1.89	6120837.0	29105.0	0.9991
Antranilonitrilo			3.05	4591501.6	224.5	0.9991
Ácido benzoico	70:30	220	2.45	1802509.8	-62708.8	0.9946
Benzonitrilo			4.94	3271645.9	-18854.1	0.9998
Benzamida			1.17	2396602.3	7077.4	0.9989
Ácido crotonico	95:5	205	ND	ND	ND	ND
Crotononitrilo			2.33			
Ácido isonicotínico	80:20	220	0.71	1308687.9	40316.5	0.9999
Isonicotinonitrilo			1.91	1831673.6	18296.3	0.9999
Ácido nicotínico	80:20	220	0.74	1160798.9	30102.4	0.9990
Nicotinonitrilo			1.80	2201256.9	11599.8	0.9996
Ácido <i>o</i> -clorobenzoico	60:40	213	1.69	1878437.8	-35756.9	0.9950
<i>o</i> -clorobenzonitrilo			4.43	1771284.4	22492.3	0.9872
Ácido <i>p</i> -clorobenzoico	60:40	213	2.76	989893.9	-23103.1	0.9942
<i>p</i> -clorobenzonitrilo			5.04	783758.6	-33856.3	0.9952
Ácido <i>p</i> -nitrobenzoico	70:30	213	2.84	1297161.0	-904.5	0.9976
<i>p</i> -nitrobenzonitrilo			5.28	1216353.1	-16652.5	0.9990

**Cuadro 10. Resultados determinados durante el desarrollo de los métodos para detección y cuantificación por CLAR. ND= No determinado.**

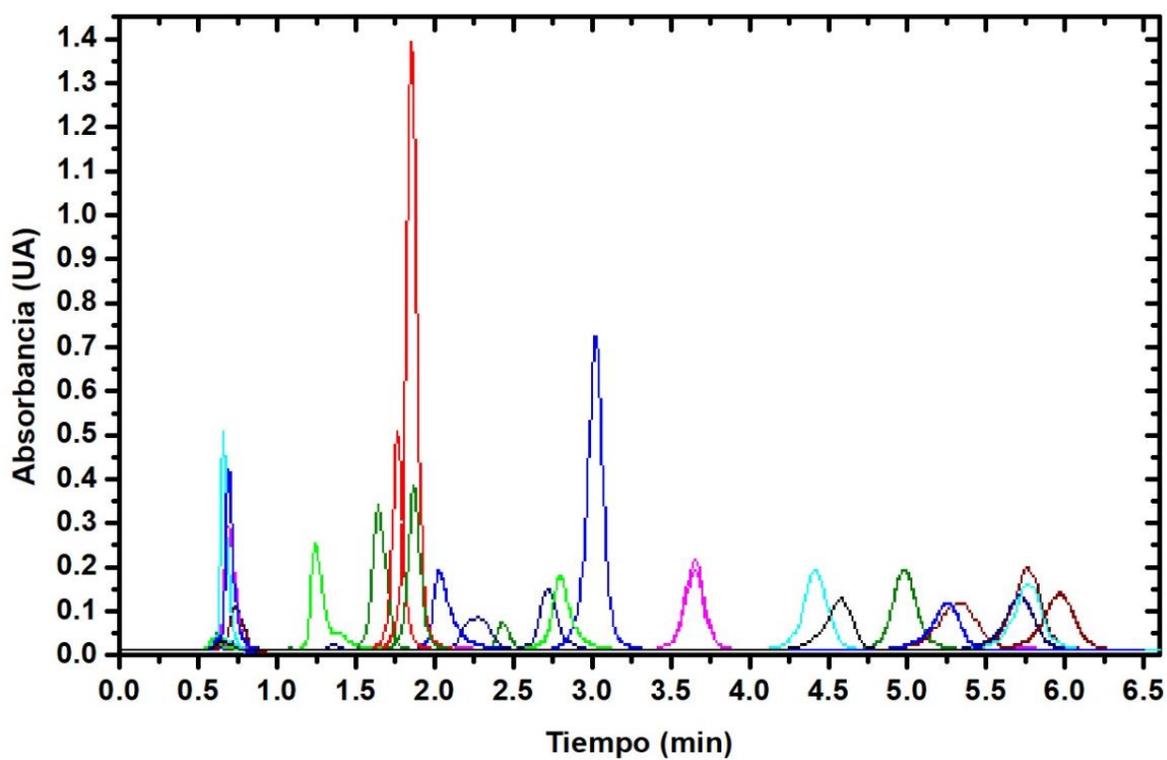


Figura 50. Cromatograma de todos los nitrilos y sus correspondientes ácidos analizados por CLAR.

