



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Encapsulamiento de nitrilasas en microgeles de poli (n-isopropilacrilamida) (p-NIPAM)”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Biol. Héctor Antonio Gómez Suriano

TUTOR PRINCIPAL:

Dra. Georgina Regina Garza Ramos Martínez
Facultad de Medicina. UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dra. Carmina Montiel Pacheco
Facultad de Química. UNAM

Dra. Nuria Victoria Sánchez Puig.
Instituto de Química. UNAM

Ciudad de México. Agosto, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

- Al CONACyT por la beca de posgrado.
- A la Dra. Georgina Regina Garza Ramos Martínez por su guía, apoyo y conocimientos.
- A los miembros de comité tutor Dra. Carmina Montiel Pacheco y Dra. Nuria Victoria Sánchez Puig por sus aportaciones, sugerencias y conocimientos.
- Al jurado: Dr. Alejandro Sosa Peinado, Dr. Martin González Andrade, Dr. Luis Fernando Olguín Contreras, Dr. Enrique García Hernández y Dr. Armando Hernández García, por aceptar el nombramiento, sus observaciones y sugerencias.
- Al personal técnico del LFQIP por su continuo trabajo y apoyo.
- A los compañeros del LFQIP.
- A mi mamá y mis hermanas por estar siempre conmigo.

Índice

Resumen	1
1. Introducción	2
1.1. Nitrilos	2
1.2. Nitrilasas	3
1.3. Modelo de estudio	6
1.4. Inmovilización	9
2. Antecedentes	13
2.1. Microgeles de poli (n-isopropilacrilamida) (p-NIPAM)	13
2.2. p-NIPAM en solventes orgánicos	16
3. Justificación	18
4. Objetivos	19
5. Hipótesis	19
6. Materiales y métodos	20
6.1. Producción y purificación de nitrilasas recombinantes	20
6.2. Preparación de microgeles de p-NIPAM	21
6.3. Evaluación del cambio en tamaño de los microgeles con DLS	22
6.4. Encapsulamiento de nitrilasas	22
6.5. Microscopía confocal	23
6.6. Determinación de la actividad enzimática	24
7. Resultados	29
7.1. Sobreexpresión y purificación de la nitrilasa	29
7.2. Evaluación del cambio del diámetro hidrodinámico	29
7.3. Desarrollo del método de inmovilización por encapsulamiento	33
7.4. Microscopía confocal	35
7.5. Determinación de la cantidad de enzima encapsulada	37
7.6. Pruebas de actividad	38
a) Determinación colorimétrica-	38
b) Determinación por HPLC	39
c) Actividad en mezclas de hexano	41
d) Reusabilidad	43
e) Tiempo de almacenamiento	45
f) Termoactividad	46
8. Discusión	46
9. Conclusiones	55
10. Bibliografía	56

Índice de figuras

Figura 1. Estructura química de los nitrilos	2
Figura 2. Hidrólisis de nitrilos	4
Figura 3. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de la superfamilia nitrilasa	4
Figura 4. Modelo del dímero de la nitrilasa de <i>Rhodococcus rhodochrous</i>	5
Figura 5. Mecanismo de reacción propuesto para la nitrilasa	6
Figura 6. Secuencias de la nitrilasa silvestre y de la mutante truncada NitT328	7
Figura 7. Micrografía electrónica de la nitrilasa mutante Ni T328	7
Figura 8. Actividad específica de las mutantes de la nitrilasa de <i>Rhodococcus</i> sp. V51B	8
Figura 9. Tipos de inmovilización	12
Figura 10. Estructura de la cadena lineal de poli (n-isopropilacrilamida) (p-NIPAM)	14
Figura 11. Respuesta de las microesferas de p-NIPAM	15
Figura 12. Cinética de turgencia del p-NIPAM con respecto a la temperatura	15
Figura 13. Efecto de cononsolvencia del hidrogel de p-NIPAM	17
Figura 14. Efecto de cononsolvencia en las micropartículas de p- NIPAM	17
Figura 15. Curva de calibración. Reactivo de Bradford	23
Figura 16. Reacción de hidrólisis del benzonitrilo a ácido benzoico y amonio	24
Figura.17. Formación del derivado indofenólico a partir de amoniaco, hipoclorito, nitroprusiato, y timo	25
Figura 18. Curva de calibración el reactivo Spectroquant NH4+ (MERCK®)	25
Figura 19. Tiempos de retención del benzamida, ácido benzoico y benzonitrilo	26
Figura 20. Curvas de calibración para el sustrato Benzonitrilo (BNZ) y Ác benzoico (Ac BNZ) obtenidas por HPLC	27
Figura 21. Curvas de calibración para Benzonitrilo (BNZ) y Ácido benzoico (Ac BNZ)	28
Figura 22. Curvas de calibración para los sustratos 4-Clorobenzonitrilo (4cClBCN), 2-Cloro 4-PiridinCarboitrilo (2Cl4PCCN) y 3-Fenilpropionitrilo (3FPrCN)	28
Figura 23. Electroforesis SDS-PAGE de la sobreexpresión y purificación de la Nit T328	29
Figura 24. Cambio de fase del p-NIPAM en agua	30
Figura 25. Polidispersidad de las microesferas de p-NIPAM	31
Figura 26. Respuesta de las partículas de p-NIPAM al cambio de temperatura	32
Figura 27. Diámetro hidrodinámico de las microesferas de p-NIPAM en función de la concentración de solvente orgánico	33
Figura 28. Diagrama del desarrollo del método de encapsulamiento de la Nit T328	34
Figura 29. Microscopía confocal de las microesferas de p-NIPAM/Nit T328 en amortiguador de fosfatos	36
Figura 30. Microscopía confocal delde p-NIPAM/Nit T328 en isopropanol	37
Figura 31. Determinación colorimétrica de la actividad de la Nit T328	38
Figura 32. Actividad enzimática de la Nit T328 encapsulada	40
Figura 33. Actividad relativa de a Nit T328 encapsulada en isopropanol y amortiguador de fosfatos	40
Figura 34. Actividad relativa en acetona	41
Figura 35. Actividad de la Nit T328 libre y de la Nit T328 encapsulada, en hexano	42

Figura 36. Actividad enzimática de los encapsulados en mezclas binarias de hexano/amortiguador de fosfatos	42
Figura 37. Actividad de la nitrilasa encapsulada en mezclas binarias de Hexano/amortiguador de fosfatos	43
Figura 38. Reusabilidad de la Nit T328 encapsulada en mezclas binarias hexano/amortiguador de fosfatos	44
Figura 39. Actividad retenida por la Nit T328 encapsulada en resguardo-	45
Figura 40. Efecto de la temperatura en la actividad de la nitrilasa encapsulada	46
Figura 41. Cambio de la LCST con respecto a la concentración de metanol en el medio	50

Índice de tablas

Tabla 1. Proporciones de NIPAM/MBA utilizadas para sintetizar microgeles de p-NIPAM	21
Tabla 2. Diámetro hidrodinámico de las microesferas de p-NIPAM determinado por DLS	30
Tabla 3. Velocidades de la Nit T328 libre y Nit T328 encapsulada, para diferentes sustratos	39
Tabla 4. Cantidad de enzima liberada después de su actividad	45

Resumen

Las nitrilasas son enzimas que llevan a cabo la hidrólisis de nitrilos con la producción de ácido carboxílico, amonio y en ocasiones la liberación de un producto amida. Los productos de la hidrólisis de los nitrilos son importantes como materia prima para la industria química y farmacológica para la elaboración de polímeros y otros compuestos. La obtención de los productos de la hidrólisis de nitrilos a través de la biocatálisis enzimática presenta algunas ventajas en comparación con la hidrólisis química ya que la biocatálisis enzimática se lleva a cabo a temperatura ambiente, pH cercanos al neutro y no produce compuestos químicos no deseados. De este modo las nitrilasas tienen el potencial para ser aprovechadas en la industria y a gran escala como una alternativa química eficaz y amigable con el medio ambiente.

Por otro lado, para la aplicación de la enzimología en la industria es importante el desarrollo de métodos de inmovilización enzimática ya que la inmovilización permite estandarizar condiciones técnicas y rutinarias de uso de los catalizadores biológicos. En el presente trabajo se desarrolló un método físico de inmovilización por encapsulamiento en microesferas de poli (n-isopropilacrilamida) de la nitrilasa mutante NitT328.

La NitT328 es una enzima mutante, diseñada con anterioridad (Gómez, 2016), que forma filamentos helicoidales y presenta actividad aumentada en comparación a la silvestre. El encapsulamiento se llevó a cabo en microesferas del hidrogel p-NIPAM ya que este hidrogel responde a estímulos externos como la temperatura y es posible utilizar esta capacidad de respuesta para el encapsulamiento. Por encima de la llamada LCST (Lower Critical Solution Temperature), alrededor de 32 °C, las microesferas de p-NIPAM muestran un cambio de fase reversible el cual se observa con el cambio de turbidez de la solución, cambio en el tamaño de las microesferas, modificación de la polaridad y solubilidad del p-NIPAM.

Método: Para el encapsulamiento se sintetizaron microesferas de p-NIPAM utilizando cadenas lineales de n-isopropilacrilamida y N,N'-Metilen-bis acrilamida (MBA) como entrecruzante. Se determinó el diámetro hidrodinámico de las microesferas de p-NIPAM utilizando dispersión dinámica de luz (DLS, Dynamic light Scattering). Para verificar el encapsulamiento de la enzima dentro de las microesferas de p-NIPAM los filamentos de NitT328 se tiñeron utilizando un marcador fluorescente y se observaron por microscopía confocal después del encapsulamiento. La actividad catalítica de la NitT328 encapsulada se determinó por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, High Performance Liquid Chromatography) utilizando el sustrato benzonitrilo como sustrato canónico.

Conclusiones: La cantidad enzima encapsulada fue de 332 monómeros de NitT328 por microesfera de p-NIPAM. Los resultados obtenidos muestran que el encapsulamiento reduce la actividad catalítica. Se determinó que el encapsulamiento en p-NIPAM permite reutilizar la NitT328 al menos 5 veces manteniendo del 60% al 70% de su actividad en cada reuso. Finalmente se determinó que el encapsulamiento en microesferas de p-NIPAM permite la conservación en seco de la NitT328 al menos durante tres meses.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Nitrilos

Los compuestos de nitrilo son abundantes en la naturaleza como sustratos de reacciones biocatalíticas. Existen como cianoglucósidos, cianolípidos, ricinina y fenilacetnitrilos. Estos son producidos principalmente por hongos y plantas y suelen ser precursores de compuestos funcionales como el indol-3-acetonitrilo del cual, a través de su hidrólisis enzimática, se produce ácido indol-3-acético que funciona como hormona del crecimiento en plantas (Vorwerk, *et al.*, 2001). La mayoría de los nitrilos son compuestos potencialmente tóxicos, su molécula contiene el grupo funcional ciano y no son fácilmente biodegradables (Fig. 1).

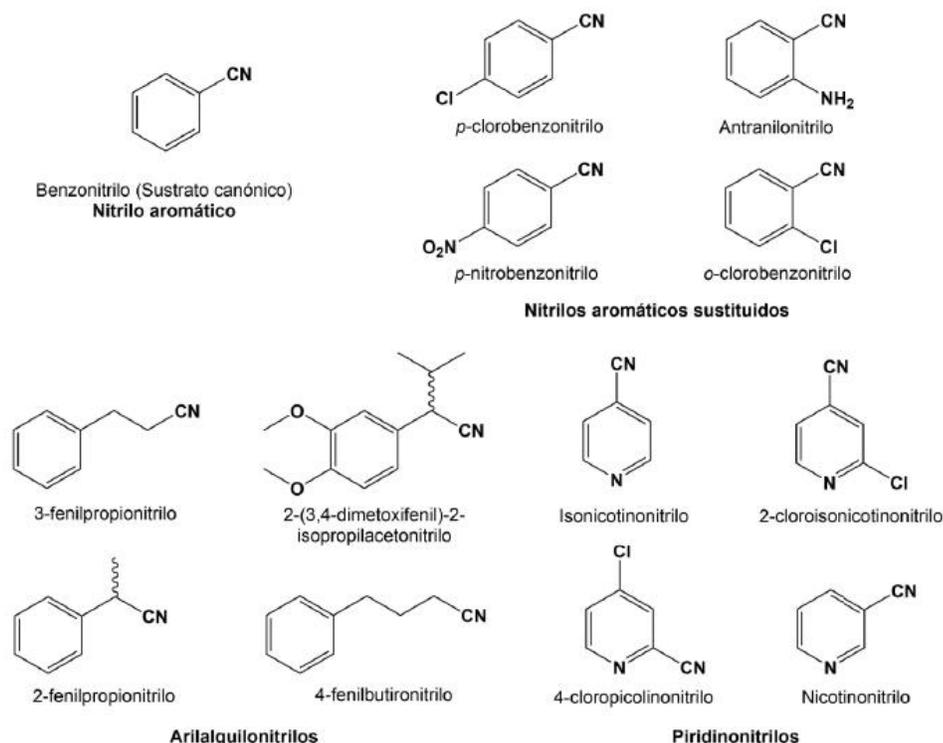


Figura 1. Estructura química de los nitrilos. El benzonitrilo es el sustrato canónico utilizado en este trabajo para la estandarización de la inmovilización.

Los nitrilos, las amidas y los ácidos carboxílicos, particularmente los enantiómeros puros de los compuestos quirales, tienen un uso importante tanto en la industria química como en la industria farmacéutica, por ejemplo el acrilonitrilo y el adiponitrilo, que son necesarios para la producción de poliacrilonitrilo y polímeros del tipo del nylon (Ramteke, *et al.*, 2013).

En síntesis orgánica, la adición de un grupo nitrilo involucra la incorporación de un átomo de carbono en una molécula, y su sucesiva hidrólisis para obtener el ácido carboxílico o la amida correspondiente. La hidrólisis química de los nitrilos suele requerir condiciones fuertes para llevar a cabo la reacción como son (pH muy ácido o muy alcalino y alta temperatura), lo que supone un gran consumo energético, la formación de productos no deseados y la generación de grandes cantidades de residuos. Un hecho importante es que la hidrólisis química no es enantioespecífica y las condiciones de reacción pueden producir la racemización de los reactivos (Gong, *et al.*, 2012).

Por otro lado, la hidrólisis enzimática de los nitrilos es un método reconocido para obtener un amplio repertorio de aminas, amidas, ácidos carboxílicos, ésteres, aldehídos, cetonas y compuestos heterocíclicos útiles. La biocatálisis enzimática con su inherente enantioselectividad y la posibilidad de llevarse a cabo a temperatura cercana a la ambiental, valores de pH dentro del rango fisiológico y sin la producción de residuos contaminantes, representa una alternativa valiosa a la hidrólisis química convencional (Gong, *et al.*, 2012; Ramteke, *et al.*, 2013). En la práctica, las reacciones catalizadas por enzimas que metabolizan nitrilos tienen importantes rendimientos a gran escala y el potencial para alcanzar un buen rendimiento a nivel industrial. En cuanto a la degradación de nitrilos liberados como desechos al medio ambiente, las enzimas convertidoras de nitrilo, así como la degradación microbiológica han mostrado ser métodos eficientes para la bioremediación (Banerjee y Sharma, 2002; Gong, *et al.*, 2012; Ramteke, *et al.*, 2013).

1.2. Nitrilasas

Aunque el papel fisiológico de las nitrilasas en la naturaleza no es del todo claro, se sabe que estas enzimas participan en diversos procesos celulares. En plantas, se ha observado su papel en la detoxificación de cianuros (Vorwerk, *et al.*, 2001), en la degradación de glucosinolatos (Bestwick, *et al.*, 1993) y aldoximas (Kato, *et al.*, 2000). La producción de metabolitos está ejemplificada en la síntesis del ácido indolacético (Bartling, *et al.*, 1994).

La degradación microbiana de los nitrilos procede a través de dos rutas enzimáticas evolutivamente distintas: el de la nitrilasa y el de la nitrilo hidratasa-amidasa. Las nitrilasas (EC 3.5.5.1) catalizan la hidrólisis directa de nitrilos orgánicos a sus correspondientes ácidos carboxílicos con la liberación de amonio y la liberación ocasional de un producto amida (Fig. 2).

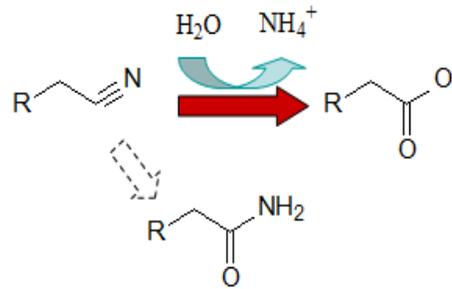


Figura 2. Hidrólisis de nitrilos. Las nitrilasas hidrolizan nitrilos a sus correspondientes ácidos carboxílicos, con la producción de amonio y la liberación ocasional de un producto amida.

La hidrólisis del cianuro (HCN), el nitrilo más sencillo, es catalizada por otro grupo de enzimas específicas: las cianuro hidratatasas y las cianuro dihidratatasas; estas enzimas junto con las nitrilasas se agrupan en una sola familia conocida como Nitrilasa/Cianuro Hidratasa la cual se caracteriza por llevar a cabo la degradación de nitrilos (Gong, *et al.*, 2012).

Las nitrilasas pertenecen a la superfamilia Nitrilasa, también denominada de las hidrolasas carbono-nitrógeno, la cual contiene 13 clases distintas de enzimas que catalizan diversas reacciones hidrolíticas de enlaces carbono-nitrógeno no peptídicos. Dentro de estas 13 clases se encuentran además, las amidasas, carbamilasas y N-aciltransferasas. Todas estas enzimas catalizan reacciones que ocurren a través de un intermediario acil-enzima (Fig. 3).

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. Amidasa amino termin	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	I	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. Pro. NAD+ Sintetasa	42	f	P	E	L	.	46	111	.	.	K	.	.	L	P	117	146	.	l	C	E	D	.	w	.	p	154
8. Euk. NAD+ Sintetasa	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-aciltransferasa	267	w	p	E	.	a	271	328	.	.	K	.	.	l	v	334	380	.	i	C	y	E	.	.	f	.	388
10. Nit y Nit Fhit	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. Alineamientos no asignados	36	l	P	E	.	.	40	108	y	r	K	.	h	L	f	114	145	.	i	C	y	d	.	r	F	p	153

Figura 3. Alineamiento de secuencias de aminoácidos la superfamilia nitrilasa. La triada catalítica Glu-Lys-Cys (E-K-C) se encuentra conservada. Tomado de Pace y Brenner, 2001.

A pesar de las diferencias entre las secuencias de aminoácidos, todas las nitrilasas comparten un plegamiento característico: el motivo de “sándwich” α - β - β - α y una tríada catalítica Glu-Lys-Cys (Fig. 4), la cual es esencial para la función de la enzima. También se ha propuesto una tétrada catalítica, con un ácido glutámico adicional necesario para la catálisis (Pace y Brenner, 2001; Podar, *et al.*, 2005; Thuku, *et al.*, 2009).

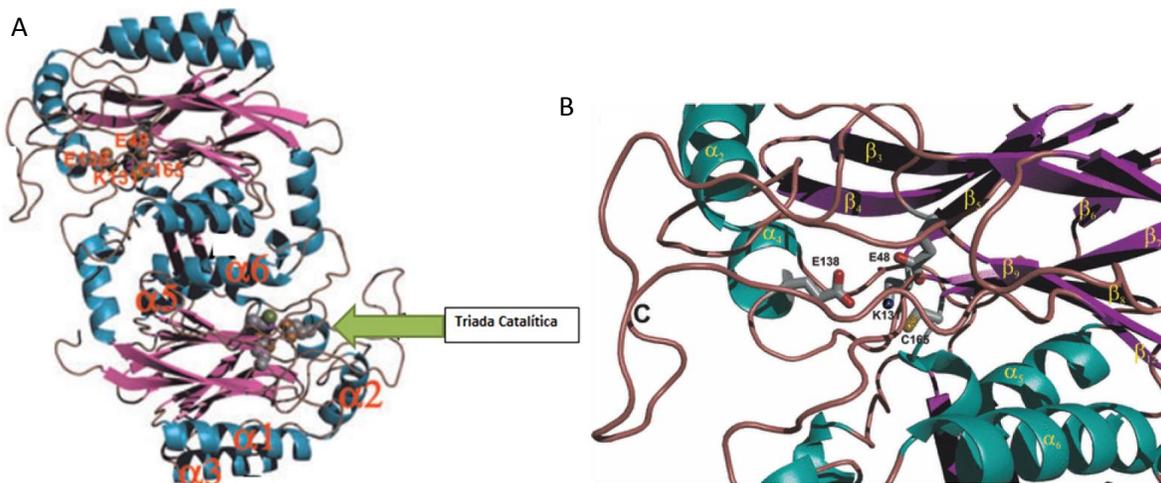


Figura 4. Modelo del dímero de la nitrilasa de *Rhodococcus rhodochrous*. (A) Motivo de “sándwich” α - β - β - α . (B) Tríada catalítica Glu-Lys-Cys (E-K-C). Tomado de Thuku, *et al.*, 2009.

Las nitrilasas aisladas de varias especies del género *Rhodococcus* son dímeros inactivos. La presencia de altas concentraciones de sustrato, como benzonitrilo o sales como el sulfato de amonio, inducen su asociación formando decámeros o dodecámeros, catalíticamente activos (Nagasawa, *et al.*, 2000). Por otro lado, las nitrilasas de *Klebsiella ozaenae* y *Pyrococcus abyssi* mantienen una estructura dimérica funcional (Thuku, *et al.*, 2009). Estos dímeros están conformados por subunidades de aproximadamente 30 a 45 kDa y se asocian en homo-oligómeros de diferentes tamaños dando la forma activa de la enzima.

