



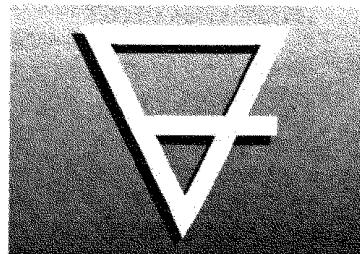
Journal of the Mexican Chemical Society
ISSN: 1870-249X
editor.jmcs@gmail.com
Sociedad Química de México
México

Luna, Héctor; Manjarrez, Norberto; Pérez, Herminia I.; Solís, Aida
Nuevas fuentes potenciales de enzimas oxinitrilasas
Journal of the Mexican Chemical Society, vol. 41, núm. 3, mayo-junio, 1997, pp. 111-114
Sociedad Química de México
Distrito Federal, México

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=47541304>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

Nuevas fuentes potenciales de enzimas oxinitrilasas.



**Héctor Luna,
Norberto Manjarrez,
Herminia I. Pérez,
Aida Solís.**

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, Departamento Sistemas Biológicos, México, D.F. A.P. 23-181

1^a recepción: febrero de 1996
2^a recepción: julio de 1996

Resumen

Con el objeto de buscar nuevas fuentes vegetales de enzimas oxinitrilasas se seleccionaron los frutos del género *Prunus*, ciruela (*P. domestica*), durazno (*P. persica*), chabacano (*P. armeniaca*) y capulín (*P. capuli*). Se demostró la presencia potencial de este tipo de enzimas en estos frutos debido a que su actividad biocatalítica sobre benzaldehído, *p*-anisaldehído y mandelonitrilo fué similar a la conocida biotransformación de la enzima oxinitrilasa aislada de la almendra dulce (*Prunus communis*).

Abstract

In the objective of searching for new sources of plants oxinitrilase enzymes the following fruits of the *Prunus* genera were selected, plum (*P. domestica*), peach (*P. persica*), apricot (*P. armeniaca*) and capulin (*P. capuli*). It was demonstrated the potential occurrence of this kind of enzymes in the aforementioned fruits, because its biocatalytic activity over benzaldehyde, *p*-anisaldehyde and mandelonitrile was similar to the well documented biotransformation using the oxinitrilase isolated from sweet almond (*Prunus communis*).

trabajos de investigación
111

Introducción

En la actualidad la biocatálisis ha cobrado gran importancia en síntesis orgánica, debido a las amplias ventajas que presentan los biocatalizadores (enzimas) sobre los catalizadores químicos.¹ Entre las ventajas que presentan las enzimas se encuentran las siguientes:

- a) facilitan la obtención de compuestos químicos de alta pureza óptica y química, minimizando reacciones laterales y subproductos,²
- b) catalizan reacciones que son difíciles o imposibles de emular usando técnicas de química orgánica clásica,³
- c) son extremadamente versátiles y catalizan un amplio espectro de reacciones, hay un catalizador enzimático equivalente para casi cada tipo de reacción química orgánica,
- d) las reacciones enzimáticas ocurren en condiciones de reacción suaves, frecuentemente a temperatura ambiente y a pH cercano a la neutralidad, esto minimiza problemas de isomerización, racemización, epimerización y transposiciones, los que se presentan frecuentemente en la metodología química tradicional,
- e) las enzimas son catalizadores altamente eficientes, las velocidades de las reacciones promovidas por enzimas pueden ser mas rápidas que aquellas no catalizadas en factores de 10^{12} ,⁴
- f) las enzimas son generalmente muy selectivas en términos del tipo de reacción catalizada, con respecto a la estructura y estereoquímica del sustrato y producto.
- g) la especificidad estructural de las enzimas permite efectuar reacciones regioselectivas difícil de realizar químicamente, especialmente en reacciones de un solo paso.⁴

interesante investigar otras plantas del género prunus, al cual pertenecen las almendras. Dado que la característica principal de estas enzimas es su capacidad de incorporar o desincorporar un grupo ciano en un aldehído, se consideró como elemento central, evaluar esta actividad biocatalítica en relación a la que presenta la almendra dulce, de esta manera se podría inferir que el material bajo investigación es una nueva fuente potencial de enzimas oxinitrilasas, sin necesariamente aislar la misma. Para ello se escogieron los siguientes frutos del género prunus: ciruela (P. domestica), durazno (P. persica), chabacano (P. armeniaca), capulín (P. capuli).