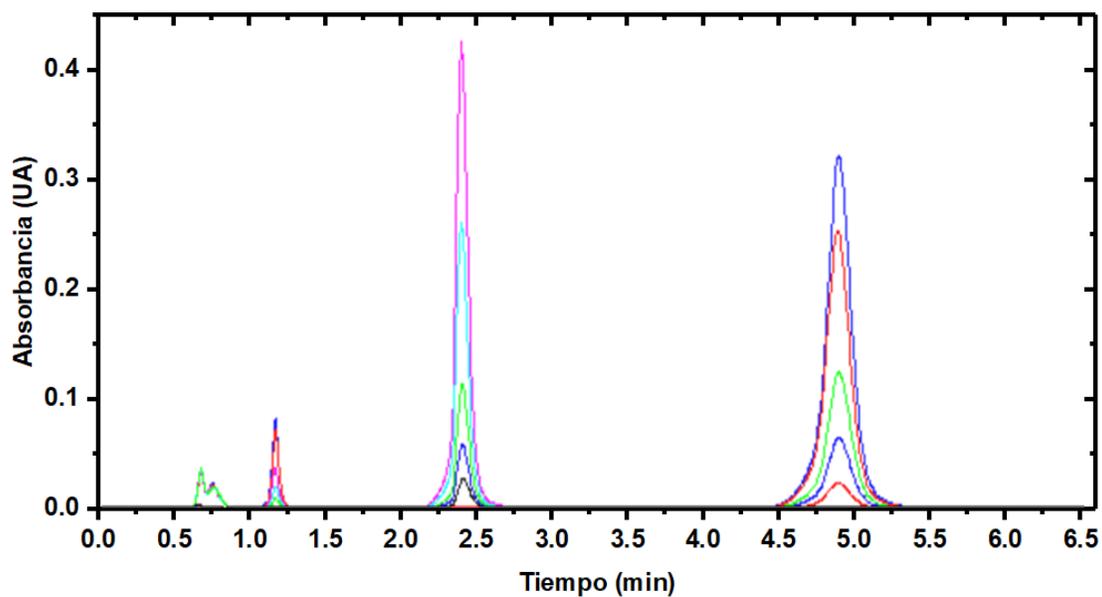


Figura 51. Cromatograma de la curva estándar de benzamida, ácido benzoico y benzonitrilo.



## Apéndice B

### Composición de medios y reactivos especiales

- **Medio LB líquido:** Peptona de caseína (10 g/L), extracto de levadura (5 g/L), cloruro de sodio (9 g/L) y fosfato monobásico de sodio (1 g/L). pH final = 7.2
- **Medio LB sólido:** Peptona de caseína (10 g/L), extracto de levadura (5 g/L), cloruro de sodio (9 g/L), fosfato monobásico de sodio (1 g/L) y agar (25 g/L). pH final = 7.2
- **Medio SOC:** Triptona (20 g/L), extracto de levadura (5 g/L), cloruro de sodio (0.6 g/L), cloruro de potasio (0.19 g/L), cloruro de magnesio (0.95 g/L), sulfato de magnesio (1.2 g/L) y glucosa (3.6 g/L).
- **Buffer de carga 4x para electroforesis (para 10 mL):** Glicerol (4 mL), Tris/HCl 1M pH 6.8 (2.4 mL), laurilsulfato de sodio (0.8 g), azul de bromofenol (0.004 g), 2-mercaptoetanol (0.5 mL) y agua (3.1 mL)
- **Buffer LAEMLI para electroforesis:** Tris (3 g/L), glicina (14.4 g/L) y laurilsulfato de sodio al 10% (10 mL/L). pH final = 6.8
- **Disolución teñidora de geles de poliacrilamida:** Azul brillante de coomassie (0.25 g/L), metanol (400 mL/L) y ácido acético (70 mL/L).
- **Disolución desteñidora de geles de poliacrilamida:** Metanol (400 mL/L) y ácido acético (70 mL/L).
- **Disolución para lisis por sonication:** Tris 100 mM, cloruro de potasio 150 mM y EDTA 1mM. pH final = 7

- **Ácido biconínico (BCA):** BCA (1 g/L), carbonato de sodio (2 g/L), bicarbonato de sodio (0.95 g/L), hidróxido de sodio (0.4 g/L) y tartrato de sodio y potasio (0.16 g/L). Ajustar a pH = 11.25.
- **Antibióticos y concentraciones para stocks 1000x:** Kanamicina (30 mg/mL) y cloranfenicol (34 mg/mL de etanol).



*Apéndice C*

*Secuencia de Nit $\Delta$ C328 de Rhodococcus sp V51B*

MVEYTNTFKVAAVQAQPVWFDAAKTVDKTVSNIAEAARNGCELVAFPEVFIPGYP  
YHIWVDSPLAGMAKFAVRYHENSMTMDSPHVQRLLDAARDHNIAVVVGISERDG  
GSLYMTQLIIDADGQLVARRRKLKPTHVERSVYGEGNGSDISVYDMPFARLGALN  
CWEHFQTLTKYAMYSMHEQVHVASWPGMSLYQPEVPAFGVDAQLTATRMYLE  
GQTFVVCTTQVVTPEAHEFFCENEEQRKLIIGRGGGFARIIGPDGRDLATPLAEDE  
EGILYADIDLSAITLAKQAADPVGHYSRPDVLNLFNQRRTTPVNTPLSTIHATH