- **Mecanismo de reacción**

El mecanismo propuesto para la reacción catalizada por las nitrilasas involucra un ataque nucleofílico del grupo tiol de un residuo de cisteína sobre el carbono del grupo ciano del nitrilo. Esto produce un iminotioéster tetraédrico como intermediario que se hidroliza formando el ácido carboxílico y liberando amonio. En algunos casos el intermediario tetraédrico puede descomponerse liberando la amida en lugar del ácido carboxílico (Gong, *et al.*, 2013) (Fig. 5).

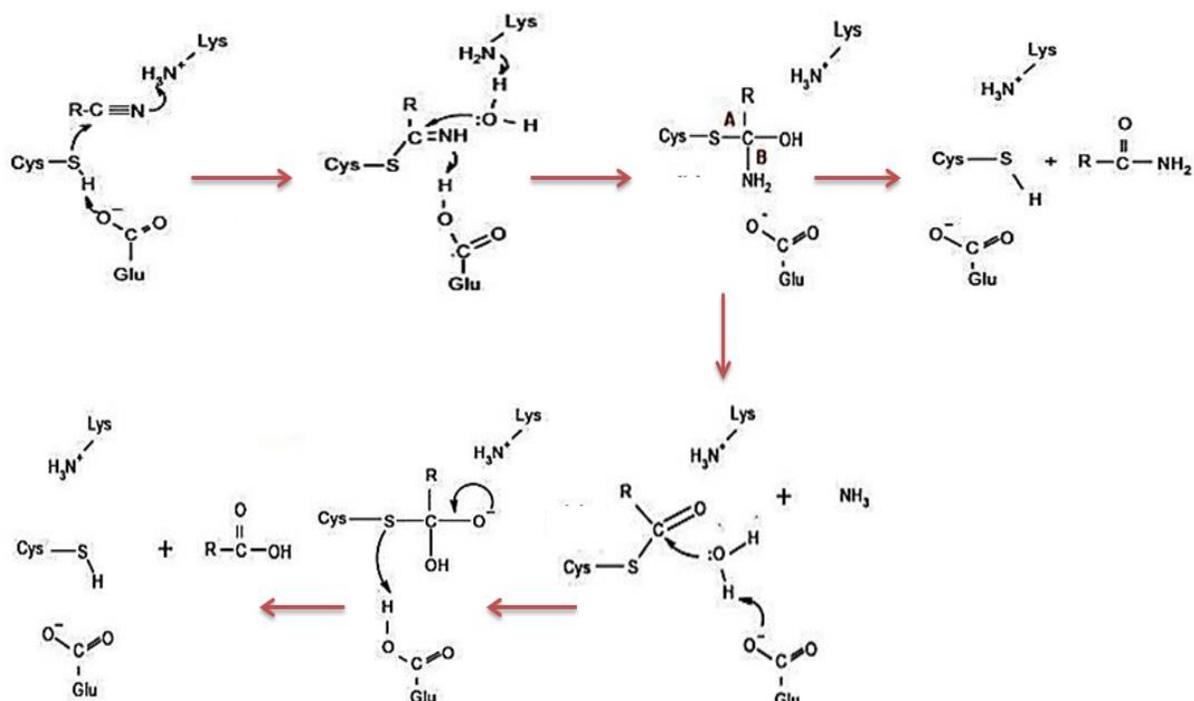


Figura 5. Mecanismo de reacción propuesto para la nitrilasa. El grupo tiol de un residuo de cisteína lleva a cabo un ataque nucleofílico sobre el carbono del grupo ciano y se forma el intermediario acil-enzima. El grupo amino de la lisina activa una molécula de agua para que esta realice un ataque nucleofílico al acil-enzima mientras que el ácido glutámico dona un protón y se forma un iminotioéster tetraédrico como intermediario. En el tercer paso, si se hidroliza en **A** (Carbono-azufre): se forma un producto amina. Si se hidroliza en **B** (Carbono-NH₂): se libera amonio y entonces otra molécula de agua activada por el glutamato interviene en la formación de un segundo intermediario tetraédrico. Finalmente el ácido glutámico induce la protonación del grupo tiol del residuo de cisteína deshaciéndose el intermediario tetraédrico con la liberación del ácido carboxílico y la recuperación de la enzima.

1.3. Modelo de estudio

Se clonó y sobreexpresó la nitrilasa de *Rhodococcus sp.* V51B en el Laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de Proteínas (LFQIP) de la facultad de Medicina, UNAM (Leyva, 2009). La caracterización cinética de la nitrilasa muestra que tiene una actividad y afinidad 10 y 3.5 veces mayores respecto a otras nitrilasas específicas para nitrilos aromáticos como el benzonitrilo y la 3-cianopiridina, entre otros (Leyva, 2009).

En un trabajo posterior del mismo laboratorio, a partir de la nitrilasa silvestre, se diseñaron mutantes truncadas en el C-terminal de la secuencia de aminoácidos las cuales mostraron la tendencia a oligomerizar en forma de estructuras de filamentos helicoidales (Gómez, 2016). Los cortes en la secuencia se realizaron a diferentes longitudes a partir de

la secuencia silvestre de 366 aminoácidos (Fig. 6). Las mutantes truncadas mostraron una tendencia a formar filamentos cada vez mayores entre más aminoácidos se eliminaban. La mutante con más aminoácidos eliminados fue la NitT328, la cual tiene 39 aminoácidos menos, esta truncada hasta la posición Treonina 328. Esta mutante es la que formó filamentos más grandes y presentó mayor actividad catalítica (Gómez, 2016). La mutante NitT328 fue la utilizada en el presente trabajo para su inmovilización.

Nit Silvestre

MVEYNTNFKVAAVQAQPVWFDAAKTVDKTVSNIAEAARNGCELVAPEVFIPGYPHYWVDSPLAGMAKFAVRYHENSLT
MDSPHVQRLDAARDHNIAVVVGISERDGGSLYMTQLIIDADGQLVARRRKLKPTHVERSVYGEENGSDISVYDMPFARLG
ALNCWEHFQTLTKYAMYSMHEQVHVASWPGMSLYQPEVPAFGVDAQLTATRMYLEGQTFVVCTTQVVTPEAHEFFCE
NEEQRKLIGRGGGFARIIGPDGRDLATPLAEDEEGILYADIDLSAITLAKQAADPVGHYSRPDVLNLFNQRRTPVNTPLSTIH
ATH**FVPQFGALDGVRELNGADEQRALPSTHSDETRATL**

NiT328

MVEYNTNFKVAAVQAQPVWFDAAKTVDKTVSNIAEAARNGCELVAPEVFIPGYPHYWVDSPLAGMAKFAVRYHENSLT
MDSPHVQRLDAARDHNIAVVVGISERDGGSLYMTQLIIDADGQLVARRRKLKPTHVERSVYGEENGSDISVYDMPFARLG
ALNCWEHFQTLTKYAMYSMHEQVHVASWPGMSLYQPEVPAFGVDAQLTATRMYLEGQTFVVCTTQVVTPEAHEFFCE
NEEQRKLIGRGGGFARIIGPDGRDLATPLAEDEEGILYADIDLSAITLAKQAADPVGHYSRPDVLNLFNQRRTPVNTPLSTIH
ATH

Figura 6. Secuencias de la nitrilasa silvestre y de la mutante truncada NitT328. Cada secuencia contiene 366 y 327 aminoácidos respectivamente. Se resaltan en rojo los aminoácidos eliminados en NitT328.

El monómero de la NitT328 tiene 327 aminoácidos, peso molecular de 36.21 kDa y punto isoeléctrico de $\text{pH}=5.43$, es una proteína hidrofílica dado su índice de hidropaticidad (-0.177), según lo indica la herramienta disponible en internet ProtParam ExPASy. Esta mutante forma filamentos helicoidales de 60 nm en promedio y algunas de hasta 400 nm (Fig. 7).

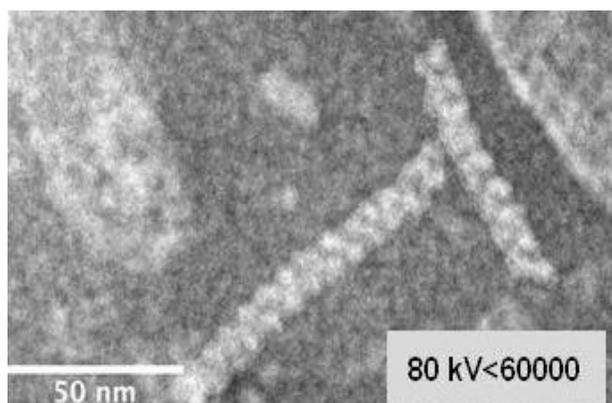


Figura 7. Micrografía electrónica de la nitrilasa mutante Nit T328. Tomada de Gómez, 2016.

La NitT328 presenta algunas propiedades particulares, tales como aumento en la vida media de la enzima, alta termoestabilidad y mejora en la eficiencia catalítica con respecto a la enzima silvestre. Los ensayos de estabilidad térmica indican que las mutantes truncadas son estables a temperaturas ≥ 50 °C ($t_{1/2} = 22$ h a 55 °C). La actividad catalítica de la mutante NitT328 aumenta de 6-10 veces con respecto a la enzima silvestre (Fig. 8). Es activa para gran variedad de nitrilos: benzonitrilo, valerionitrilo, acrilonitrilo, propionitrilo, adiponitrilo, 3-piridinocarbonitrilo, 4-piridinocarbonitrilo, 3-fenilcarbonitrilo, 4-cloro-benzonitrilo y 2-cloro-4-piridinocarbonitrilo. Es 100 % activa en metanol al 20% v/v, retiene el 15 % de su actividad en isopropanol al 40% v/v y 65% en n-propanol al 20% v/v, mientras que en acetona es inactiva en cualquier proporción (Cáliz, 2015).

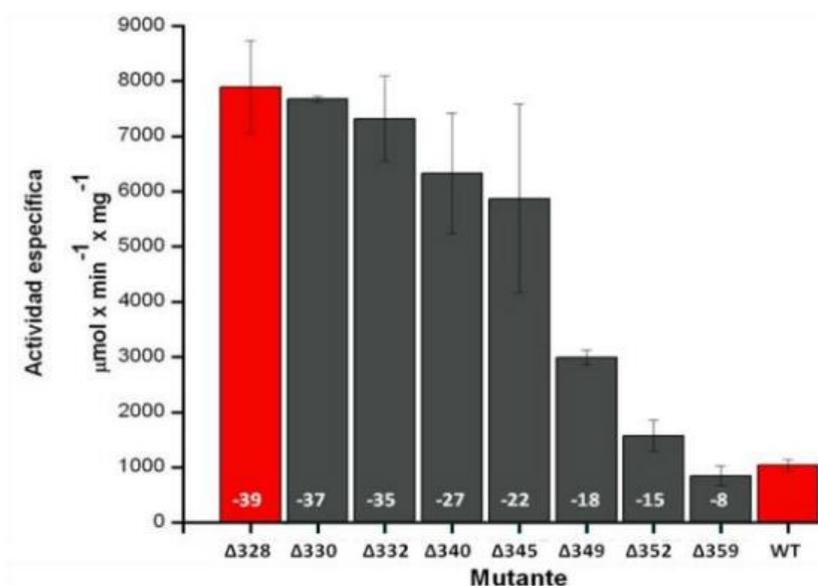


Figura 8. Actividad específica de las mutantes truncadas de la Nitrilasa de *Rhodococcus sp.* V51B. Tomada de Gómez, 2016.

La enzima silvestre, un oligómero de 10-12 subunidades, es 10 veces menos activa que las mutantes formadoras de filamentos y responde igual al efecto de los solventes, es decir, se inactiva bajo las mismas proporciones de solvente que la NitT328. La inactivación por la presencia de solventes orgánicos sugiere que las interacciones principales que mantienen el estado oligomérico y funcional de la nitrilasa de *Rhodococcus sp.* V51B son de tipo hidrófobo.

- **Nitrilasas en solventes orgánicos**

En años recientes se ha investigado el efecto que tienen los solventes orgánicos en la actividad y estabilidad de algunas nitrilasas debido a la poca solubilidad de la mayoría de los nitrilos en agua. Las nitrilasas de *Synechocystis sp.* (Heinemann, *et al.*, 2003) y de *Pseudomonadaceae* (Layh, *et al.*, 1998) han mostrado ser activas en presencia de distintos disolventes orgánicos, de hecho se demostró que las velocidades de conversión para dos sustratos con baja solubilidad en agua, un nitrilo alifático de cadena larga y un nitrilo aromático, resultan velocidades mayores en solventes orgánicos inmiscibles o parcialmente miscibles en agua.

Los solventes orgánicos ofrecen la posibilidad de llevar a cabo transformaciones químicas que en un medio acuoso tienen impedimentos cinéticos o termodinámicos; por ejemplo aumentan la solubilidad de algunos sustratos particularmente interesantes desde el punto de vista experimental o de las aplicaciones de la enzima en síntesis química. Además, se ha observado que el uso de solventes orgánicos incrementa la tendencia del equilibrio químico a sintetizar más productos (Gong, *et al.*, 2012). Es por eso que se han dedicado muchos esfuerzos en el desarrollo de métodos de inmovilización enzimática en los cuales, la enzima pueda llevar a cabo su actividad catalítica en solventes orgánicos y conserve su estabilidad.

1.4. Inmovilización

La biocatálisis ha sido ampliamente aceptada debido a los beneficios inherentes que presenta como la facilidad de obtener productos, especificidad de sustrato y su contribución a la química sostenible, también llamada “química verde” por ser menos agresiva con el medio ambiente. Debido a su amplia comercialización, reusabilidad, almacenamiento y mantenimiento de la estabilidad estructural durante cualquier reacción bioquímica, los biocatalizadores se han convertido en requerimientos necesarios en la investigación. Consecuentemente las enzimas inmovilizadas con eficiencia funcional y reproducibilidad, están siendo utilizadas como una alternativa natural favorable que permite disminuir costos de almacenamiento y comercialización (Datta y Christena 2013).

La inmovilización enzimática es el confinamiento de una enzima en una fase fija (matriz/soporte) diferente a la de los sustratos y productos, en una región del espacio definida, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica y que pueden ser reutilizadas repetidamente (Arroyo, 1998). Generalmente se utilizan polímeros

inertes y materiales inorgánicos como matrices acarreadoras. Además de ser asequibles, una matriz ideal debe tener características como ser inerte, ser resistente, tener estabilidad, regenerabilidad y la habilidad para incrementar la especificidad de la enzima, así como evitar la inhibición por producto, la adsorción no específica y la contaminación microbiana (Lyon, *et al.* 2009; Datta y Christena 2013).

Dentro de las ventajas de emplear enzimas inmovilizadas, cabe mencionar el aumento en la estabilidad de la enzima, la reutilización y la posibilidad de diseñar un reactor enzimático adaptado a la aplicación de la enzima inmovilizada. Sin embargo, el proceso de inmovilización también implica inconvenientes como: la alteración de la conformación de la enzima respecto a su estado nativo, pérdida de actividad durante la inmovilización, así como el alto costo que representa la estandarización y fabricación de los complejos catalíticos inmovilizados en relación a la enzima nativa (Arroyo 1998; Datta y Christena 2013).

La inmovilización puede ser física o química. La retención física no involucra formación de enlaces covalentes, las interacciones entre el soporte y la enzima son electrostáticas o por confinamiento. Por otro lado, la inmovilización química mantiene a las enzimas unidas por formación de enlaces covalentes entre la enzima y el soporte o entre moléculas de la misma o diferentes enzimas para formar complejos insolubles con actividad catalítica (Fig. 9).

- **Tipos de inmovilización**

- a) Atrapamiento:**

El atrapamiento es el confinamiento o encierro de las enzimas por uniones covalentes o no covalentes dentro de geles o fibras (Datta y Christena, 2013). Este consiste en la retención física de la enzima en las cavidades interiores de una matriz sólida porosa constituida generalmente por prepolímeros entrecruzables o polímeros, por ejemplo poliacrilamida, colágeno, alginato, carragenato o resinas de poliuretano. El proceso de inmovilización se lleva a cabo mediante la suspensión de la enzima en una solución con hidrogeles hechos de algún polímero seguido de un cambio de fase en el que colapsen los hidrogeles y se atrape la enzima; o en una solución con los monómeros entrecruzables, donde se induce la polimerización para que se forme el polímero y se lleve a cabo el atrapamiento (Lyon, *et al.*, 2009).

El proceso de atrapamiento es sencillo desde el punto de vista experimental, puesto que requiere poca cantidad de enzima para obtener derivados activos. Como ventaja adicional, la enzima no sufre alteraciones covalentes en su estructura. A pesar de esto, el atrapamiento requiere un control riguroso de las condiciones de polimerización, así como la comprobación de que la naturaleza química del proceso no altera los grupos reactivos de la proteína (Fonseca y Meesters, 2013).

Existen dos tipos de atrapamiento:

- 1. Microencapsulación:** Las enzimas están rodeadas de membranas esféricas semipermeables que permiten el paso de moléculas de sustrato y producto, pero no de enzima.
- 2. Reactores de membrana:** Emplean membranas permeables al producto final, permeables al sustrato inicial e impermeables a la enzima (Arroyo, 1998).

b) Unión a soportes:

Es la adhesión de enzimas a superficies inmóviles para mantenerlas sujetas durante su actividad catalítica y poder llevar a cabo reusos así como aumentar su estabilidad. Se han utilizado una gran variedad de materiales como soportes, estos materiales difieren en tamaño, densidad, porosidad y forma, aunque generalmente se encuentran en forma de cilindro, láminas, fibras y esferas. Los soportes pueden clasificarse en dos grandes grupos: soportes orgánicos e inorgánicos. Las enzimas se pueden unir a estos soportes mediante adsorción o por unión covalente.

En la adsorción la enzima se une a un soporte mediante interacciones iónicas, fuerzas de Van der Waals y por puentes de hidrógeno. Los principales factores que influyen en la adsorción son el pH y la fuerza iónica. La presencia de iones que actúen como cofactores de la enzima también puede afectar el proceso de adsorción. Por otro lado, la unión covalente se basa en la activación de grupos químicos del soporte para que reaccionen con ciertos residuos en las proteínas y se formen enlaces covalentes entre sí. Este proceso de inmovilización puede alterar la estructura del centro activo y reducir la actividad de la enzima (Arroyo, 1998).

c) Reticulado, entrecruzamiento o cross-linking:

Consiste en uso de reactivos bifuncionales que originan uniones intermoleculares entre las enzimas. Como reactivos bifuncionales se pueden emplear dialdehídos, diminoésteres, disocianatos, sales de bisdiazonio e incluso diaminas activadas con carbodimida. El resultado del reticulado son enzimas con enlaces intermoleculares irreversibles capaces de resistir condiciones extremas de pH y temperatura (Wong y Wong, 1992).

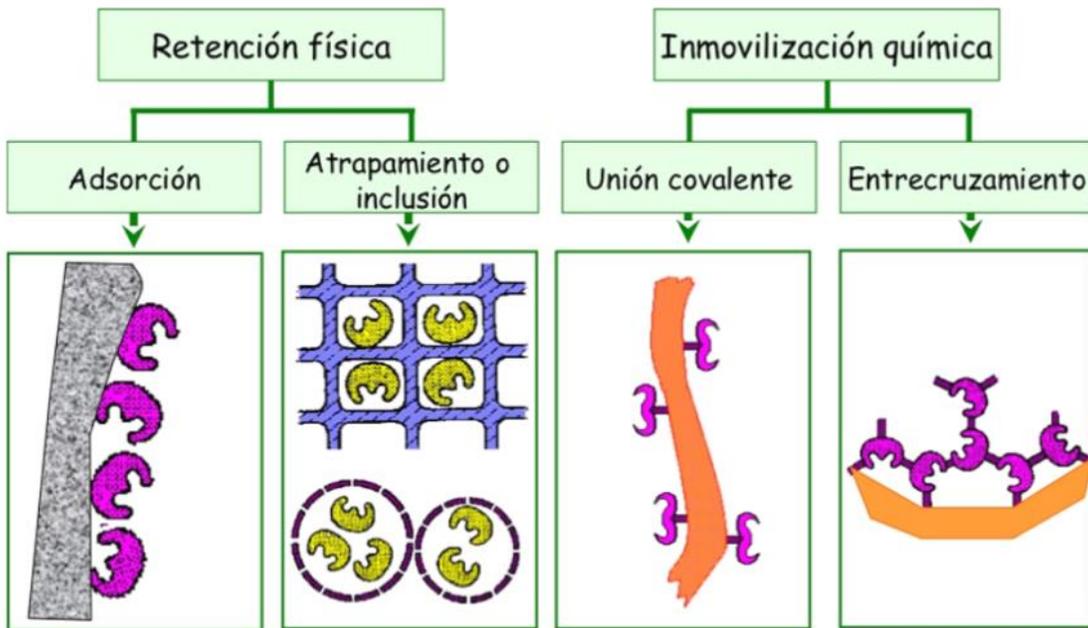


Figura 9. Tipos de inmovilización. La *retención física* no involucra formación de enlaces covalentes, las interacciones entre el soporte y la enzima son electrostáticas o por confinamiento. La *inmovilización química* mantiene a las enzimas unidas por formación de enlaces covalentes entre la enzima y el soporte o entre la misma enzima para formar complejos insolubles con actividad catalítica. (Torres, 2012).

2. ANTECEDENTES

2.1. Microgeles de poli (n-isopropilacrilamida) (p-NIPAM)

Se seleccionó como sistema de trabajo la utilización de partículas de hidrogel de poli (n-isopropilacrilamida) (p-NIPAM) para el encapsulamiento de nitrilasas ya que este método presenta algunas ventajas como la reducción del contacto al soporte por lo que la movilidad y la flexibilidad de las enzimas son mayores que en otras inmobilizaciones fijas. El encapsulamiento en p-NIPAM permite la reutilización de la enzima, además en este sistema es posible llevar a cabo la biocatálisis en solventes orgánicos a concentraciones donde la nitrilasa libre es inactiva (Gawlitza, *et al.*, 2012, 2013).