De la literatura encontramos dos trabajos fundamentales para nuestros fines; el de Brussee,¹² quien reportó que se puede emplear la harina desengrasada de la almendra para catalizar la formación del mandelonitrilo a partir de benzaldehído, sin necesidad de purificar la enzima involucrada ya que de esta forma se tiene a la enzima inmovilizada sobre un soporte natural. Y el trabajo de Conn,^{10,13} quien estudió la actividad de las enzimas purificadas provenientes del sorgo y de la almendra, monitoreando la actividad por el aumento en la absorbancia a 249 nm, producida por la formación del benzaldehído a partir de la descomposición del mandelonitrilo, por la acción de la oxinitrilasa correspondiente.

Parte experimental

Descripción de la harina desengrasada de cada semilla: A la semilla de cada fruto se le quitó el endocarpo, posteriormente la cascarrilla, remojandola en agua caliente, luego se molíó y desengrasó 3 veces con acetato de etilo, quedando una harina seca, la cual se empleó sin mayor purificación.

Transformación de benzaldehído a mandelonitrilo por biocatálisis: Se

mezclaron 10 mg de harina desengrasada, 8×10^{-2} mmol de benzaldehído, 0.1 ml de buffer de KCN/AcOH 1N como fuente de HCN, en suficiente solución amortiguadora de citratos pH 5.54 para tener 10 ml; luego se determinó la absorbancia de dicha mezcla, a 249 nm, cada 2 minutos durante 10 minutos, (los resultados se muestran en la Gráfica 1).

Transformación de p-anisaldehído a p-metoximandelonitrilo por biocatálisis: Se siguió el procedimiento anterior, sólo que la absorbancia se determinó a 284 nm, y los valores se determinaron cada 30 minutos, durante 4 horas, (los resultados se muestran en la Gráfica 2).

Transformación de mandelonitrilo a benzaldehído por biocatálisis: Se mezclaron 10 mg de harina desengrasada, 0.139 mmol de mandelonitrilo, en suficiente solución amortiguadora de citratos pH 5.54 para tener 10 ml; luego se determinó la absorbancia a 249 nm, tomando valores cada 2 minutos durante 10 minutos, (los resultados se muestran en la Gráfica 3).

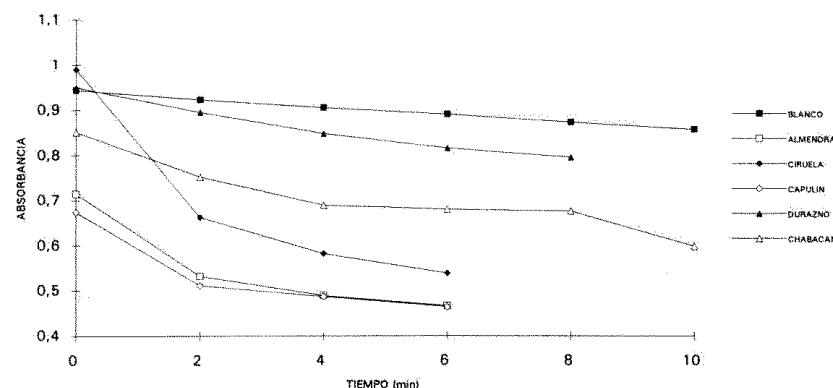
En los tres casos se realizó una prueba blanco, con los mismos reactivos, cantidades y condiciones, pero sin harina desengrasada, para monitorear la reacción química sin catalizador.

Transformación de benzaldehído a mandelonitrilo con enzima desactivada: 10 mg de la harina desengrasada de cada una de las semillas se calentó a ebullición por 15 minutos en 1 ml de agua destilada, después de enfriar se procedió como se indica para la transformación de benzaldehído a mandelonitrilo por biocatálisis, (los resultados se muestran en la Gráfica 4).

Resultados y discusión

Se efectuaron varios experimentos, modificando las condiciones reportadas, 10, 12, 13 para llegar a un procedimiento sencillo, que nos permitiera evaluar la posible actividad biocatalítica de las semillas de los frutos elegidos. Los resultados obtenidos se presentan de forma gráfica con la finalidad de visualizar objetivamente las diferencias entre la actividad biocatalítica que presenta cada semilla con respecto a la referencia (almendra dulce) y al blanco.