Un hidrogel es definido generalmente como una red polimérica la cual tiene la propiedad de absorber grandes cantidades de agua lo que causa cambios macroscópicos en las dimensiones del polímero. Generalmente se encuentra conformado por cadenas lineales de un polímero, estas forman una red tridimensional estabilizada por el agente entrecruzante el cual puede presentar enlaces covalentes, cargas complejas, enlaces por puente de hidrógeno, enlaces del tipo de Van der Waals o interacciones hidrofóbicas (Valderruten, *et al.*, 2001; Conley, *et al.*, 2016). Las propiedades que hacen útiles a los hidrogeles son su capacidad de absorción, cinética de turgencia, su permeabilidad a diferentes solutos, propiedades superficiales como adhesividad, características mecánicas y respuesta a estímulos externos (Xia, *et al.*, 2013).

Los microgeles son polímeros en forma de microesferas que tienen las propiedades del hidrogel del cual están hechas, se hacen coloidalmente estables y no precipitan después de la transición de fase. Estas características facilitan llevar a cabo estudios sobre la cinética de turgencia del hidrogel y su estado colapsado; permiten la utilización de técnicas de dispersión de luz a través de las cuales se pueden determinar medidas adecuadas y estudiar su comportamiento en función al cambio de temperatura, composición del solvente y al cambio en la presión (Scherzinger, *et al.*, 2014). Los microgeles, por su capacidad de respuesta, han mostrado ser buenos candidatos para el diseño de biosensores, como acarreadores de fármacos y también son aprovechados para llevar a cabo una inmobilización enzimática en un sistema coloidal (Ying y Zhang, 2011).

Los hidrogeles de p-NIPAM (Fig. 10) resultan ser atractivos desde el punto de vista experimental debido a que exhiben súbitas fases de transición de volumen a determinada temperatura denominada “Temperatura mínima crítica de solución” (en inglés Low Critical Solution Temperature **LCST**). La LCST se encuentra alrededor de 32 °C para el p-NIPAM en agua (Lopez-Leon, *et al.*, 2006; Karg y Hellweg, 2009; Zhu, *et al.*, 2012). También, los microgeles de p-NIPAM muestran cambios notables en sus propiedades en solución como respuesta a la temperatura: cambio en la hidrofobicidad, en el tamaño de la partícula, movilidad electroforética, estabilidad coloidal, reología, etc. (Shimizu, *et al.*, 2009; Ying y Zhang, 2011).

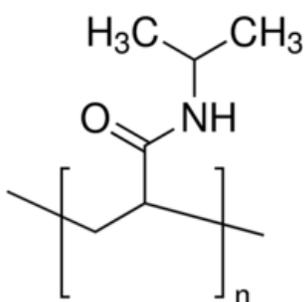


Figura 10. Estructura de la cadena lineal de Poli (n-isopropilacrilamida) (p-NIPAM).

En solución la hidratación de las cadenas de p-NIPAM produce ordenamientos locales en las moléculas de agua alrededor del grupo amida por medio de puentes de hidrogeno, manteniendo a la cadena de p-NIPAM extendida. Al llevarse a cabo la elevación de la temperatura por encima de la LCST se causa una disrupción de los puentes de hidrogeno entre las moléculas de agua y los grupos amida de las cadenas de p-NIPAM, la cual provoca la retracción de las cadenas lineales y la interacción hidrofóbica entre los grupos isopropil. Debido a este comportamiento de las cadenas lineales, en el microgel se produce la hidratación de las microesfera cuando se encuentra debajo de la LCST y por lo tanto las partículas están turgentes, mientras que por arriba de la LCST las partículas colapsan (Fig. 11). Ya que la transición de volumen ocurre cerca de los 32 °C (Fig. 12), temperatura cercana a la temperatura ambiente y a la temperatura óptima de la mayoría de enzimas mesófilas, este sistema resulta útil para la inmovilización de enzimas (Gawlitza, *et al.*, 2012). Debido a la respuesta termosensible de los microgeles de p-NIPAM la inmovilización puede ser controlada a través del cambio de temperatura y recambio de solvente (Zhu, *et al.*, 2012).

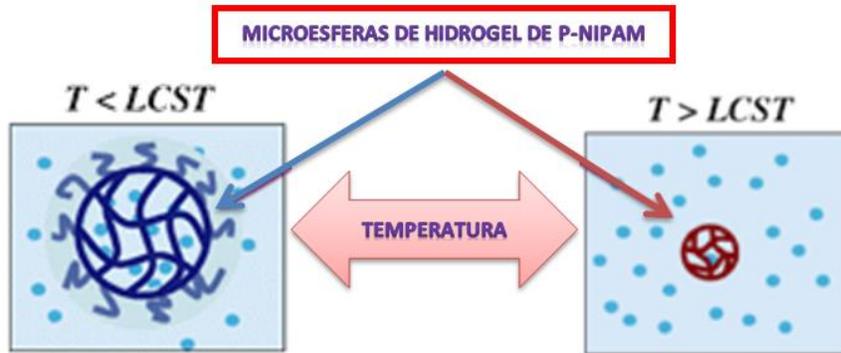


Figura 11. Respuesta de las microesferas de p-NIPAM. Debajo de la LCST se encuentran turgentes, arriba de la LCTS las microesferas colapsan. Tomada de Shimizu, *et al.*, 2009.

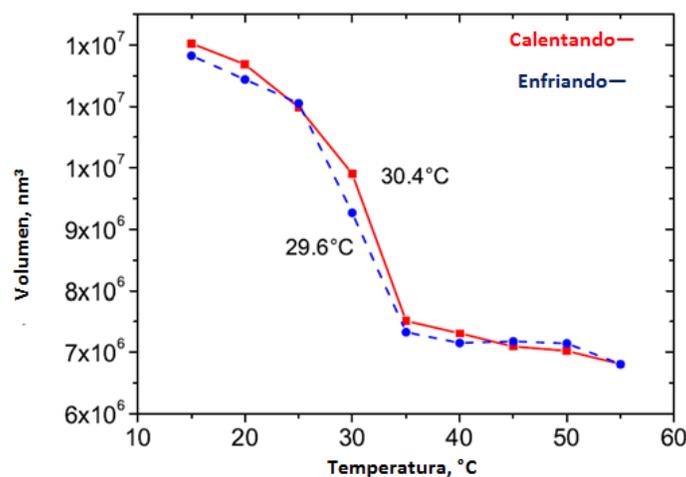


Figura 12. Cinética de turgencia del p-NIPAM con respecto a la temperatura. Tomado de Burmistrova y Naturwissenschaften 2011.

La primera adsorción de proteínas en microgeles de p-NIPAM fue estudiada por Kawaguchi y colaboradores en los 90's. Un estudio posterior demostró que una β -D-glucosidasa puede ser inmovilizada en partículas de polímeros mixtos con centro de poliestireno y cubierta de p-NIPAM (Wu, *et al.*, 2011).

La enzima lipasa B de *Candida antarctica* (CalB) fue inmovilizada en microgeles de p-NIPAM por cambio de un solvente polar a uno orgánico (isopropanol o n-hexano). En este estudio, la posibilidad de dispersar estos microgeles en solventes orgánicos y de alcanzar un buen abastecimiento del sustrato a la enzima llevó a mejorar su actividad en solventes orgánicos (Gawlitza, *et al.*, 2012).

2.2. P-NIPAM en solventes orgánicos

Debido a que los sustratos y los productos de las nitrilasas frecuentemente presentan mayor solubilidad en solventes orgánicos mientras las enzimas son solubles en agua, hay gran interés en diseñar sistemas bifásicos donde todos los componentes estén en su ambiente idóneo de solubilidad. Del mismo modo, es esencial comprender el comportamiento del microgel dependiendo de la composición del medio de reacción (proporción agua/solvente) para la inmovilización de enzimas dentro de microesferas de p-NIPAM por recambio de solvente.

En mezclas de solventes (v/v) los microgeles de p-NIPAM presentan el fenómeno de *cononsolvencia*. La cononsolvencia es un fenómeno en el que a determinada concentración en una mezcla de dos solventes, como por ejemplo agua y un solvente orgánico, la solubilidad de un soluto disminuye a un punto mínimo mientras que cuando el soluto se encuentra en una solución al 100% de cualquiera de estos dos solventes su solubilidad es alta (Richter, *et al.*, 2014).

La caracterización de la solubilidad en mezclas de solventes de microgeles de p-NIPAM muestra las proporciones de solventes donde se presenta este efecto de cononsolvencia (Fig. 13). La figura 13, muestra que las microesferas de p-NIPAM en agua reducen su tamaño al aumentar la concentración de etanol, isopropanol o tetrahidrofurano, alcanzando el tamaño mínimo a 20% de concentración del solvente a temperatura ambiente. A concentraciones mayores de solvente los microgeles se “hinchan” hasta el máximo tamaño que permite su solubilidad. En la gráfica de la figura 13 se observa que en dos de los solventes utilizados al 100% (isopropanol y tetrahidrofurano) el tamaño alcanzado de las microesferas de p-NIPAM es menor que su tamaño en agua, por otro lado en etanol al 100% las microesferas tienen un tamaño similar o un poco más grande que en agua, es decir que el agua y el etanol son mejores solventes para el p-NIPAM que el isopropanol y el tetrahidrofurano (Richter, *et al.*, 2014).

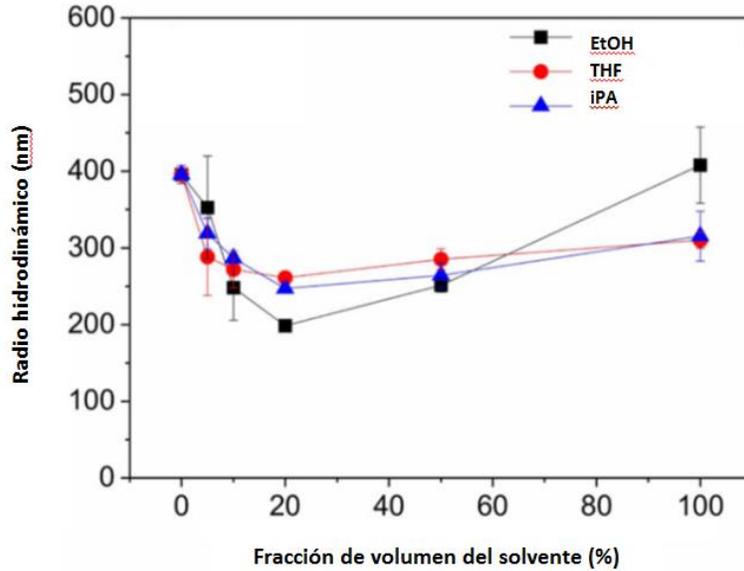


Figura 13 Efecto de cononsolvencia de microesferas de p-NIPAM. Mezclas de agua/solvente: Etanol (EtOH), Tetrahidrofurano (THF), Isopropanol (iPA). Tomada de Richter, *et al.*, 2014.

Algunos estudios explican el efecto de la cononsolvencia por la competencia entre las interacciones solvente-solvente y solvente-polímero (Scherzinger, *et al.*, 2014). Alrededor del punto de cononsolvencia, las moléculas de agua forman una estructura como caltrato alrededor de las moléculas del solvente orgánico. Esto lleva a una red del polímero menos hidratada y la formación de más fuertes uniones polímero-polímero (interacciones hidrofóbicas entre los grupos isopropil) en el interior de la partícula llevando a su colapso. A una concentración de solvente más elevada, las moléculas de agua no son capaces de rodear el solvente orgánico y la estructura de caltrato se rompe, de esta manera, las moléculas de solvente orgánico con mayor movilidad son capaces de interactuar con la red del polímero generando un rehinchamiento de la partícula (Fig. 14) (Richter, *et al.*, 2014).

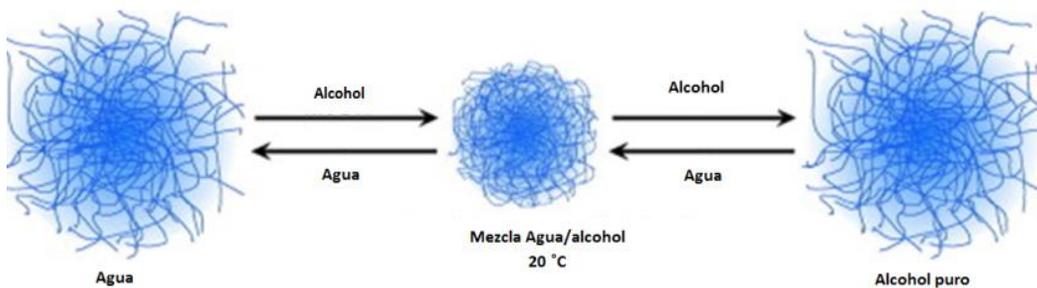


Figura 14. Efecto de Cononsolvencia en las micropartículas de p- NIPAM. Tomada de (Scherzinger, *et al.*, 2014).

3. JUSTIFICACIÓN

A pesar de los numerosos estudios relativos a la aplicación biotecnológica de las nitrilasas en la industria, su utilización se ha limitado por distintas causas como: baja tasa catalítica, especificidad inadecuada para una gama de sustratos y sobre todo inestabilidad intrínseca de las nitrilasas en solventes orgánicos donde los sustratos son más solubles. Considerando que muchas de las transformaciones catalizadas por nitrilasas tienen utilidad potencial para uso en procesos industriales tanto químicos como farmacéuticos y bioremediación, estas enzimas y las condiciones de los procesos técnicos necesitan ser optimizados. La inmovilización de nitrilasas en microgeles de p-NIPAM presentaría ventajas para el aprovechamiento de la catálisis en la degradación de nitrilos ya que esta inmovilización mantiene confinada a la enzima dentro de microesferas y podrían ser utilizadas en medios orgánicos donde los sustratos presentan mayor solubilidad, además de reducir los costos de producción enzimática ya que se facilitaría su reusabilidad y almacenamiento en seco.

4. OBJETIVOS

- **General:**

Desarrollar un método de inmovilización de nitrilasas por encapsulamiento en microgeles de p-NIPAM para generar complejos de alta eficiencia catalítica tanto en agua como en medios orgánicos, con capacidad de reuso y de conservación en seco para su almacenamiento.

- **Particulares:**

- a) Estandarizar un método de síntesis de microgeles de p-NIPAM para el encapsulamiento de nitrilasas.
- b) Caracterizar el comportamiento de los microgeles de p-NIPAM en respuesta a los cambios de temperatura y concentración del solvente orgánico en el medio.
- c) Determinar las condiciones óptimas para el encapsulamiento de nitrilasas en microgeles de p-NIPAM a través del cambio de la temperatura y recambio de solventes.
- d) Evaluar la actividad enzimática y reusabilidad de la nitrilasa encapsulada, en agua y en medios orgánicos, así como la capacidad de almacenamiento en seco de la nitrilasa dentro de los microgeles de p-NIPAM.

5. HIPÓTESIS

- a) Los filamentos de la nitrilasa mutante T328 de *Rhodococcus. sp.* cepa V51B pueden encapsularse dentro de microgeles de p-NIPAM para generar complejos con alta eficiencia catalítica, reusabilidad y de conservación en seco para su almacenamiento.
- b) En un solvente orgánico la nitrilasa encapsulada dentro de las partículas de p-NIPAM tendrá mejor eficiencia catalítica en la degradación de nitrilos que la enzima libre.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Producción y purificación de Nitrilasas recombinantes

Según el método estandarizado para la purificación de nitrilasas (Gómez, 2016), se transformaron células de *Escherichia coli* de la cepa BL21 (DE3) pLysS en medio SOC con el vector de expresión pET24a, el cual tiene integrado a su secuencia el gen de la nitrilasa mutante truncada Δ NitT328. Estas células se crecieron toda la noche en placas de medio sólido Luria-Bertani (LB) complementado con kanamicina (Kan) a 37 °C. Para el enriquecimiento del cultivo se inocularon 5 mL de medio LB-Kan con una colonia fresca del cultivo de células transformadas y se creció durante 12 horas a 37 °C con agitación constante (200 rpm). Los 5 mL del precultivo se centrifugaron durante 10 minutos a 5,000 rpm. Las células se resuspendieron en 1 mL de medio LB y con éste se inoculó 1 L del mismo medio complementado con Kan. Se dejó crecer a 37 °C con agitación constante hasta que se alcanzó la fase de crecimiento exponencial del cultivo a una densidad óptica (DO) de 600 nm \leq 0.8.

La sobreexpresión de la proteína se promovió con la adición del inductor isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 0.4 mM. El cultivo se incubó a 37 °C con agitación constante (200 rpm) por 4 horas. Se cosecharon las células centrifugando los cultivos a 5,000 rpm durante 20 minutos a 4 °C. La biomasa se resuspendió en 40 mL de amortiguador de lisis (Tris 100 mM, KCl 150 mM y EDTA 1 mM) adicionado con 0.2 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF). Las células se rompieron por sonicación a 4 °C con 10 pulsos a 40 % de amplitud y 1 minuto de duración, dejando intervalos de dos minutos entre cada pulso. El extracto total se centrifugó a 15,000 rpm durante 20 minutos. Se realizó una precipitación por fraccionamiento con 20% de sulfato de amonio del extracto celular soluble a 4 °C.

El sobrenadante precipitado con sulfato de amonio se centrifugó a 15,000 rpm durante 20 minutos, las pastilla se resuspendió en 1mL de amortiguador KH_2PO_4 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 200 mM y β -mercaptoetanol 14.25 mM, pH 7 (amortiguador de corrida A). El solubilizado se filtró y se inyectó a una columna de exclusión molecular Sephacryl S-300 equilibrada con el amortiguador de corrida A, a un flujo de 0.5 mL/min, controlada por un equipo HPLC (High Pressure Liquid Chromatography), Waters. Las fracciones se analizaron por SDS-PAGE y las de mayor pureza se juntaron y concentraron en filtros Amicon® Ultra (Millipore).

Cuando la proteína llegó a presentar impurezas se hizo un paso adicional de purificación por cromatografía de intercambio aniónico Source Q previamente equilibrada con el amortiguador de corrida A y se aplicó un gradiente lineal de NaCl de 0.2 a 1M. Las fracciones se analizaron por SDS-PAGE y las de mayor pureza se juntaron y concentraron.

6.2. Preparación de microgeles de p-NIPAM

Los microgeles de PNIPAM fueron preparados mediante polimerización radicalaria sin emulgente. Para ello se disolvió el monómero de N-isopropilacrilamida (NIPAM) con el entrecruzante N,N'-Metilen-bis acrilamida (MBA) en 50 mL de agua destilada. Se utilizaron cuatro distintas proporciones MBA/NIPAM, con las que se sintetizaron cuatro lotes de microgeles de diferentes diámetros hidrodinámicos (Tabla 1).

Tabla 1. Proporciones de MBA/NIPAM utilizadas para sintetizar microgeles de p-NIPAM.

Reactivo	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4
NIPAM (mg)	720	720	720	720
MBA (mg)	32	13	8	4
Relación Porcentual MBA/NIPAM (%)	4.44%	1.8%	1.11%	0.55%
Diámetro hidrodinámico (nm)	332 ±100	668 ±30	1058 ±33	1335 ±97

Una vez disueltos los monómeros, la solución se calentó y degasificó por vacío a 45 °C durante 1 hr. Después de este tiempo, se inició la polimerización añadiendo 1 mL del catalizador persulfato de potasio $K_2S_2O_8$ (0.08 M) como iniciador. Se aplicó una rampa de temperatura aumentando 1 °C cada 2 minutos hasta alcanzar los 65 °C. La polimerización se completó manteniendo la solución 12 h a 65 °C bajo una atmósfera de nitrógeno. Las partículas de microgel se purificaron por filtración con fibra de vidrio y para asegurar la eliminación de cualquier resto de reactivos se dializaron contra agua destilada por 2 semanas con continuos cambios de agua y posteriormente se liofilizaron.

6.3. Evaluación del cambio en tamaño de los microgeles con DLS

El tamaño de partícula de las muestras sintetizadas se determinó estimando los radios hidrodinámicos por dispersión dinámica de luz (DLS) en un equipo Zetasizer μ V con sistema de control de temperatura tipo Peltier. La DLS es una técnica que permite calcular los coeficientes de difusión. Para ello se enfoca un láser sobre una pequeña región de la muestra. La mayoría de la luz atraviesa la muestra pero una pequeña proporción de la luz incidente es dispersada y detectada a un ángulo de 90° , en este caso, respecto de la dirección del haz incidente. El movimiento browniano de las moléculas en la disolución produce fluctuaciones (en la escala de los microsegundos a los milisegundos) en la intensidad de la luz dispersada como consecuencia de la entrada y salida de estas partículas de la región por la que pasa el haz. La frecuencia de estas fluctuaciones en la intensidad de la luz dispersada está relacionada con la difusión de las moléculas. Las microesferas de p-NIPAM según la literatura consultada, tienen una forma esférica lo que permite un acercamiento más próximo al tamaño real a partir del radio hidrodinámico obtenido por DLS. En la presente tesis se evaluó el cambio en el diámetro hidrodinámico de las microesferas de p-NIPAM en respuesta al aumento de la temperatura y con respecto al cambio de la polaridad del medio en distintas concentraciones de isopropanol (iPA), etanol (EtOH) y tetrahidrofurano (THF).

6.4. Encapsulamiento de nitrilasas

El objetivo principal de la presente tesis fue el desarrollo de un método de inmovilización de nitrilasas por encapsulamiento en microesferas de p-NIPAM, por ello el desarrollo del método se retoma en los resultados y la discusión. Después de determinar las mejores condiciones de encapsulamiento, se llevó a cabo el método explicado a continuación: se mezclaron 0.1 mL de NitT328 a 1.5-2 mg/mL con 5 mg de p-NIPAM seco. Se incubó en agitación 12 horas a 4°C para la homogenización y completa dispersión de las partículas de hidrogel. Posteriormente, los encapsulados se incuban a 20°C durante 2 horas y finalmente se incuban arriba de la LCST del p-NIPAM durante 4 horas a 35°C para inducir el estado colapsado de las microesferas. Se centrifugaron durante 10 min a 35°C y se recuperó el sobrenadante para determinar la cantidad de enzima no encapsulada. Después se llevó a cabo un cambio de solvente resuspendiendo los encapsulados en isopropanol al 20%. A esta concentración de solvente las microesferas se mantienen en estado colapsado a temperatura ambiente, este paso de lavado con isopropanol 20% se repitió y se centrifugó a 35°C . Finalmente los encapsulados se liofilizaron para su almacenamiento.

- **Determinación de la concentración de proteína**

Para determinar la cantidad de enzima encapsulada se tomaron algunos encapsulados liofilizados en los cuales se liberó la enzima resuspendiendo los encapsulados en agua a 10 °C, temperatura a la cual las microesferas de p-NIPAM se encuentran turgentes. Se utilizó el método de Bradford para esta determinación utilizando la curva de calibración de la figura 15.

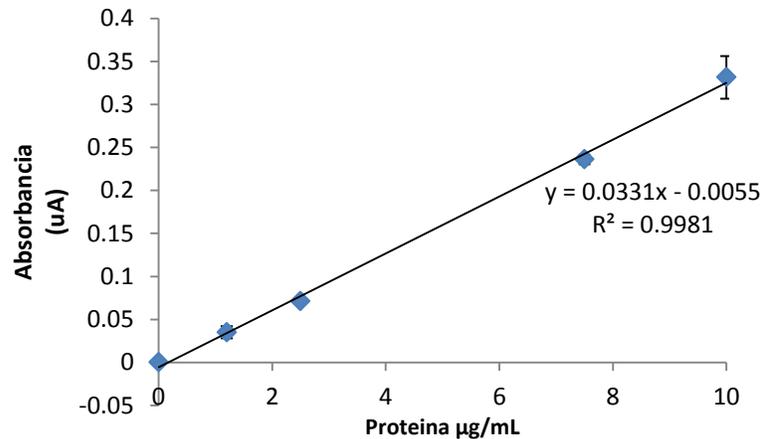


Figura 15. Curva de calibración. Reactivo de Bradford. Albúmina de suero bovino (ASB) 595 nm.

6.5. Microscopía confocal

Para verificar que efectivamente los filamentos de nitrilasa se encontraran dentro de las microesferas de p-NIPAM se utilizó el marcador fluorescente de FLUKA Atto 465 para teñir a las nitrilasas de fluorescencia y poder observarlas por microscopia confocal dentro de las microesferas. El marcaje se llevó a cabo del siguiente modo: Se disolvió la proteína en amortiguador de bicarbonato 0.1 M pH 8.3 a una concentración de 1.5 mg/mL. Se disolvió 1 mg del marcador Atto 465 en 0.5 mL de dimetilsulfoxido. Se utilizaron tres diferentes proporciones molares de proteína y marcador para verificar cuál de ellas resultaba en un marcaje de la proteína más eficiente: 1:1, 1:2 y 1:4 (Nit:Atto). Se dejó en incubación durante 60 min a 25 °C en agitación constante. La enzima marcada se recuperó por filtración en gel en una columna de cromatografía de 1 x 12 cm empacada con resina Sephadex G-25. La columna se equilibró con amortiguador de fosfatos 22 mM a pH 7.2, el mismo amortiguador se utilizó para la elución de la proteína.

Para preparar las muestras, la proteína marcada se incubó con el p-NIPAM a 4 °C durante toda la noche y después se pasó a un cambio de temperatura de 40 °C por 4 horas. Se centrifugaron y se lavaron con buffer de fosfatos a 40 °C para mantener el tamaño colapsado del microgel y evitar la salida de la enzima. Se colocaron 4 µL de la solución enzima/p-NIPAM en el portaobjetos. En otras muestras, después de centrifugar los encapsulados, se lavaron con buffer de fosfatos a 40 °C y posteriormente con isopropanol a temperatura ambiente. Las muestras se observaron en la unidad de Imagenología del instituto de Fisiología Celular de la UNAM bajo la supervisión del encargado responsable del Microscopio FV1000 ZEISS, Dr. Marco Antonio García Aguilera. Las imágenes se analizaron con el software de visualización de imágenes Zen 2.3.

6.6. Determinación de la actividad enzimática

Para la determinación de la actividad enzimática se utilizó como reactivo canónico el benzonitrilo el cual las nitrilasas catalizan su hidrólisis a ácido benzoico y amonio (Fig. 16). Se determinó la actividad de la nitrilasa utilizando dos métodos diferentes; uno colorimétrico y otro por HPLC.

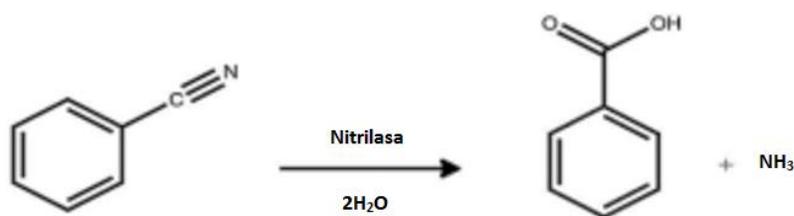


Figura 16. Reacción de hidrólisis del benzonitrilo a ácido benzoico y amonio.

- **Método colorimétrico**

Se utilizó el reactivo comercial, Spectroquant NH₄⁺ (MERCK®), para determinación de amonio en el cual una mezcla alcalina de un derivado fenólico e hipoclorito reacciona con el amonio de la muestra usando nitroprusiato de sodio como catalizador y desarrollando una coloración azul que es directamente proporcional a la cantidad de amonio presente (Fig. 17).

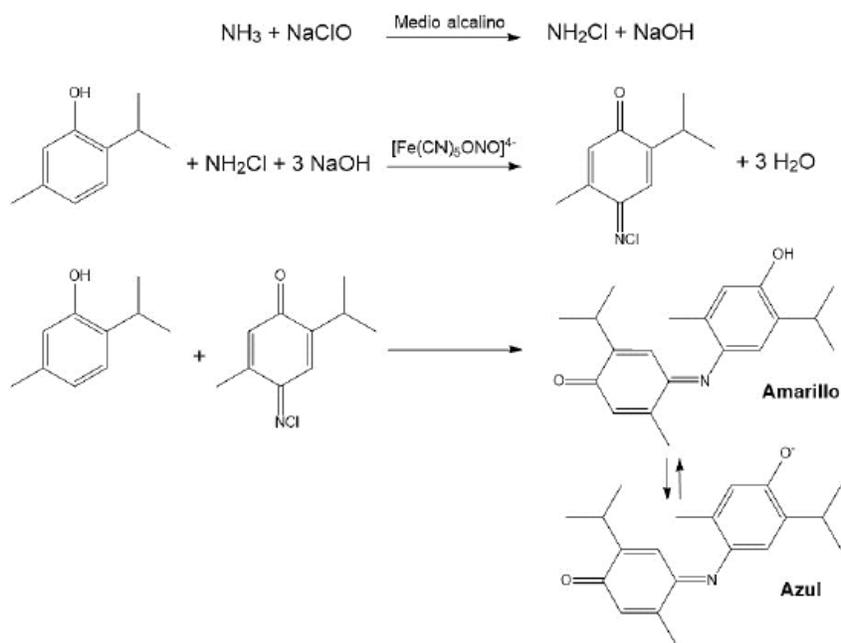


Figura 17. Formación del derivado indofenólico a partir de amoniaco, hipoclorito, nitroprusiato, y timol. Tomado de Afkhami, 2008.

Para llevar a cabo la determinación colorimetría de la producción de amonio se llevaron a cabo pruebas de actividad enzimática por triplicado de la NitT328 libre y de la NitT328 encapsulada en microesferas de p-NIPAM utilizando los sustratos: Benzonitrilo, Antranitrilo, 2-Clorobenzonitrilo, 4-Clorobenzonitrilo, 2-Cloro 4-piridincarbonitrilo, 4-Cloro 2-piridincarbonitrilo, 3-fenilpropionitrilo y Mandelonitrilo. Los ensayos de actividad se llevaron a cabo 35 °C con 1mM de cada sustrato durante 20 minutos para la enzima libre y 60 minutos para la enzima encapsulada. La concentración de amonio en la muestra se determinó mediante una curva de calibración para el reactivo Spectroquant NH_4^+ (MERCK®), midiendo absorbancia a 660 nm (Fig. 18).

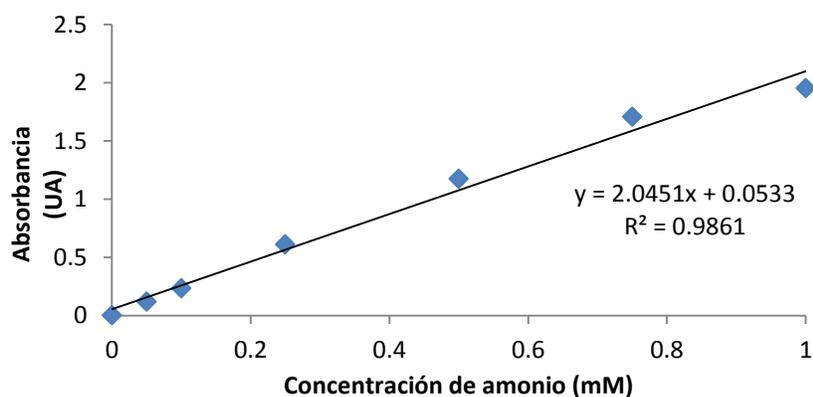
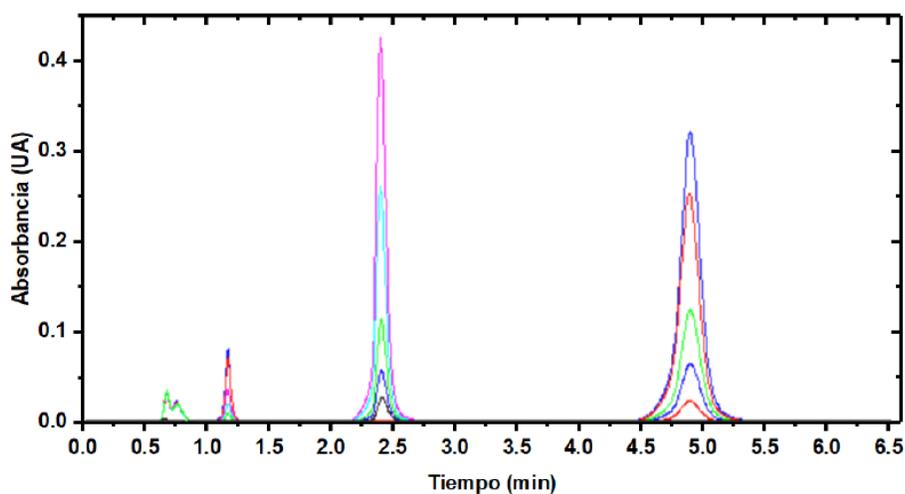


Figura 18. Curva de calibración el reactivo Spectroquant NH_4^+ (MERCK®) utilizado para la determinación de la concentración de amonio.

- **Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)**

Se determinó la concentración de ácido benzoico producido utilizando HPLC en un sistema Alliance, Waters. Esta técnica es usada principalmente para seguir la transformación de nitrilos aromáticos como el benzonitrilo. Se utiliza una columna C 18 (4.6 x 75 mm) acoplada a un detector UV, a una longitud de onda de 220 nm. La muestra de corrida se prepara diluyendo 1:1 de mezcla de reacción con el amortiguador de la fase móvil (fosfatos 50 mM, pH 3.0/acetronitrilo: 70/30% v/v) con la que se equilibra la columna C 18. Las muestras se filtran por membranas de 4.5 μm de poro de nylon antes de inyectar al equipo. Los tiempos de retención del benzamida, ácido benzoico y benzonitrilo en HPLC con columna C18 en este amortiguador son 1.2, 2.4 y 4.9 respectivamente (Fig. 19).



Pico	Nombre	Tiempos de retención
1	Benzamida	1.2
2	Ác. Benzoico	2.4
3	Benzonitrilo	4.9

Figura 19. Tiempos de retención del benzamida, ácido benzoico y benzonitrilo.
Obtenido por HPLC con columna C18.

Las pruebas de actividad de los encapsulados se llevaron a cabo en 1 mL de mezcla de amortiguador de fosfatos 100 mM pH 7.2 con el sustrato benzonitrilo a una concentración final de 1 mM. La reacción se detiene adicionando 100 μL de HCl 2N a 500 μL de mezcla de reacción. Para la determinación de benzonitrilo y ácido benzoico en amortiguador de fosfatos se realizaron curvas de calibración en HPLC (Fig. 20).

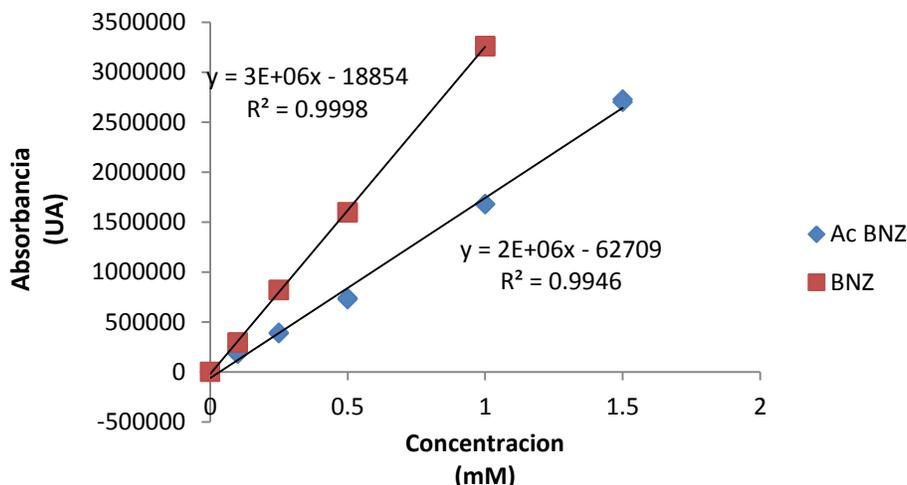


Figura 20. Curvas de calibración para el sustrato Benzonitrilo (BNZ) y Ácido benzoico (Ac BNZ) obtenidas por HPLC. Amortiguador de fosfatos.

Una de las características de las microesferas de p-NIPAM es que se encuentran dispersas en los solventes formando un coloide y por lo tanto la superficie de exposición de las microesferas al sustrato es mayor que la superficie en una inmovilización en geles fijos. Para llevar a cabo la completa dispersión de las microesferas previo a los ensayos de catálisis se pipeteo durante aproximadamente 30 minutos cada muestra de 5 mg de p-NIPAM con nitrilasa encapsulada. La dispersión se llevó a cabo procurando mantener la temperatura 35 °C para evitar se rehincharan las microesferas y escapase la nitrilasa cuando el p-NIPAM se encontraba en amortiguador de fosfatos. Las microesferas de p-NIPAM en isopropanol al 20% v/v se mantienen colapsadas y es posible trabajar a temperatura ambiente sin que las microesferas se pongan turgentes y se escape la enzima.

Para la caracterización de la actividad enzimática de la nitrilasa encapsulada en medios orgánicos se realizaron pruebas de actividad en mezclas hexano/agua al 50%, 90% y 100% v/v. La mezcla de reacción contenía el volumen de amortiguador correspondiente, la enzima encapsulada y libre (10 µg) y benzonitrilo 1 mM disuelto en metanol. La reacción se detuvo añadiendo 100 µL de HCl 2N. De las mezclas de reacción se evaporó el hexano para recuperar en la fase acuosa el ácido benzoico y el benzonitrilo. El volumen final se afora a 600 µL con amortiguador de actividad y se complementa 1:1 con el amortiguador de la fase móvil para hacer la inyección en fase reversa. Se realizaron curvas de calibración para el sustrato benzonitrilo y para el producto ácido benzoico recuperados de las mezclas binarias después de evaporar el hexano (Fig. 21).

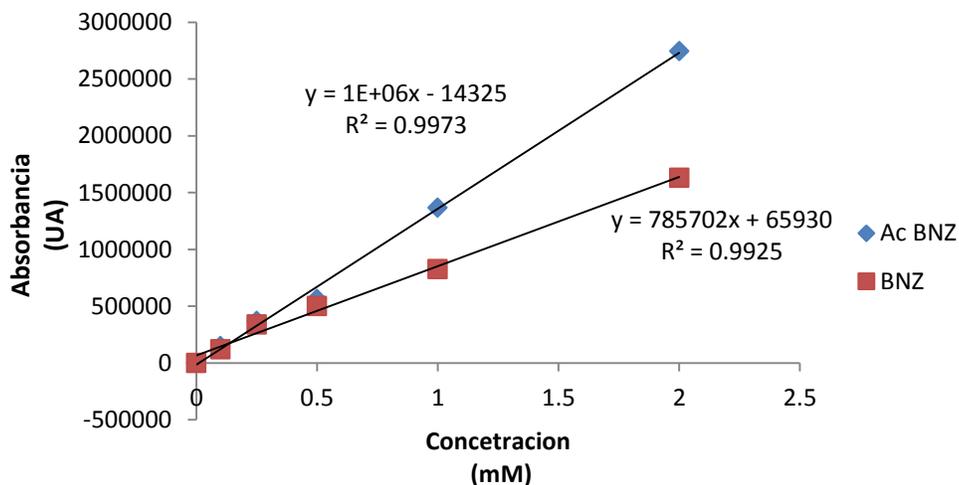


Figura 21. Curvas de calibración para Benzonitrilo (BNZ) y Ácido benzoico (Ac BNZ). Reactivos recuperados después de evaporar el hexano de una mezcla binaria hexano/agua 50 %v/v.

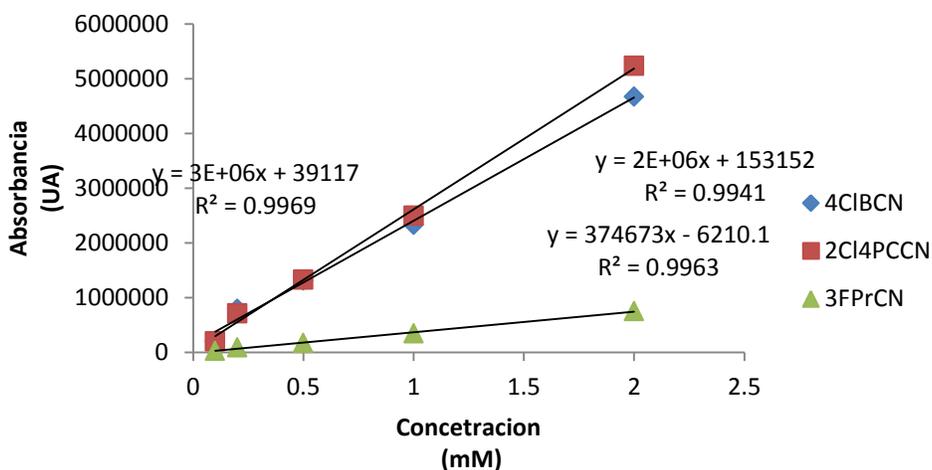


Figura 22. Curvas de calibración para los sustratos 4-Clorobenzonitrilo (4ClBCN), 2-Cloro 4-PiridinCarboitrilo (2Cl4PCCN) y 3-Fenilpropionitrilo (3FPrCN).

7. RESULTADOS

7.1. Sobreexpresión y purificación de la Nitrilasa

Se llevó a cabo la purificación de la nitrilasa mutante trunca NitT328. El rendimiento de la sobreexpresión de nitrilasa es aproximadamente de 14 mg/L. Los filamentos helicoidales que forma la nitrilasa son de gran tamaño así que la precipitación diferencial con sulfato de amonio al 20 % y su posterior purificación por cromatografía de exclusión molecular resulta eficiente pues se obtiene la enzima suficientemente pura para la inmovilización. La enzima se concentró a 1.5 mg/mL para su encapsulamiento (Fig. 23).

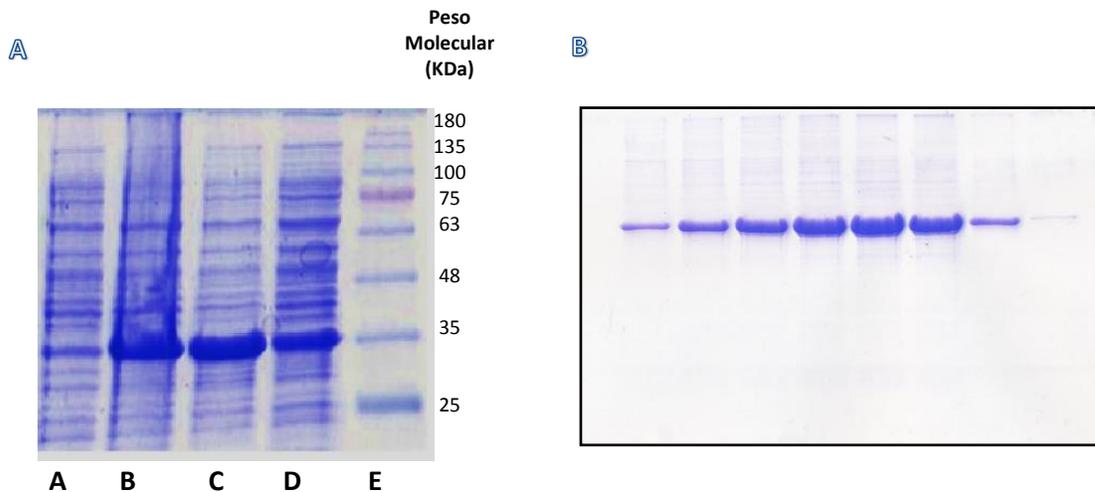


Figura 23. Electroforesis SDS-PAGE de la sobreexpresión y purificación de la NitT328. A: (A) Antes de inducir, (B) Después de inducir, (C) Extracto total, (D) Sobrenadante, (E) Marcador molecular. B: Fracciones de la purificación por exclusión molecular.

7.2. Evaluación del cambio del diámetro hidrodinámico de los microgeles de p-NIPAM con DLS

Se llevó a cabo la síntesis en cuatro lotes de microgeles P-NIPAM con distintas proporciones en la concentración de los monómeros NIPAM y MBA (Tabla 1). Se determinó el diámetro hidrodinámico por DLS. En la tabla 2 se muestra que la proporción de NIPAM y entrecruzante determina el tamaño de las microesferas, entre menor sea la cantidad de entrecruzante las microesferas formadas presentan mayor diámetro hidrodinámico y de modo inverso, cuando se aumenta la cantidad de entrecruzante MBA las esferas formadas tienen menor tamaño. El Lote 1 son esferas muy pequeñas de 300 nm, en cambio el lote 4 tiene esferas más grandes con poco más de 1300 nm (Tabla 2).

Tabla 2. Diámetro hidrodinámico de las microesferas de p-NIPAM determinado por DLS. El valor del diámetro hidrodinámico representa el promedio de 10 mediciones en DLS.

Lote	Temperatura (°C)	Diámetro hidrodinámico (nm)	%MBA	Índice de polidispersidad
1	20	332 ±100	4.4%	0.438
	40	103 ±17		0.35
2	20	668 ±30	1.8%	0.36
	40	267 ±10		0.057
3	20	1058 ±33	1.1%	0.49
	40	385 ±10		0.185
4	20	1335 ±97	0.5%	0.24
	40	518 ±30		0.101

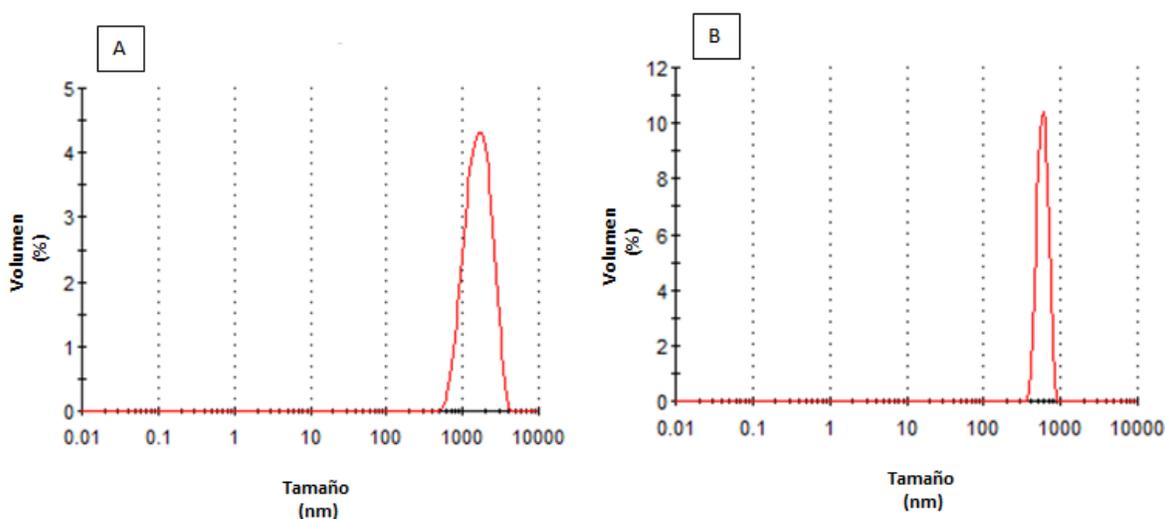


Figura 24. Polidispersidad de las microesferas de p-NIPAM. Microesferas de p-NIPAM del Lote 4 (A) 20 °C. Índice de polidispersidad: 0.24 Average Z: 1,243 nm. (B) 40 °C Índice de polidispersidad 0.101. Average Z: 520.2 nm

. El índice de polidispersidad obtenido por DLS (Tabla 2 y Fig. 24) indica que la heterogeneidad de tamaños de microesferas de p-NIPAM en las muestras es mayor cuando estas se encuentran por debajo de la LSCT. Al elevar la temperatura por encima de la LCST el índice de polidispersidad es menor lo que indica que la muestra presenta menor heterogeneidad de tamaños cuando las microesferas de p-NIPAM encuentran en su cambio de fase. La caracterización se llevó a cabo utilizando las microesferas de p-NIPAM del lote 4 ya que son las que presentaron mayor diámetro hidrodinámico y posiblemente contengan mayor cantidad de proteína dentro.

- **Respuesta del p-NIPAM al cambio en la temperatura**

El polímero de los microgeles-p-NIPAM es termosensible, por lo que se lleva a cabo el cambio de fase al elevar la temperatura por encima de la LCST. La solución de microgel de p-NIPAM en agua es translúcida cuando se encuentra a temperatura ambiente, al elevar la temperatura de la LCST a 35 °C, se produce el cambio de fase observable con el cambio en la turbidez de la solución (Fig. 25).

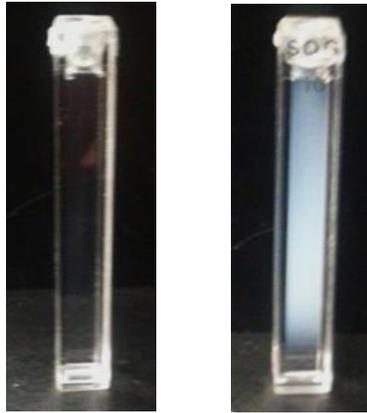


Figura 25. Cambio de fase del p-NIPAM en agua. *Izquierda* 25 °C (Debajo de la LCST). *Derecha* 35 °C (Temperatura por encima de la LCST). Micropartículas de p-NIPAM del Lote 4.

Se siguió el cambio de tamaño de los microgeles en respuesta a cambios en la temperatura. En la figura 26 se muestran los diámetros de las partículas de p-NIPAM de los 4 lotes sintetizados, en respuesta a los cambios de temperatura. En los lotes 3 y 4 se observa una transición de volumen cerca de los 33 °C y alcanzan una reducción mínima de su tamaño a los 35 °C. Por otro lado los lotes 1 y 2 la transición de fase ocurre entre los 35 y 40 °C. En todos los lotes el tamaño de las microesferas se reduce hasta en un tercio del tamaño original (Fig. 26 y Tabla 2).

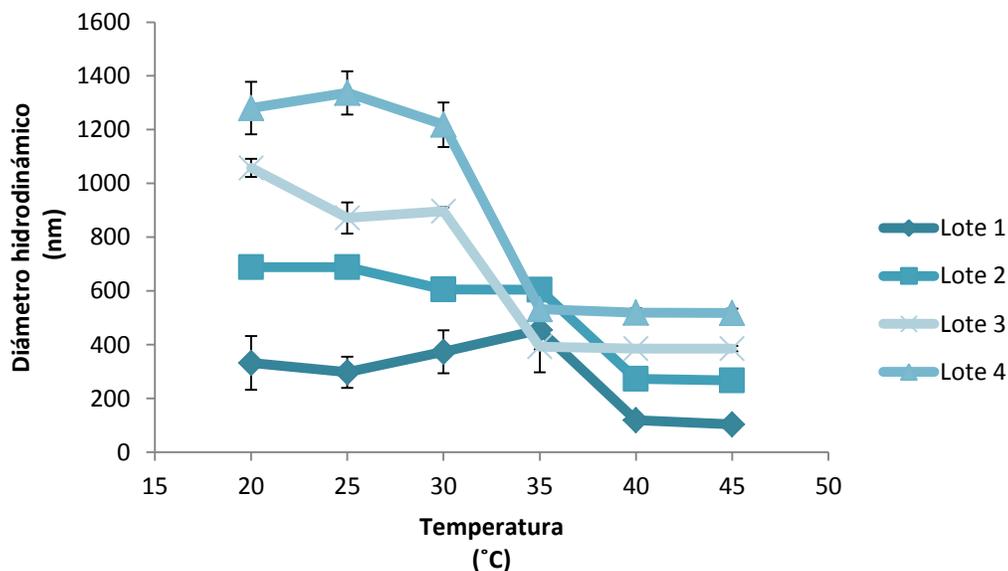


Figura 26. Respuesta de las partículas de p-NIPAM al cambio de temperatura. Determinado por DLS, p-NIPAM en agua. Las microesferas colapsan y reducen su tamaño

- **Respuesta del p-NIPAM al cambio en la concentración de solventes orgánicos: efecto de consolevencia**

Se determinó el diámetro hidrodinámico por DLS de las microesferas de p-NIPAM a 20 °C, en distintos solventes orgánicos: etanol, metanol, tetrahidrofurano e Isopropanol. Las determinaciones se hicieron con las microesferas del lote 4. En la figura 27 se observa el cambio en el diámetro de las partículas de p-NIPAM en función del aumento de la concentración de solvente en el medio. En todos los solventes el cambio de fase se observó cuando el p-NIPAM se encuentra en una solución 20% v/v. Hay que mencionar que las mezclas se hicieron con amortiguador de fosfatos que se usó para las pruebas de actividad enzimática.

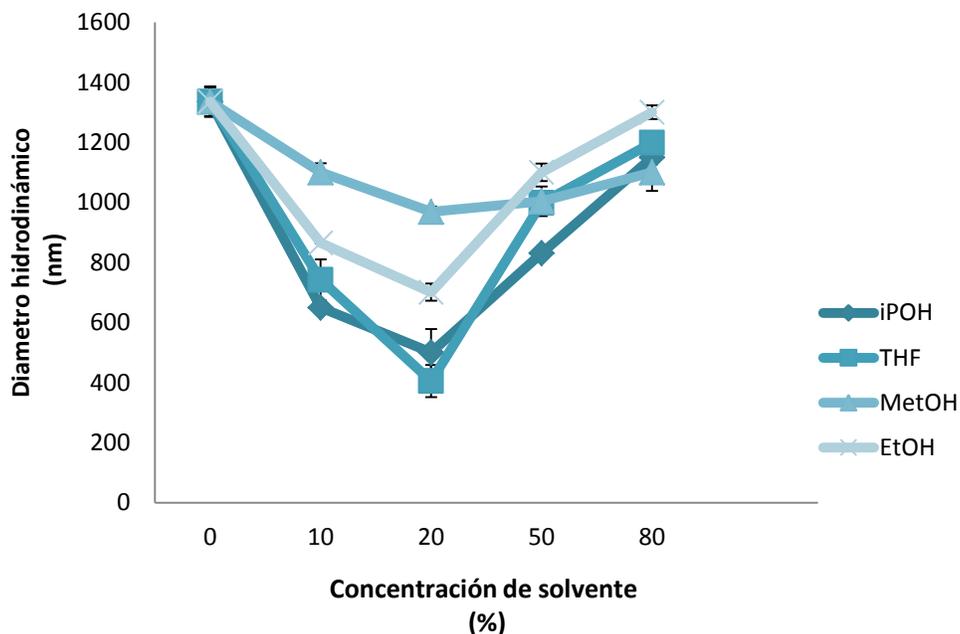


Figura 27. Diámetro hidrodinámico de las microesferas de p-NIPAM en función de la concentración de solvente orgánico. iPOH: Isopropanol; THF: Tetrahidrofurano, MetOH: metanol; EtOH: Etanol. Las mediciones a 20 °C.

Con base a la información de la figura 27, se determinó a llevar a cabo el encapsulamiento utilizando isopropanol al 20% para el recambio de solvente ya que a esta concentración de solvente las microesferas se encuentran colapsadas a temperatura ambiente. Además a esta concentración de solvente no se inactiva la NitT328.

7.3. Desarrollo del método de inmovilización por encapsulamiento

El encapsulamiento de la nitrilasa se llevó a cabo aprovechando la capacidad del hidrogel de p-NIPAM para responder al cambio de temperatura y a la concentración de solventes en el medio. Se realizaron diversos ensayos para estandarizar y optimizar este método. Inicialmente se implementó el método descrito por Ansorge-Schumacher y Wang (2012): 5 mg de microgeles de p-NIPAM hidratados con amortiguador se incuban en 1 mL de solución con 0.1 mL de enzima (2mg/mL) por 2 h a temperatura ambiente y de 14-16 h a 35 °C. La mezcla se centrifuga y el precipitado se lava 3 veces con Isopropanol al 100 %. Después de realizar diversas pruebas, se descartó este método ya que no retenía la actividad de la nitrilasa en los encapsulados, aparentemente los lavados con isopropanol al 100% inactivaron a la nitrilasa y fue muy poca la cantidad de enzima que se retuvo dentro de los microgeles (datos no mostrados).

Posteriormente se implementó el método llamado “Breath taking” en el cual se procura la difusión de la enzima dentro de la microesfera de p-NIPAM al mismo tiempo que se rehidrata (Smith, 2012): 5 mg de los microgeles de p-NIPAM liofilizados y secos se rehidrataron directamente con 100 μ L de solución de enzima (1.5-2 mg/mL). Al resuspender las microesferas de p-NIPAM en el amortiguador con la Nit T328 se forma una mezcla coloidal que se mantiene en constante agitación, primero 12 horas a 4 $^{\circ}$ C, seguido por incubación a 20 $^{\circ}$ C por 2 horas, para después llevar a cabo un cambio de temperatura por encima de la LCST, a 40 $^{\circ}$ C y reducir el tamaño de las esferas. Se centrifuga a 35 $^{\circ}$ C para evitar que las microesferas reviertan su tamaño y liberen la enzima. Finalmente para evitar que las partículas del hidrogel regresen a su tamaño turgente a temperatura ambiente, se realiza un recambio de solvente con isopropanol al 20%, de este modo los microgeles de p-NIPAM pueden mantenerse en su tamaño de colapsado a temperatura ambiente 25 $^{\circ}$ C y se evita la salida de la enzima, además a esta concentración de isopropanol la nitrilasa no se inactiva con el recambio de solvente (Fig. 28). Finalmente los encapsulados se centrifugan y liofilizan para su resguardo en un cuarto frío a 4 $^{\circ}$ C.

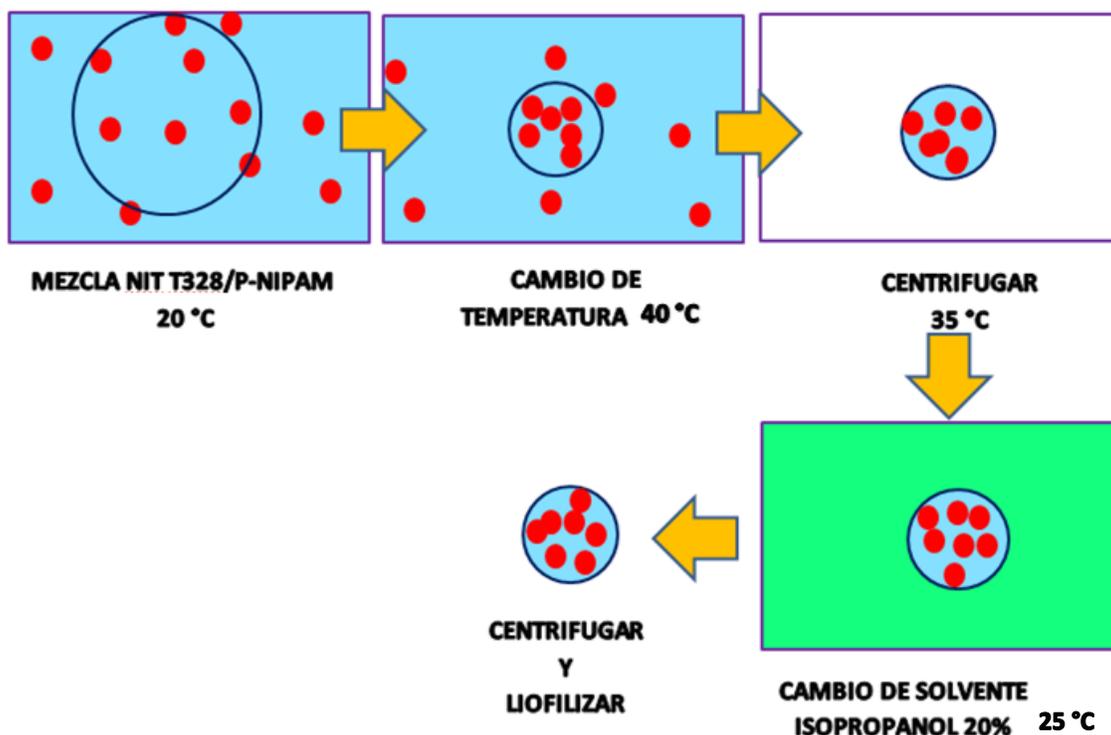


Figura 28. Diagrama del desarrollo del método de encapsulamiento de la Nit T328 en microesferas de p-NIPAM. Al elevar la temperatura por encima de la LCST a 40 $^{\circ}$ C, las microesferas de p-NIPAM colapsan atrapando la enzima dentro. Posteriormente se realiza el cambio de solvente a isopropanol al 20%, a esta concentración de solvente se da el efecto de *cononsolvencia* y las microesferas de p-NIPAM se mantienen colapsadas a temperatura ambiente. Finalmente los encapsulados se deshidratan para su conservación en seco

7.4. Microscopía confocal

Para preparar las muestras se incubó la NitT328 teñida con el marcador Atto 465 con las microesferas de p-NIPAM a 4 °C durante toda la noche y después se pasó a un cambio de temperatura de 40 °C por 4 horas para inducir el cambio de fase. Los complejos encapsulados (p-NIPAM/Nitrilasa) se centrifugaron y se lavaron con buffer de fosfatos (Fig. 29) o Isopropanol (Fig. 30) para retirar la enzima no encapsulada.

La figura 29 contiene la imagen obtenida por microscopía confocal de la muestra que se lavó con amortiguador de fosfatos únicamente. En la figura 29 A se observa la fluorescencia de la proteína marcada; en la figura 29 B se distinguen las microesferas de p-NIPAM en campo oscuro, las cuales muestran un diámetro aproximado de 1.5 micrómetros, esto corresponde a lo observado por DLS (diámetro de 1330 nm, Lote 4) para las microesferas de p-NIPAM que fueron utilizadas en la preparación de las muestras. La figura 29 C muestra la sobreposición de las dos imágenes anteriores y en ella se observa que la fluorescencia de la nitrilasa no coincide con las microesferas de p-NIPAM, aparentemente la nitrilasa marcada se encuentra por fuera de las microesferas de p-NIPAM. En la figura 29 D se muestra la reconstrucción de la microscopia confocal en la cual se observa a la nitrilasa fluorescente por fuera de las microesferas de p-NIPAM. El encapsulamiento en esta muestra se llevó a cabo por cambio de temperatura a 40 °C sin embargo al tomar las capturas, ya que el cuarto de microscopía es frío, se deduce que las partículas regresaron a su tamaño original y las nitrilasas difundieron hacia afuera de las microesferas.

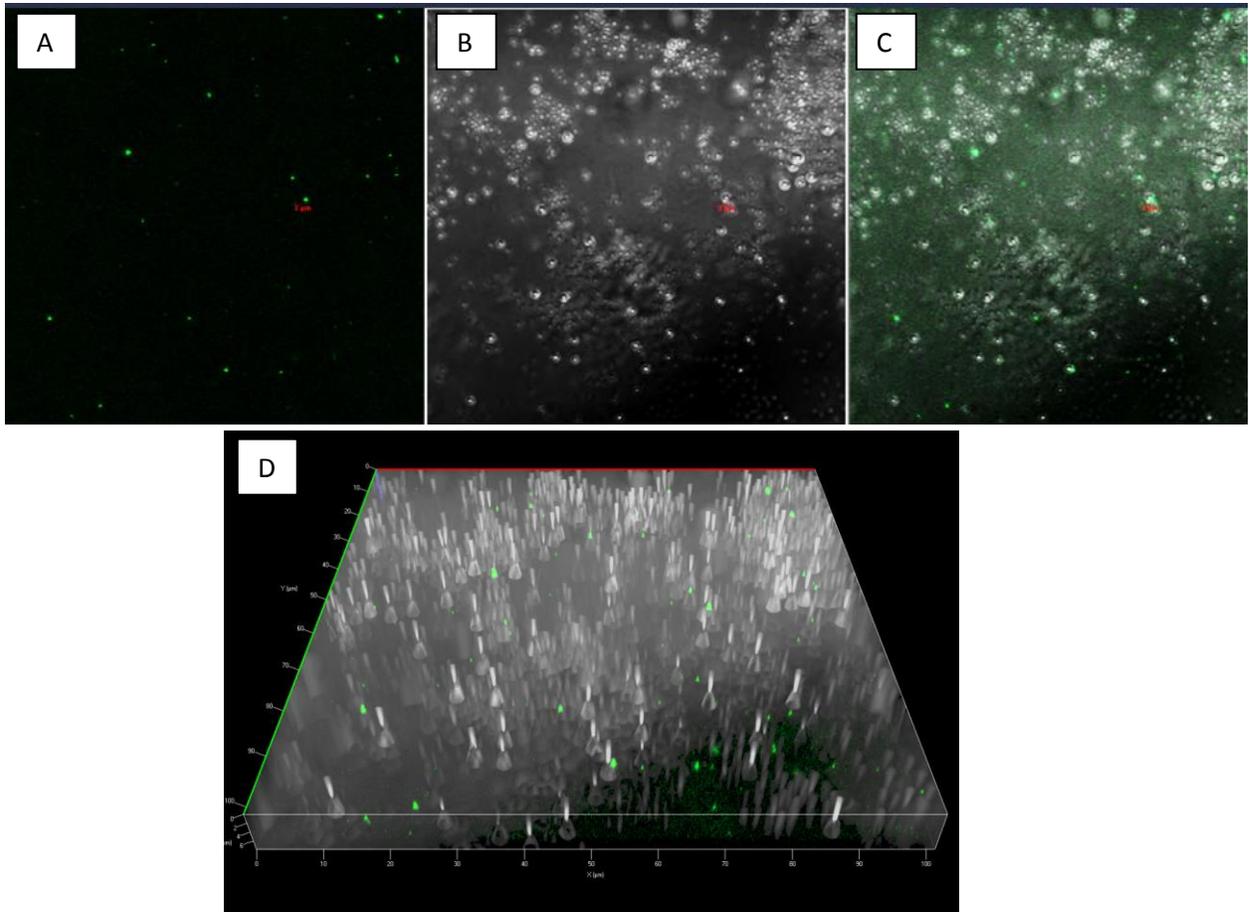


Figura 29. Microscopía confocal de las microesferas de p-NIPAM/NitT328 en amortiguador de fosfatos. (A) Nitrilasa fluorescente, (B) microesferas de p-NIPAM, (C) sobreposición de imágenes, (D) Reconstrucción de las microesferas en la cual se observa la Nit T328 por fuera de las microesferas de p-NIPAM.

La figura 30 contiene la imagen obtenida por microscopía confocal de la muestra de encapsulados a los cuales se les hizo un cambio de solvente a isopropanol. En la figura 30 A se observa la nitrilasa fluorescente, en la figura 30 B se distinguen las microesferas de p-NIPAM en campo oscuro y en la figura 30 C se muestra la sobreposición de las imágenes anteriores, en esta imagen se observa que coinciden las proteínas fluorescentes con las microesferas de p-NIPAM. En la figura 30 D se muestra la reconstrucción de la microscopía confocal, se observa la nitrilasa ubicada en el interior de las microesferas de p-NIPAM, el efectivo encapsulamiento se explica por el reparto favorable de la proteína hacia el agua dentro de la microesferas de p-NIPAM al llevar a cabo el cambio de solvente.

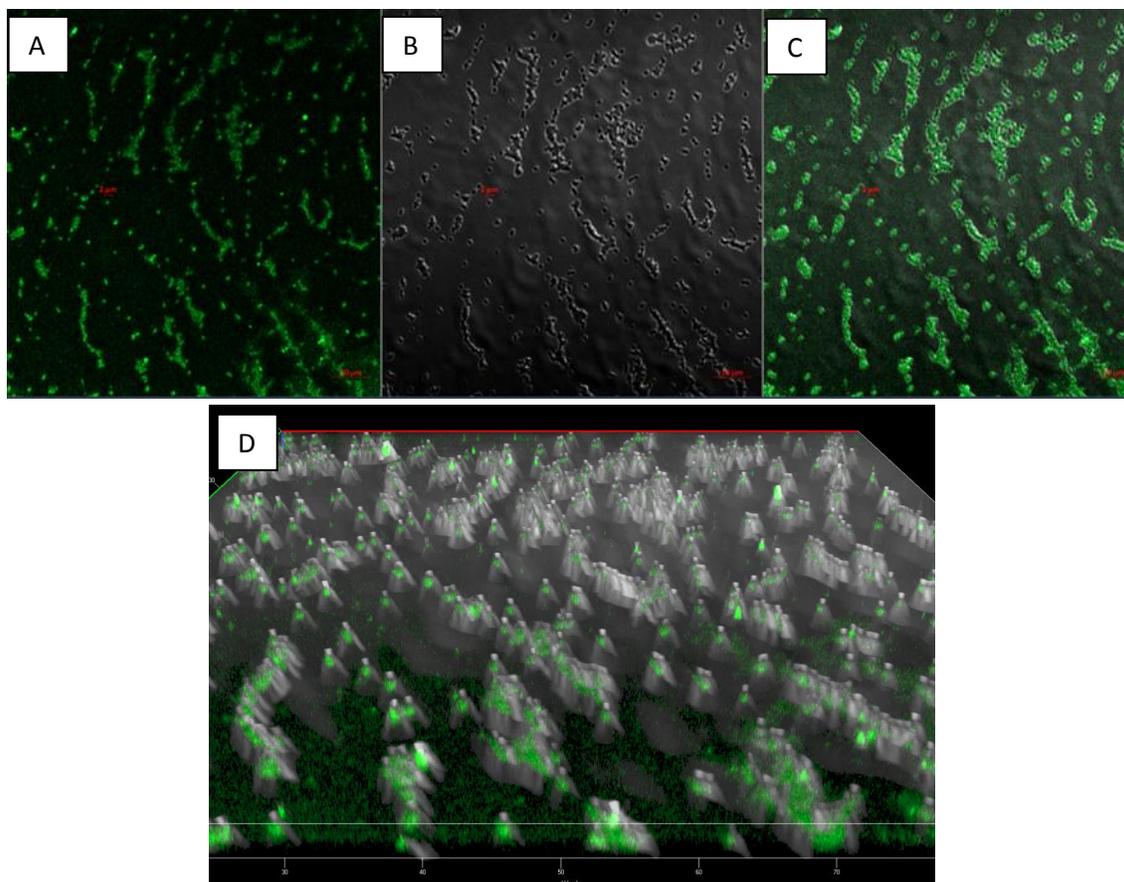


Figura 30. Microscopía confocal de las microesferas de p-NIPAM/NitT328 en isopropanol. (A) Nitrilasa fluorescente. (B) Microesferas de p-NIPAM. (C) sobreposición de imágenes A y B. (D) Reconstrucción de las microesferas en la cual se observa la NitT328 dentro de las microesferas de p-NIPAM.

7.5. Determinación de la cantidad de enzima encapsulada

Para determinar la cantidad de proteína encapsulada, se liberó la enzima previamente confinada en los microgeles de p-NIPAM en 1 mL de amortiguador de fosfatos a 10 °C con agitación constante, posteriormente se utilizó el reactivo de Bradford para cuantificar la nitrilasa. Se determinó que en cada 5 mg de p-NIPAM se encapsulan aproximadamente $10.3 \mu\text{g} \pm 0.8 \mu\text{g}$ de nitrilasa.

7.6. Pruebas de actividad

a) Determinación colorimétrica

Se llevaron a cabo pruebas de actividad enzimática de la Nit T328 libre y de la NitT328 encapsulada para la determinación colorimétrica de la producción de amonio utilizando los sustratos: Antranitrilo, 2-Clorobenzonitrilo, 4-Clorobenzonitrilo, 2-Cloro 4-piridinocarbonitrilo, 4-Cloro 2-piridinocarbonitrilo, 3-fenilpropionitrilo y Mandelonitrilo. La NitT328 libre únicamente presentó actividad para los sustratos: Benzonitrilo, 4-Clorobenzonitrilo, 2-Cloro 4-Piridinocarbonitrilo y el 3-Fenilpropionitrilo (Fig. 31). La NitT328 encapsulada presentó actividad para los mismos sustratos que la enzima libre.

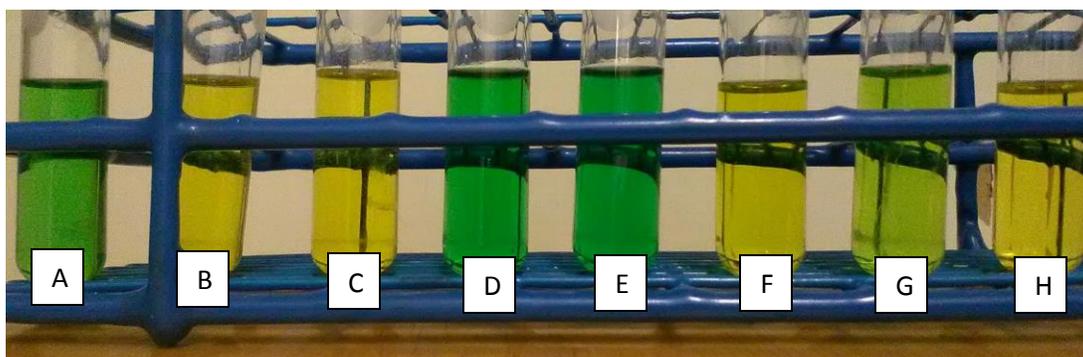


Figura 31. Determinación colorimétrica de la actividad de la NitT328. Los sustratos correspondientes son: (A) Benzonitrilo. (B) Antranilonitrilo. (C) 2-Clorobenzonitrilo. (D) 4-Clorobenzonitrilo. (E) 2-Cloro 4-Piridinocarbonitrilo. (F) 4-Cloro 2-Piridinocarbonitrilo. (G) 3-Fenilpropionitrilo. (H) Mandelonitrilo.

Se determinó la velocidad específica ($\mu\text{mol de NH}_4^+/\text{min} \times \text{mg Nit}$) (Tabla 4) de la NitT328 libre y Nit328 encapsulada para cada uno de los sustratos a partir de la concentración de amonio calculada utilizando la curva de calibración para el reactivo Spectroquant (MERCK®). Para el sustrato benzonitrilo la NitT328 libre presentó velocidad de $5,100 \mu\text{mol de NH}_4^+/\text{min} \times \text{mg Nit}$, este es el sustrato modelo con el que se llevaron a cabo la mayoría de las pruebas de actividad del presente estudio. Las velocidades calculadas para la NitT328 libre para los sustratos 4-Clorobenzonitrilo, 2-Cloro 4-Piridinocarbonitrilo y 3-Fenilpropionitrilo fueron $7,700 \mu\text{mol de NH}_4^+/\text{min} \times \text{mg Nit}$, $9,350 \mu\text{mol de NH}_4^+/\text{min} \times \text{mg Nit}$ y $1,750 \mu\text{mol de NH}_4^+/\text{min} \times \text{mg Nit}$ respectivamente (Tabla 4).

La velocidad de reacción de la NitT328 se vio afectada por el encapsulamiento ya que hubo pérdida de actividad en comparación con la NitT328 libre, reteniendo el 31.6% de su actividad para el benzonitrilo, el 22.6% para el 4-Clorobenzonitrilo, 18.8% para el 2-Cloro 4-Piridinocarbonitrilo y 28% para el 3- Fenilpropionitrilo.

Tabla 3. Velocidades de la NitT328 libre y NitT328 encapsulada, para diferentes sustratos.

Sustrato	Coeficiente de reparto	Nit T328 Libre	Nit T328 Encapsulada	Actividad retenida
		Velocidad ($\mu\text{mol}/\text{min} \times \text{mg Nit}$)	Velocidad ($\mu\text{mol}/\text{min} \times \text{mg Nit}$)	%
Benzonitrilo	1.56	5100	1580	31.6%
Antranilonitrilo	1.4	0	0	-
2-Clorobenzonitrilo	2.21	0	0	-
4-Clorobenzonitrilo	2.196	7700	1745	22.66%
2-Cloro 4-Piridinocarbonitrilo	1.176	9350	1710	18.8%
4-Cloro 2-Piridinocarbonitrilo	1	0	0	-
3-Fenilpropionitrilo	1.94	1750	496	28%
Mandelonitrilo	0.83	0	0	-

b) Determinación por HPLC

Se determinó por HPLC que la NitT328 encapsulada hidroliza 1 mM benzonitrilo en 60 minutos aproximadamente (Fig. 32). La enzima llegó a la velocidad específica de 5,100 μmol de $\text{NH}_4^+/\text{min} \times \text{mg Nit}$ y después de la inmovilización disminuye a 1,550 μmol de $\text{NH}_4^+/\text{min} \times \text{mg Nit}$. Tomando en cuenta los 10.3 μg de nitrilasa encapsulada, se calculó que mantiene el 30.3% de la actividad con respecto a la enzima libre. El confinamiento reduce el contacto de la enzima con el sustrato y por lo tanto la difusión de este al sitio activo, además la interacción electrostática de la NitT328 con las cadenas de p-NIPAM podrían afectar también la actividad enzimática.

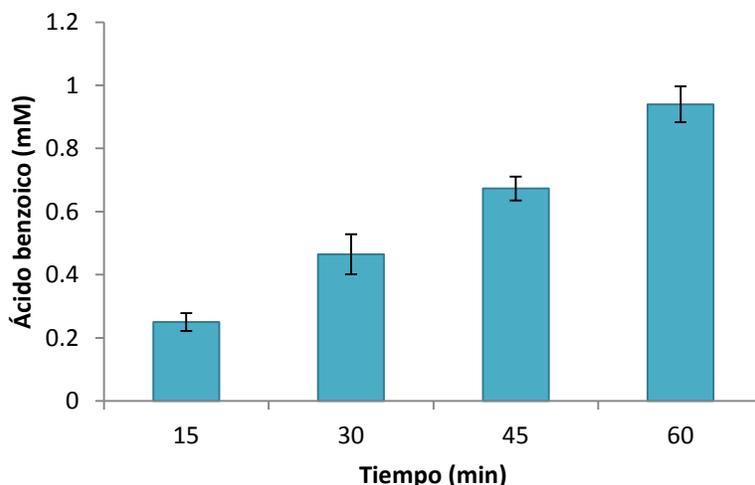


Figura 32. Actividad enzimática de la Nit T328 encapsulada. Actividad a 35 °C con 1mM de benzonitrilo deteniendo con 0.1 mL de HCl 2N cada 15 minutos.

Uno de los objetivos principales del encapsulamiento fue proteger a la nitrilasa del efecto desnaturizante de los solventes orgánicos miscibles en agua, como el isopropanol y en acetona. Se probó la actividad de la nitrilasa encapsulada en el solvente isopropanol al 100% y se observó que la nitrilasa encapsulada conserva el 33% de su actividad en este solvente y que aún es posible reutilizar el encapsulado una vez más en isopropanol (Fig. 33). La enzima libre es completamente inactiva en isopropanol al 100%.

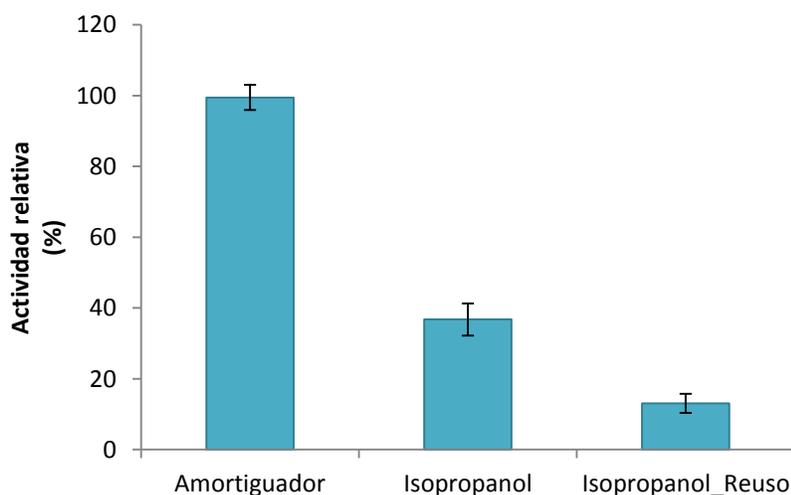


Figura 33. Actividad relativa de a NitT328 encapsulada en isopropanol y amortiguador de fosfatos. Actividad a 35 °C con 1mM de benzonitrilo por 1 h deteniendo con 0.1 mL de HCl 2N.

También se realizó una prueba en acetona en mezclas con amortiguador de fosfatos ya que en este solvente el benzonitrilo es más soluble que en agua y la nitrilasa libre es inactiva. Para determinar la cantidad de producto en acetona, estas muestras fueron puestas a evaporar y el precipitado se resuspendió para inyectar al HPLC. Los encapsulados en 50 % y 20 % de acetona v/v muestran actividad comparados con la enzima soluble que es inactiva en este solvente (Fig. 34).

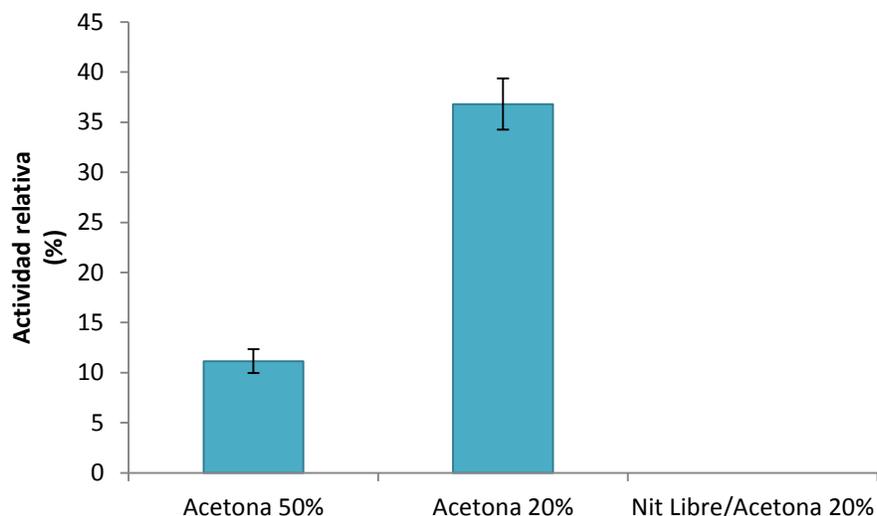


Figura 34. Actividad relativa en acetona. Actividad a 35 °C con 1mM de benzonitrilo, por 1 h deteniendo con 0.1 mL de HCl 2N.

c) Actividad en mezclas de hexano

Se realizó una comparación entre la actividad de la NitT328 libre y la NitT328 encapsulada, en hexano 100 % v/v. En la figura 35 se observa que es mayor la actividad de la enzima libre que en el encapsulado. Probablemente se deba a la disponibilidad de agua la cual se encuentra muy limitada para la NitT328 encapsulada. Al rehidratar y resuspender en amortiguador de fosfatos las micropartículas de p-NIPAM, el amortiguador de fosfatos entra a las microesferas y es en este microambiente acuoso donde se lleva a cabo la hidrólisis enzimática. En cambio al añadir a la reacción la NitT328 libre, esta no se encuentra en seco sino en 10 µL de amortiguador de fosfatos y es en este medio donde se lleva a cabo la reacción de catálisis (Fig. 35).

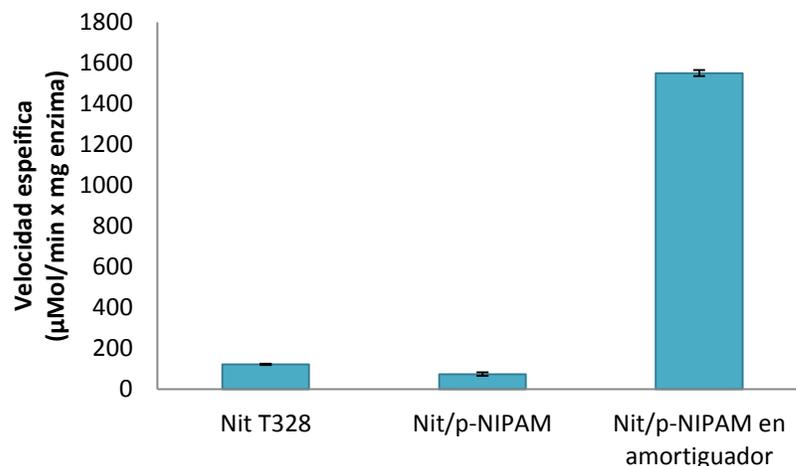


Figura 35. Actividad de la NitT328 libre y de la NitT328 encapsulada, en hexano 100%. En la tercera columna se muestra la actividad del encapsulado Nit/p-NIPAM en amortiguador de fosfatos. Actividad a 35 °C con 1mM de benzonitrilo, por 1 h deteniendo con 0.1 mL de HCl 2N.

Se realizaron pruebas de actividad enzimática de la NitT328 encapsulada en mezclas binarias de hexano. La catálisis se ve afectada por la concentración del solvente orgánico. La actividad enzimática es mayor en amortiguador de fosfatos que en las mezclas de hexano a cualquier proporción, a medida que se reduce la cantidad de hexano la catálisis se hace más eficiente (Fig. 36).

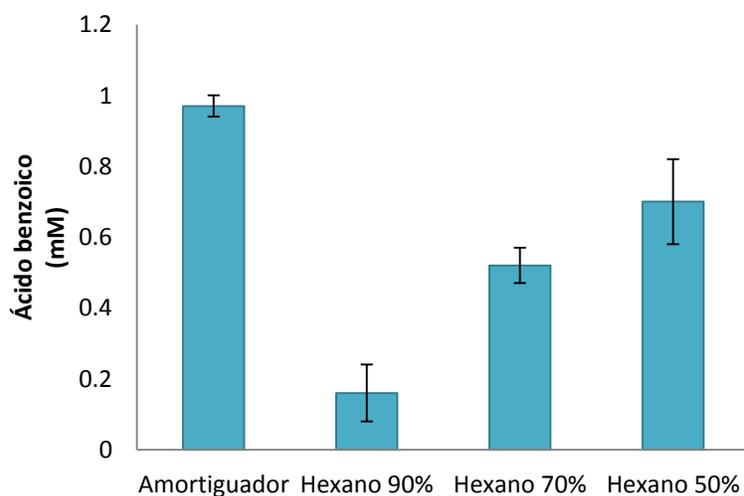


Figura 36. Actividad enzimática de los encapsulados en mezclas binarias de hexano/amortiguador de fosfatos. Actividad a 35 °C con 1mM de benzonitrilo por 1 h deteniendo con 0.1 mL de HCl 2N.

Para determinar el tiempo en el que la enzima encapsulada convierte el total de 1mM del sustrato benzonitrilo se realizaron ensayos de actividad en mezclas de hexano/amortiguador de fosfatos a 50%, 70% y 90% así como en amortiguador de fosfatos sin hexano deteniendo la reacción cada 15 minutos hasta las dos horas. La figura 36 muestra la concentración de ácido benzoico producido por NitT328 encapsulada. La NitT28 encapsulada produce 1mM de ácido benzoico en 1 h cuando se encuentra en amortiguador de fosfatos. Por otro lado cuando la NitT328 encapsulada se encuentra en hexano al 90%, no se lleva a cabo la conversión total del sustrato se produce únicamente 0.3 mM del producto de la reacción. En las mezclas a 50% y 70 % hexano la NitT328 encapsulada convierte el total del sustrato a las 2 horas sin embargo en la mezcla hexano 50% es más rápido el proceso (Fig. 37).

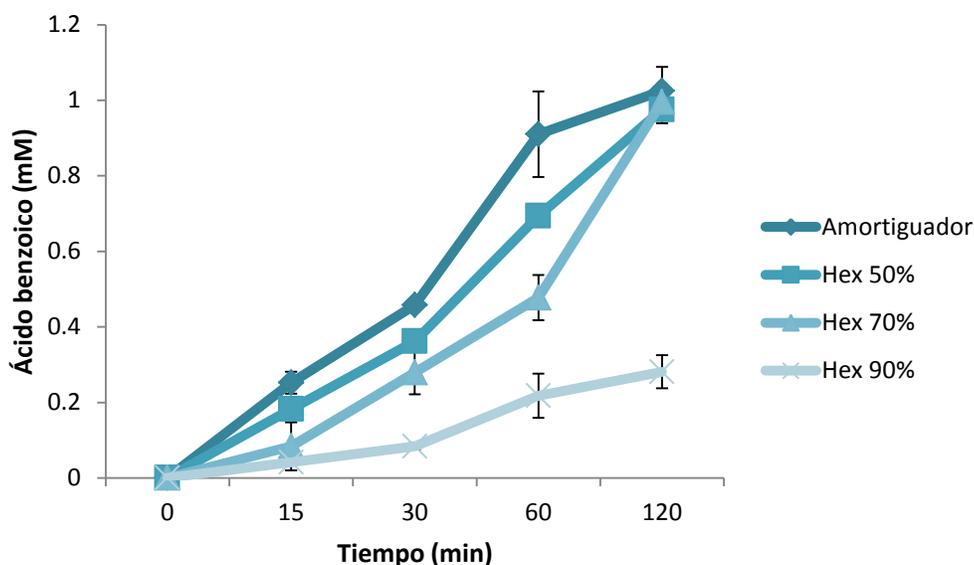


Figura 37. Actividad de la nitrilasa encapsulada en distintos tiempos en mezclas binarias de Hexano/amortiguador de fosfatos. Actividad a 35 °C con 1mM de benzonitrilo deteniendo la reacción cada 15 minutos hasta las 2 h con 0.1 mL de HCl 2N.

d) Reusabilidad

Se llevaron a cabo pruebas de actividad de los encapsulados en 5 reúsos consecutivos en amortiguador de fosfatos y en mezclas de hexano al 70% y 50% v/v. En la figura 38 se observa que en amortiguador de fosfatos se mantiene la actividad en el primer reuso, sin embargo en los siguientes reúsos se conserva el 65% de la actividad inicial. En las mezclas de hexano, se mantiene el 70% de actividad durante los siguientes reúsos. La nitrilasa liberada de los encapsulados de las mezclas binarias recuperó mayor actividad en comparación con los encapsulados en amortiguador. Posiblemente se pierde

más enzima durante los reusos en amortiguador ya que la enzima es más soluble en agua y en las mezclas hexano/agua se favorece la partición de la enzima en el p-NIPAM. Después de 5 reusos se liberó la NitT328 para probar actividad, entre mayor es la cantidad del solvente hexano se retiene más actividad.

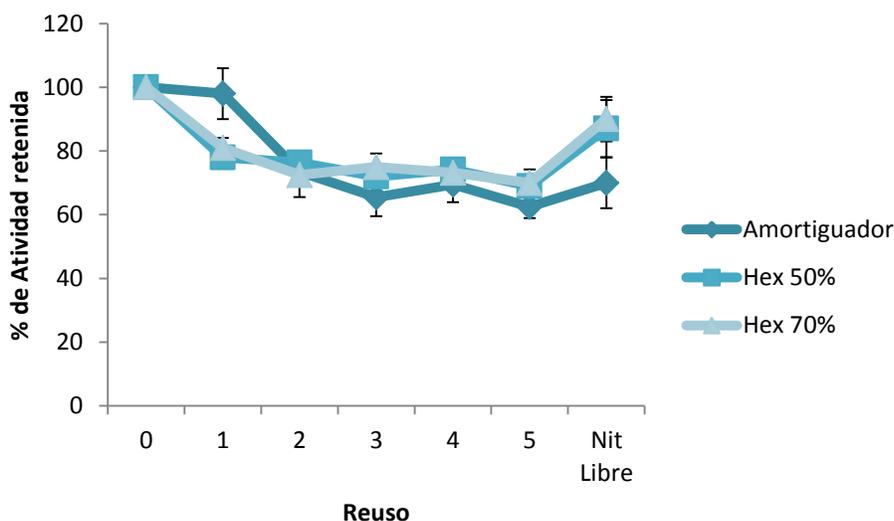


Figura 38. Reusabilidad de la NitT328 encapsulada en mezclas binarias hexano-amortiguador de fosfatos. El último punto muestra la actividad de la NitT328 liberada del p-NIPAM después del 5º reuso. Actividad a 35 °C con 1mM de benzonitrilo por 45 min deteniendo con 0.1 mL de HCl 2N.

Para determinar la cantidad de NitT328 perdida después de cada reuso se determinó la cantidad de enzima residual en los encapsulados después de su utilización en la primera reacción, y después de 5 reusos consecutivos en amortiguador de fosfatos o hexano al 50% v/v (Tabla 4). En amortiguador de fosfatos después de la primera actividad se retiene 59% NitT328. En hexano 50% se retiene el 69% de la NitT328 encapsulada. Estos datos de pérdida de nitrilasa se ven también reflejado en la pérdida de la actividad casi en la misma proporción de la figura 38. Después de 5 reusos se determinó que se retiene el 46.6% de la proteína inicial cuando los reusos se llevan a cabo en amortiguador de fosfatos y se retiene el 50.4% cuando se llevan a cabo en hexano al 50% (Tabla 4).

En las mezclas binarias se pierde menos enzima, esto se debe probablemente a que la nitrilasa se concentra en la fase acuosa y en los reusos con amortiguador de fosfatos sin hexano la enzima se dispersa más y se pierde más entre cada reacción. Esto también se ve reflejado en la actividad de la NitT328 libre de la figura 38 después del 5º reuso.

Tabla 4. Cantidad de enzima liberada después de su actividad en amortiguador y Hexano 50%.

Encapsulado	Amortiguador de fosfatos		Proteína Retenida (%)	Hexano 50%		Proteína Retenida (%)
	Proteína (µg)	DE (+/-µg)		Proteína (µg)	DE (+/-µg)	
Nuevo	10.3	0.8	-	10.3	0.8	-
1 Reúso	6.1	0.5	59.2 %	7.2	0.7	69.9 %
2 Reúso	5.9	0.6	57.2 %	6.6	0.4	64 %
5 Reúso	4.8	0.1	46.6 %	5.2	0.3	50.4 %

e) Tiempo de almacenamiento

Los encapsulados de nitrilasas se prepararon con 5 mg de p-NIPAM cada uno en tubos ephendorf separados, y posteriormente se liofilizaron. No se observaron diferencias en cuanto a pérdida de la actividad después del resguardo en seco al menos durante 3 meses de almacenamiento (Fig. 39).

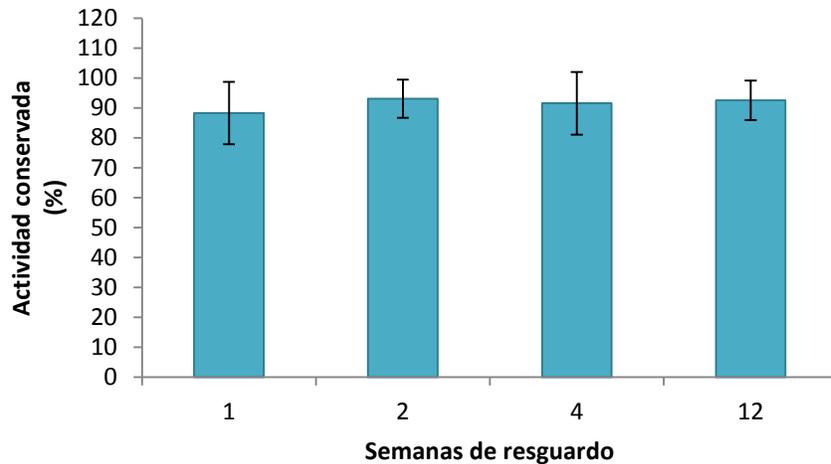


Figura 39. Actividad retenida por la NitT328 encapsulada en resguardo. Actividad a 35 °C con 1mM de benzonitrilo por 1 h deteniendo con 0.1 mL de HCl 2N.

f) Termoactividad

Se llevaron a cabo pruebas de actividad a diferentes temperaturas para determinar si el encapsulamiento estabiliza la enzima a altas temperaturas. En la figura 39 se observa que a 40 °C y 50 °C la enzima mantiene su actividad durante una actividad y un reuso, posteriormente pierde hasta el 50% de actividad. A 60 °C la actividad se pierde después del primer reuso y posteriormente se pierde hasta el 25%. Y a 70 °C casi no hay actividad enzimática, es decir la NitT328 encapsulada se inactiva a esta temperatura (Fig. 40).

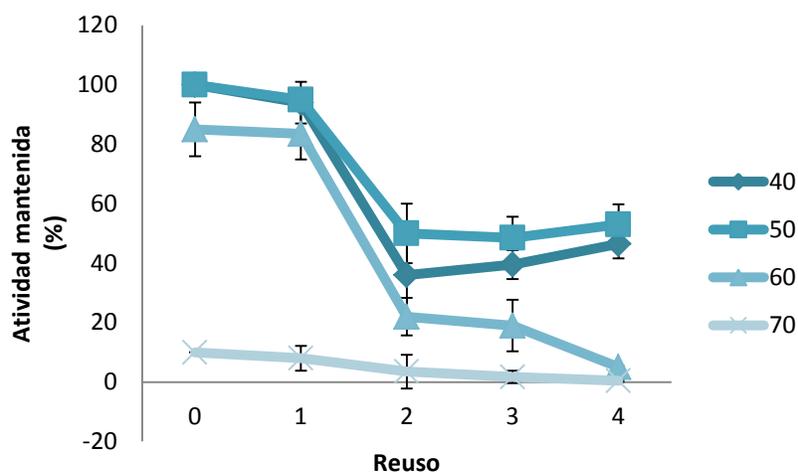


Figura 40. Efecto de la temperatura en la actividad de la nitrilasa encapsulada y con reúsos. Actividad con 1mM de benzonitrilo por 20 min deteniendo con 0.1 mL de HCl 2N.

8. DISCUSIÓN

Las nitrilasas son enzimas que forman parte del metabolismo del nitrógeno y participan en la degradación de nitrilos de diversas fuentes naturales con la liberación del correspondiente ácido carboxílico, amonio y ocasionalmente un producto amida. La utilización de nitrilasas para la formación de productos provenientes de la hidrólisis de nitrilos es una opción viable para la aplicación industrial debido a su potencial utilización a gran escala y a las ventajas operacionales que tiene el uso de catalizadores biológicos.

Un impedimento para la aplicación de catalizadores biológicos en la degradación de nitrilos es que muchos de estos sustratos son insolubles en agua o presentan baja solubilidad, por otro lado los solventes orgánicos en donde los nitrilos son más solubles inactivan a las enzimas. La utilización de hidrogeles de p-NIPAM para el encapsulamiento de nitrilasas mantendría a la enzima confinada en un medio acuoso al llevar a cabo la hidrólisis de nitrilos en un medio orgánico. Es por esto que la inmovilización realizada en la presente tesis ayuda a la estandarización de la catálisis enzimática en medios orgánicos.

La enzima que se utilizó en este trabajo fue la NitT328 la cual es una mutante realizada a partir de la enzima silvestre de la cepa *Rhodococcus sp.* V51B (Leyva, 2009). Esta enzima truncada es más estable en solventes orgánicos que la enzima silvestre e igualmente se inactiva a determinada concentración, por ejemplo en isopropanol a concentraciones por encima de 20%. A pesar de esto, esta enzima truncada resulta ser una buena opción para ser inmovilizada debido a su alta estabilidad y eficiencia catalítica. La purificación de la NitT328 por cromatografía de exclusión molecular es eficaz ya que los filamentos formados por la enzima se separan con facilidad de las impurezas del sistema de purificación (Fig. 23).

En el presente trabajo, la síntesis de microgeles de p-NIPAM se llevó a cabo a través de la polimerización de cadenas lineales de N-isopropilacrilamida (NIPAM) con el entrecruzante N,N'-Metilen-bis acrilamida (MBA) en una polimerización radicalaria durante una rampa de temperatura desde los 45 a 65 °C. Se ha reportado que la rampa de temperatura ayuda a que se forme una red tridimensional interna ordenada dentro de las microesferas de p-NIPAM (Gawlitza, *et al.*, 2012). Durante la polimerización se observa el cambio de turbidez de la solución de transparente a blanco. La formación de los microgeles se puede observar a partir de los 33 °C al ocurrir este cambio de coloración. Al término de la polimerización y al enfriarse la solución de p-NIPAM por debajo de la LCST se vuelve transparente (Fig. 25).

Respecto de la transición de fase del p-NIPAM se ha estudiado este hidrogel desde diversos puntos de vista físicos como son: el aumento parcial de la hidrofobicidad del p-NIPAM por encima de la LCST (Pelton, 2010); el colapso de las microesferas y disminución de su tamaño (Shimizu, *et al.*, 2009); la disminución de la capacidad volumétrica de la microesfera (Hirotsu y Hirotsu 2002); la inducción del cambio de fase en solventes orgánicos y el efecto de consolevencia (Richter, *et al.*, 2014); el cambio en el índice de refracción (Garner, *et al.*, 2009), el cual está muy cerca al índice de refracción del agua cuando se encuentra por debajo de la LCST y cambia después de esta temperatura ya que se modifica la solubilidad de las microesferas en estado coloidal; cambio en la fluidez haciéndose más viscoso (Lynch, *et al.*, 2009) y también la velocidad de reversibilidad a su estado previo a la transición (Xia, *et al.*, 2013).

En la síntesis de microgeles de p-NIPAM, dependiendo del tipo de comonomero o grupos funcionales adicionados, el cambio en el tamaño de la partícula puede ser inducido (Xia, *et al.*, 2013). Se llevó a cabo la síntesis de los hidrogeles de p-NIPAM en cuatro lotes con diferentes proporciones de NIPAM y el entrecruzante MBA (Tabla 1), esto se realizó para determinar con cual proporción se obtienen microesferas suficientemente grandes y con tamaño de poro adecuado para encapsular los filamentos de la nitrilasa. Se observó una dependencia en cuanto a la cantidad de entrecruzante: entre menos entrecruzante contenga la solución, más grandes son las esferas y si se aumenta la cantidad de MBA, las esferas resultantes son de menor tamaño (Tabla 2). A 20 °C la población de tamaños de microesferas de p-NIPAM, según lo indica el índice de polidispersidad, es heterogénea. A elevar la temperatura por encima de la LCST la heterogeneidad del tamaño de microesferas en la muestra es menos (Fig. 24).

La propiedad más importante de los hidrogeles es el grado de turgencia que estos presentan ya que las otras propiedades están directamente influenciadas por ésta (Escobar *et al.* 2003). El tamaño de las microesferas conveniente para la encapsulación resultó del lote 4 con un diámetro hidrodinámico de 1,300 nm. Se observó que estas microesferas mantienen su tamaño máximo a temperatura ambiente y este se conserva al disminuir la temperatura. Al elevar la temperatura por encima de los 33 °C las microesferas reducen su diámetro hasta 1/3 del original, elevando más la temperatura las microesferas no reducen más su diámetro hidrodinámico (Fig. 26).

El objetivo principal de la presente tesis es el desarrollo de un método de inmovilización de la NitT328 por encapsulamiento en hidrogeles de p-NIPAM. Para resolver este objetivo se partió de métodos de encapsulamiento antes descritos para la Lipasa B (Gawlitza *et al.* 2012) y para la inmovilización de ácidos nucleicos (Smith, 2012),

sin embargo se presentaron algunas dificultades al aplicar estos métodos debido a las diferencias inherentes de cada molécula por lo que fue necesario llevar a cabo diversos ensayos de encapsulamiento.

En un primer intento en la estandarización del método se mezclaron diferentes proporciones de p-NIPAM con la NitT328 disuelta en 1 mL de solución y después se elevó la temperatura por encima de la LCST para inducir el colapso de las microesferas y así “atrapar” a la enzima soluble, posteriormente se realizaron lavados con isopropanol para confinar la proteína por recambio de solvente (Gawlitza *et al.* 2012). En este método la cantidad de enzima encapsulada fue muy pequeña, y el sobrenadante presentó toda la actividad (datos no mostrados).

Debido a esto se procedió a cambiar el método para el encapsulamiento: En vez de mezclar la NitT328 con las microesferas de p-NIPAM en 1 mL de amortiguador, se procedió a rehidratar directamente 5 mg de p-NIPAM liofilizado con 200 μ L de la NitT328 en solución, este método se le denomina “Breath taking” (Smith, 2012) porque al hincharse las microesferas de p-NIPAM con el amortiguador, los filamentos de la NitT328 ingresan junto con el agua. Esta mezcla se incubó en agitación durante 12 horas a 4 °C ya que las microesferas de p-NIPAM son más fáciles de dispersar en frío por debajo de la LCST. Posteriormente la mezcla NitT328/p-NIPAM se incubó por encima de la LCST hasta 40 °C, donde las microesferas colapsan, se induce el cambio de fase del hidrogel y se evita la salida de la enzima de la microesfera de p-NIPAM (Fig. 28).

El encapsulamiento por recambio de solvente consiste en colocar a las microesferas con enzima dentro, en un medio orgánico donde la enzima sea menos soluble y por lo tanto favorecer el reparto de la proteína hacia el interior de la microesfera la cual contiene agua en su interior. Para estandarizar el recambio de solvente se realizaron diferentes ensayos con etanol, metanol, isopropanol y tetrahidrofurano a diferentes concentraciones. El principal problema presentado fue la tendencia de la nitrilasa a inactivarse en estos solventes orgánicos a concentraciones por encima del 20% (datos no mostrados). En el estudio de Gawlitza, 2012 se encapsula una lipasa B, es probable que esta enzima sea menos propicia a inactivarse en presencia de solventes orgánicos de poca polaridad. En cambio los filamentos de la NitT328, probablemente se inactivaron debido a que las moléculas de solvente orgánico con baja polaridad interfieren en la estabilidad de los filamentos catalíticos ya que estos filamentos se estabilizan por interacciones hidrofóbicas.

La caracterización por DLS del diámetro hidrodinámico de las microesferas de p-NIPAM en solventes orgánicos mostro que las microesferas se expanden cuando se encuentran en solventes con concentraciones superiores a 70% (Fig. 27), recuperando su diámetro anterior al cambio de fase provocado por temperatura. Se infiere que cuando se realizó el recambio de solvente a esta concentración, al expandirse la microesfera de p-NIPAM el solvente ingresó a la microesfera inactivando a la nitrilasa encapsulada, además se pudieron haber difundido los filamentos de NitT328 hacia el exterior de la microesfera. El hecho de que las microesferas de p-NIPAM recuperaron su diámetro previo al cambio de fase en mezclas de solventes orgánicos por encima del 50% se explica por el cambio de la LCST de las microesferas de p-NIPAM en función a la concentración de solvente orgánico en el medio (Fig. 41), es decir, en estas concentraciones de solvente las microesferas de p-NIPAM se mantienen turgentes a pesar del aumento en la temperatura (Schild, *et al.*, 1991).

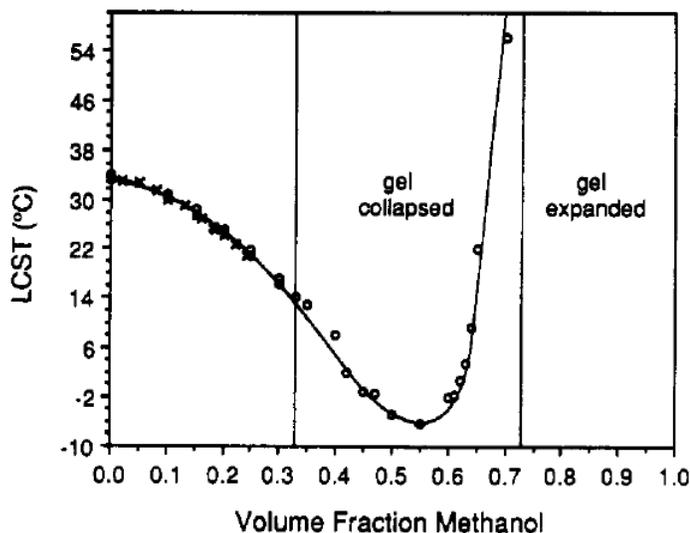


Figura 41. Cambio de la LCST con respecto a la concentración de metanol en el medio. A concentraciones de solvente por encima del 70% la LCST del p-NIPAM aumenta indefinidamente por lo que las microesferas de p-NIPAM se mantienen expandidas a pesar del cambio de temperatura. Tomada de Schild, *et al.*, 1991.

En la evaluación del diámetro hidrodinámico de los hidrogeles en diferentes concentraciones de solventes orgánicos se observó el fenómeno de consolevencia en isopropanol, tetrahidrofurano, etanol y metanol (Fig. 27). Se determinó que el solvente que permite mantener a las microesferas colapsadas a temperatura ambiente y al mismo tiempo no inactivar a la NitT328 fue el Isopropanol al 20%, por lo que después de

centrifugar los encapsulados para retirar la enzima no confinada, se hizo un recambio de solvente con isopropanol al 20% y se repitió este proceso de centrifugado. Finalmente se liofilizo la enzima para su resguardo en seco, se infiere que las microesferas de p-NIPAM conservaron su estado colapsado al ser liofilizadas ya que la deshidratación se realizó en isopropanol al 20% (Fig. 28).

La microscopía confocal se llevó a cabo con el objetivo de corroborar si es que la enzima se encuentra dentro de las esferas de p-NIPAM. Se realizó en dos muestras, una en amortiguador de fosfatos y la otra después del recambio de solvente con isopropanol. En la muestra en amortiguador no se observa la fluorescencia de la enzima marcada dentro de la microesfera de p-NIPAM (Fig. 29). Una explicación es que debido a que la microscopía confocal se realiza en un cuarto frío, las esferas recuperan su tamaño turgente y por lo tanto las moléculas de nitrilasas difundieron hacia afuera de las microesferas al secarse la muestra. En la segunda muestra a la que se le llevo a cabo un recambio de solvente al encapsulado (Fig. 30), se observa en la sobreposición de imágenes y en la reconstrucción de la microscopía confocal que la fluorescencia de la enzima se encuentra dentro de la microesfera de p-NIPAM. De esta imagen se deduce que la enzima se difunde hacia el interior de la microesfera durante el recambio de solvente. Debido a la naturaleza hidrofílica de los filamentos de la NitT328, estos se ubican hacia la región acuosa dentro de las microesferas cuando el encapsulado se encuentra en un medio orgánico. De este modo se justifica el recambio de solvente.

El modo de determinar cuanta enzima se tenía encapsulada fue liberar la NitT328 del complejo encapsulado NitT328/p-NIPAM liofilizado en amortiguador de fosfatos en frío, de modo que las microesferas estén en su tamaño turgente y permitan la libre difusión de la enzima hacia afuera, posteriormente se determinó con el reactivo de Bradford la cantidad de enzima. En promedio se encapsularon $10.32 \mu\text{g} \pm 0.8 \mu\text{g}$ de NitT328 en los 5 mg de p-NIPAM. Se encapsula solo el 6.6% de la enzima de los 150 μg añadidos en 100 μL de NitT328 a 1.5 mg/mL, sin embargo no se pierde la enzima restante pues se puede utilizar para encapsular en otro momento ya que la interacción con el p-NIPAM no es covalente sino un atrapamiento físico.

En el artículo de Saunders 2004 se estima por medio de DLS y SANS (Small-Angle Neutron Scattering), la masa molar de partículas de p-NIPAM con tamaño similar al obtenido en la presente tesis 6×10^9 g/mol (Saunders, 2004). Utilizando esta cantidad y la masa molar de la nitrilasa (36,215.97 g/mol), se estimó un aproximado de 331 monómeros de nitrilasa por cada microesfera, estos monómeros entonces se espera que

se encuentren ordenados en filamentos dentro de la microesfera y son los responsables de la actividad enzimática de los complejos inmovilizados.

En el presente estudio no se realizaron mediciones acerca del tamaño del poro de la microesfera de p-NIPAM, sin embargo se infiere que se obtuvieron microesferas de p-NIPAM con tamaño similar al utilizado en Gawlitzia, 2012 ya que se utilizaron las mismas proporciones de entrecruzante. En el mismo artículo se encapsularon 5,400 moléculas de lipasa B. Es probable que la poca cantidad de moléculas encapsuladas en el presente estudio se deba a que los filamentos de NitT328 no pudieron difundir a través del poro de las microesferas de p-NIPAM puesto que aparentemente fueron más chicos que el promedio de los filamentos de NitT328. Las dimensiones de la lipasa B son 3 nm x 4 nm x 5 nm (Gawlitzia, *et al.*, 2012), en cambio las dimensiones promedio de los filamentos de NitT328 son 11.4 nm de diámetro y largo 60.2 nm, los monómeros libres serían más pequeños pero la forma activa son los filamentos. En un estudio donde se obtuvieron microesferas de p-NIPAM de 700 nm (Kuang *et al.*, 2005) el tamaño del poro fue de 12 nm y no encapsularon nanopartículas de metal 20 nm de tamaño. Para microesferas con la proporción de entrecruzante utilizado, se estima que el tamaño del poro se encuentra entre 20 y 40 nm. En el presente trabajo probablemente se encapsularon únicamente filamentos cortos y los de mayor tamaño no difundieron a la microesfera de p-NIPAM, estos filamentos cortos son lo que presentaron la actividad caracterizada. En el artículo de Saunders y Vincent, 1996, el tamaño mínimo del poro es de 2 nm para microesferas de p-NIPAM con proporción de entrecruzante de 4.5%, similar a las microesferas utilizadas en el lote 4 (5% MBA Tabla 1), por lo que se infiere que el tamaño mínimo sería similar y las microesferas colapsadas no permitirían a la NitT328 efectivamente encapsulada difundir al exterior después del cambio de fase.

Se evaluó la modificación de la actividad de la NitT328 encapsulada con respecto a la de la enzima libre. La enzima libre tiene una actividad específica de 5,100 μmol de NH_4^+ /min x mg Nit. La inmovilización de las enzimas enlentece la catálisis enzimática ya que se dificulta el acceso al sitio activo por parte del sustrato y algunos sitios activos se ocultan del medio de reacción, en este caso se calculó la velocidad específica de los encapsulados tomando en cuenta los 10.3 μg de enzima confinada y se determinó que se conserva solo el 30.3% de la velocidad ya que se obtiene una actividad de 1,550 μmol de NH_4^+ /min x mg Nit de la NitT328 encapsulada. Esta actividad es con respecto al sustrato benzonitrilo. El complejo inmovilizado toma 60 minutos en terminar el de convertir 1 mM del sustrato a ácido benzoico (Tabla 3, Fig. 32).

Para determinar si los microgeles de p-NIPAM tienen la capacidad de evitar el efecto inactivador de los solventes orgánicos, se llevaron a cabo pruebas de actividad en isopropanol y en acetona. En la figura 33 se observa que la NitT328 encapsulada conserva el 30% de su actividad en isopropanol al 100% y que es posible reutilizar una vez. En acetona al 20% se conserva más de 30% de actividad y en acetona al 50% se conserva el 10% de la actividad (Fig. 34). Entonces las microesferas de p-NIPAM reducen la inhibición por solvente.

Cada vez que se llevó a cabo un ensayo de actividad fue necesario dispersar completamente las microesferas de p-NIPAM, este proceso es bastante tardado ya que tomaba aproximadamente 30 minutos la completa dispersión para tener las microesferas de p-NIPAM en estado coloidal. Tomó aún más tiempo dispersar las microesferas cuando se llevaron a cabo los recambios de solvente con isopropanol al 20% y cuando se llevaron a cabo las actividades en solventes orgánicos, es probable que este manejo de los encapsulados haya contribuido a la pérdida de enzima en cada ensayo, así como a la pérdida de actividad en los solventes orgánicos.

Se realizaron pruebas de actividad en mezclas de hexano ya que la solubilidad del benzonitrilo en agua es baja: 4.85×10^{-3} mol/100 ml a 22 °C y tiene un coeficiente de reparto de 1.56, es decir, es de carácter más hidrofóbico. En las pruebas de actividad realizadas en el solvente orgánico hexano al 100% la actividad de la enzima inmovilizada fue muy poca, incluso se obtuvo mayor cantidad de producto en los ensayos realizados en hexano 100% con la enzima libre (Fig. 35). Esto podría explicarse por la limitante de agua, la enzima libre no se agrega en seco sino en 10 µL de solución, es decir, la mezcla no se encuentra al 100% y la nitrilasa encapsulada solo contaba con el agua confinada dentro de la microesfera después de la hidratación, probablemente debido a esto la nitrilasa libre resultó ser más activa en hexano. Cabe resaltar el hecho de que los filamentos de nitrilasa libre presentan actividad en esta reacción ya que el hexano, a diferencia del isopropanol u otros alcoholes en los cuales la enzima es parcialmente soluble, no inactiva a la enzima la cual se mantiene del lado acuoso de la mezcla formada. Así, aunque en los encapsulados en hidrogeles de p-NIPAM no se elevó la eficiencia catalítica en comparación con la enzima libre en hexano, se tiene la ventaja de que los encapsulados permiten los reusos de la nitrilasa.

En cuanto a las mezclas realizadas a 50%, 70%, y 90% de amortiguador/hexano, se observa una tendencia a disminuir la eficiencia catalítica al aumentar la cantidad de hexano, esto podría explicarse por la limitante del agua necesaria para la reacción además

de que los microgeles de p-NIPAM, al estar en una mezcla, tienen preferencia a la parte acuosa y el reparto de benzonitrilo se va hacia el hexano (Fig. 36 y 37).

El encapsulamiento en hidrogeles de p-NIPAM de la nitrilasa presenta la ventaja de que es fácil separar los complejos inmovilizados de la reacción solo centrifugando para recuperar el producto y posteriormente reutilizar los complejos inmovilizados Nit/p-NIPAM. En la figura 38 se observa que a partir del primer reuso hay pérdida de la actividad enzimática, pero se conserva el 70% en mezclas de hexano al 50% y 70% durante 5 reusos. En el caso de las reacciones llevadas a cabo en amortiguador la actividad se conserva casi 100% al primer reuso y de ahí hay pérdida de actividad hasta el 60% durante 5 reusos. Se determinó la cantidad de enzima después de un uso, después de un reuso y después de 5 reusos y se concluyó que la pérdida de actividad está relacionada con la pérdida de enzima en los hidrogeles de p-NIPAM (Tabla 4). Se observa que en los reusos con mezclas binarias se mantiene mayor cantidad de nitrilasa que en las reacciones en amortiguador de fosfatos donde hay más pérdida de enzima, esto podría deberse a la mayor afinidad de la nitrilasa al agua, en las mezclas binarias hay menor cantidad de agua por lo que la enzima se mantiene más concentrada en la fase acuosa.

Los encapsulados con p-NIPAM presentan la ventaja de poder almacenar en seco a las enzimas (Haydn, 2015). Los encapsulados se prepararon con el método descrito y posterior a los lavados con amortiguador e isopropanol fueron liofilizados para su resguardo. Previo a ensayar la actividad los encapsulados se hidratan con amortiguador precalentado a 35 °C. Se observó que al menos después de 3 meses de resguardo, la actividad de la nitrilasa no se ve comprometida por su preservación en seco en microesferas de p-NIPAM (Fig. 39).

Se determinó que no hay cambio en la termoestabilidad de la NitT328 encapsulada, ya que conserva su actividad en 40 °C y 50 °C al igual que la enzima libre, a 60 °C hay pérdida de actividad y a 70 °C no hay actividad catalítica (Fig. 40).

9. CONCLUSIONES

1. Se desarrolló un método de encapsulamiento de la NitT328 por cambio de temperatura y recambio de solvente con Isopropanol en el que se encapsularon aproximadamente 331 monómeros de NitT328 por microesfera de p-NIPAM. Probablemente solo se encapsularon los filamentos cortos y los largos no pudieron pasar a través de los poros de las microesferas de p-NIPAM.
2. Según se pudo verificar por microscopia confocal, los filamentos de NitT328 difunden hacia adentro de las microesferas de p-NIPAM cuando se lleva a cabo el recambio de solvente con isopropanol debido a su reparto favorable hacia la fase acuosa dentro de la microesfera.
3. La inmovilización de los filamentos de la NitT328 en hidrogeles de p-NIPAM reduce la eficiencia catalítica probablemente debido a la restricción del contacto de la enzima con el sustrato o a la modificación de la actividad debido a la interacción electrostática de las cadenas de p-NIPAM con los filamentos de la NitT328.
4. El encapsulamiento dentro de las microesferas de p-NIPAM reduce el efecto inactivador del isopropanol y de la acetona de los filamentos de la NitT328.
5. El encapsulamiento en microesferas de p-NIPAM permite el guardado en seco de la NitT328 durante tres meses manteniendo la actividad de la NitT328 encapsulada.
6. El encapsulamiento en p-NIPAM permite la reusabilidad de la enzima manteniendo del 60% al 70% de la actividad tanto en amortiguador de fosfatos y en mezclas binarias. La pérdida de la actividad en los reusos se relaciona con la pérdida de enzima encapsulada.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Afkhami, A., Novooz-Asi, R. (2008) "Micelle-mediated extraction and spectrophotometric determination of ammonia in water samples utilizing indophenol dye formation", *J Braz Chem Soc*, 19(8), pp. 1546-52.
2. Arroyo, M. (1998) "Immobilized enzymes: Theory, methods of study and applications", *Ars Pharmaceutica*, 39(2), pp. 23-39.
3. Banerjee, A. y Sharma, B. U. (2002) "The nitrile-degrading enzymes: current status and future prospects", *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 60, pp. 30-44.
4. Bartling, D., Seedorf, M., Schimdt, R. C. y Weiler, E. W. (1994) "Molecular characterization of two cloned nitrilasas from *Arabidopsis thaliana*: key enzymes in biosynthesis of plant hormone indole-3-acetic acid", *Proc Nat Acad Sci*, 91, pp. 6021-6025.
5. Bestwick, L. A., Groning, L. M., James, D. C., Bones, A. y Rossiter, J. T. (1993) "Purification and characterization of a nitrilase from *Brassica napus*", *Physiol Plant*, 89, pp. 811-816.
6. Burmistrova, A. y Naturwissenschaften, D. Der (2011) "Temperature-induced swelling / shrinking behavior of adsorbed PNIPAM microgels." *Mathematik und Naturwissenschaften der Technischen Universität Berlin zur Erlangung des akademischen Grades. Berlin.*
7. Cáliz R., A. E. (2015), "Caracterización cinética y estructural de la nitrilasa de *Rhodococcus pyridinovorans* T", Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias, Tesis de Licenciatura.
8. Conley, G. M., Nöjd, S., Braibanti, M., Schurtenberger, P. y Scheffold, F. (2016) "Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects Superresolution microscopy of the volume phase transition of pNIPAM microgels," *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 499, pp. 18-23.
9. Datta, S. y Christena, L. R. (2013) "Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials," *Biotech* pp. 1-9.

10. Fonseca, L. and Meesters, G. (2013) "Enzyme encapsulation," *Bioencapsulation Innovations*, pp. 1–24.
11. Garner, B. W., Cai, T., Hu, Z., Tae, P., Zhao, C., Fernandes, G. E., Barden, S. C., Arns, J. A. y Colburn, W. S. (2009) "Refractive Index Change Due to Volume-Phase Transition in Polyacrylamide Gel Nanospheres for Optoelectronics and Bio-photonics," *Applied Physics Express*, 2, pp. 1–3.
12. Gawlitza, B. K., Wu, C. y Georgieva, R. (2012) "Temperature Controlled Activity of Lipase B from *Candida Antarctica* after Immobilization within p-NIPAM Microgel Particles," *Z. Phys. Chem.* 226, pp. 749–759.
13. Gawlitza, K., Changzhu, W., Radostina, G., Dayang, W., Marion B., A.-S. y Regine, von K. (2012) "Immobilization of lipase B within micron-sized poly- N - isopropylacrylamide hydrogel particles by solvent exchange w," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 14, pp. 9594–9600.
14. Gawlitza, K., Georgieva, R., Tavraz, N., Keller, J. and Klitzing, R. Von (2013) "Immobilization of Water-Soluble HRP within Poly - N - isopropylacrylamide Microgel Particles for Use in Organic Media." *Langmuir*, 29, 16002–16009
15. Gómez A., A. (2016) "Estructuración y activación de la nitrilasa de *Rhodococcus sp.* v51b inducidas por modificaciones en el extremo C-terminal". Tesis de maestría. Posgrado en ciencias bioquímicas. Universidad Nacional Autónoma de México.
16. Gong, J., Lu, Z., Li, H., Shi, J., Zhou, Z. y Xu, Z. (2012) "Nitrilases in nitrile biocatalysis: recent progress and forthcoming research," *Microbial Cell Factories*. *Microbial Cell Factories*, 11(1), p. 1.
17. Heinemann, U., Engels, D., Burger, S., Kiziak, C., Mattes, R. y A., S. (2003) "Cloning of a nitrilase gene from the cyanobacterium *Synechocystis sp.* strain PCC6803 and heterologous expression and characterization of the encoded protein.," *Appl Environ Microbiol*, 69, pp. 4359–4366.
18. Hirotsu, S. y Hirotsu, S. (2002) "Critical points of the volume phase transition in N - isopropylacrylamide gels Critical pOints of the volume phase transition in N - isopropylacrylamide gels," *J. Chem. Phys.*, 427(1988).

19. Karg, M. y Hellweg, T. (2009) "Current Opinion in Colloid & Interface Science New ' smart ' poly (NIPAM) microgels and nanoparticle microgel hybrids : Properties and advances in characterisation," *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 14(6), pp. 438–450.
20. Kato, Y., Ooi, R. y Asano, Y. (2000) "Distribution of Aldoxime Dehydratase in Microorganisms," *American Society for Microbiology*. 66(6), pp. 2290–2296.
21. Layh, N., Parratt, J. y Willetts, A. (1998) "Characterization and partial purification of an enantioselective arylacetonitrilase from *Pseudomonas fluorescens* DSM 7155," *J Mol Catal B: Enzym*, 5, pp. 467–474.
22. Leyva Hernández Eduardo. (2009). "Clonación y expresión del gen NitA de *Rhodococcus pyridinovorans*". Tesis de maestría. Posgrado en ciencias bioquímicas. UNAM
23. Lopez-Leon, T., Ortega-Vinuesa, J. L., Bastos-Gonzalez, D. y Elai1ssari, A. (2006) "Cationic and Anionic Poly (N -isopropylacrylamide) Based Submicron Gel Particles : Electrokinetic Properties and Colloidal Stability," *Phys. Chem*, (110), pp. 4629–4636.
24. Lynch, I., Sche, F. y Reufer, M. (2009) "microgel particles : A light scattering study particles : A light scattering study," *Eur. Phys. J. E* 28,171, pp. 165–171.
25. Lyon, L. A., Meng, Z., Singh, N., Sorrell, C. D. y John, A. S. (2009) "Thermoresponsive Microgel-Based Materials," *Chemical Society Reviews*, 38, pp. 865–874.
26. Nagasawa, T., Wieser, M., Nakamura, T., Iwahara, H., Yoshida, T. y Gekko, K. (2000) "Nitrilase of *Rhodococcus rhodochrous* J1. Conversion into the active form by subunit association.," *Eur. J. Biochem.*, (267), pp. 138–144.
27. Pace, H. C. y Brenner, C. (2001) "The nitrilase superfamily : classification , structure and function,"pp. 1–9.
28. Pelton, R. (2010) "Journal of Colloid and Interface Science Poly (N -isopropylacrylamide) (PNIPAM) is never hydrophobic," *Journal of Colloid And Interface Science. Elsevier Inc.*, 348(2), pp. 673–674.

29. Podar, M., Eads, J. R. y Richardson, T. H. (2005) "Evolution of a microbial nitrilase gene family : a comparative and environmental genomics study" *Evolutionary Biology* 2005,, 13, pp. 1–13.
30. Ramteke, P., Navodita, M., Badu, J. y Bharat, W. (2013) "Nitrile-converting enzymes : An eco-friendly tool for industrial biocatalysis," *Biotechnology and Applied Biochemistry*, pp. 459–481.
31. Richter, M., Hunnenm, M. y Klitzing, R. V (2014) "The impact of the cononsolvency effect on poly (N -isopropylacrylamide) based microgels at interfaces". *Colloid Polym Sci* (2014)pp. 2439–2452.
32. Saunders, B. R. (2004) "On the Structure of Poly (N -isopropylacrylamide) Microgel Particles," *Langmuir* (7), pp. 3925–3932.
33. Scherzinger, C., Schwarz, A., Bardow, A., Leonhard, K. y Richtering, W. (2014) "Cononsolvency of poly- N -isopropyl acrylamide (PNIPAM): Microgels versus linear chains and macrogels," *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 19(2), pp. 84–94.
34. Schild, H. G., Muthukumar, M. y Tirrell, D. A. (1991) "Cononsolvency in Mixed Aqueous Solutions of," *Macromolecules*, 24(4), pp. 948–952.
35. Shimizu, H., Wada, R. y Okabe, M. (2009) "Preparation and Characterization of Micrometer-Sized Poly (N -isopropylacrylamide) Hydrogel Particles," *The Society of Polymer Science*, 41(9), pp. 771–777.
36. Smith, M. H. (2012) "The design of multifunctional hydrogel nanoparticles for drug delivery". Georgia Institute of Technology. School of Chemistry and Biochemistry Degree.
37. Thuku, R. N., Brady, D., Benedik, M. J. y Sewell, B. T. (2009) "Microbial nitrilases : versatile , spiral forming , industrial enzymes," *Journal of Applied Microbiology*, 106, pp. 703–727.
38. Valderruten, N., Quintana, J. R. y Katime, J. (2001) "Mecanical properties of poly(N-isopropylacrylamide-Co-itaconic acid) Hidrogels," *Revista de metalurgia*, 37(c), pp. 356–360.

39. Vorwerk, S., Biernacki, S., Hillebrand, H., Janzik, I., Mu, A., Weiler, E. W. y Piotrowski, M. (2001) "Enzymatic characterization of the recombinant *Arabidopsis thaliana* nitrilase subfamily encoded by the NIT 2 / NIT 1 / NIT 3-gene cluster," *Planta*, pp. 508–516.
40. Wong, S. S. y Wong, L. J. C. (1992) "Chemical cross-linking for the stabilization of proteins and enzymes," *Enzyme Microb. Technol.*, 14, pp. 866–874.
41. Wu, C., Bai, S., Ansorge-schumacher, M. B. y Wang, D. (2011) "Nanoparticle Cages for Enzyme Catalysis in Organic Media", *Material views*, pp. 5694–5699.
42. Xia, L., Xie, R., Ju, X., Wang, W., Chen, Q. y Chu, L. (2013) "Nano-structured smart hydrogels with rapid response and high elasticity," *Nature Communications*. *Nature Publishing Group*, 4, pp. 1–11.
43. Ying, G. y Zhang, Y. (2011) "PNIPAM microgels for biomedical applications : from dispersed particles to 3D assemblies," *Soft Matter*, (7), pp. 6375–6384.
44. Zhu, X., Gu, X., Zhang, L. y Kong, X. (2012) "Preparation and characterization of nanosized P (NIPAM-MBA) hydrogel particles and adsorption of bovine serum albumin on their surface," *Nanoscale Research Letters*. *Nanoscale Research Letters*, 7(1), p. 1.