En la Gráfica 1 se presenta la incorporación del grupo ciano al benzaldehído, se observa que la semilla del capulín mostró un poder catalítico prácticamente igual al de la almendra dulce, mientras que la del durazno presentó la menor actividad catalítica. Cabe mencionar que la ciruela presentó una mayor velocidad de reacción que las demás en tiempos menores de 2 minutos.



Gráfica 1
Transformación de
Benzaldehído a
mandelonitrilo.

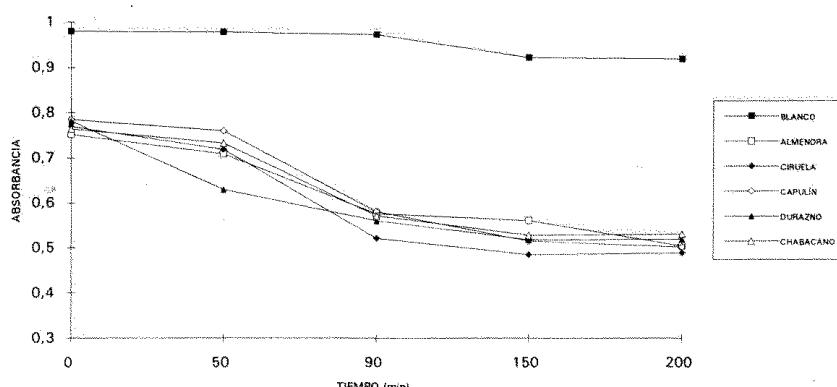
catalítica menor, pero mayor que en la reacción química (prueba blanco).

Considerando que el sustrato natural de la enzima óxinitrilasa presente en la almendra dulce es el benzaldehído,⁵ y con el objetivo de estudiar la gene-

ralidad de esta biotransformación se decidió probar un sustrato diferente al natural, el p-anisaldehído.

Los resultados de este experimento se presentan en la Gráfica 3, de donde se observa que la reacción en todos los casos es mucho más lenta que para el benzaldehído, posiblemente debido al hecho de que el p-anisaldehído no sea el sustrato natural de esta enzima, pero aún así, la reacción es más rápida en presencia de la harina de cada semilla que con la sola reacción química (prueba blanco), siendo similar este efecto para todas las semillas estudiadas.

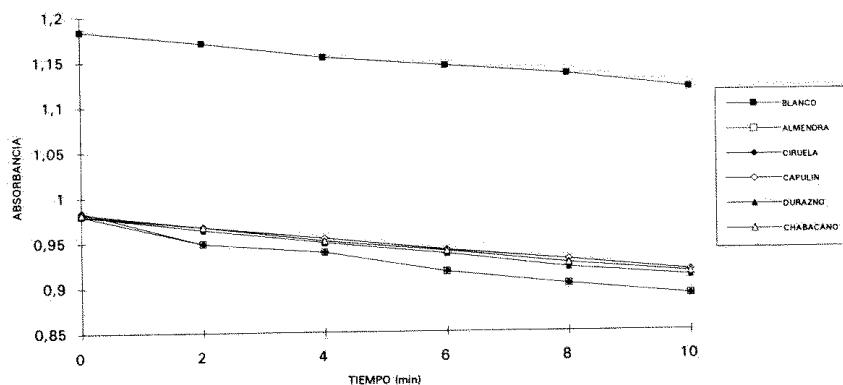
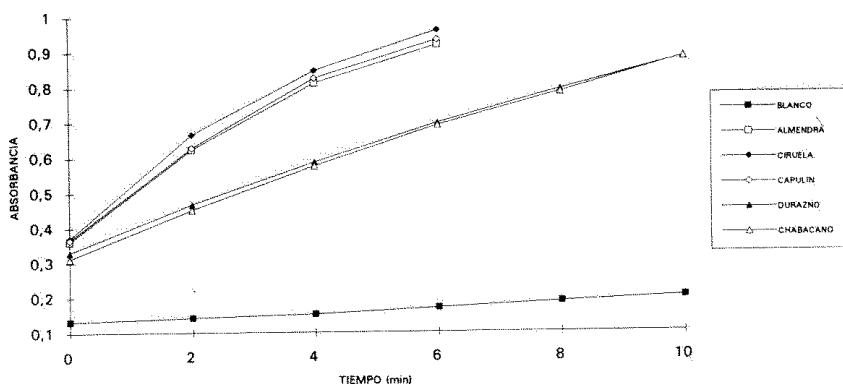
De las gráficas (1, 2, 3) se puede observar que en el caso de la prueba blanco solo se presenta una pequeña pendiente, ya que la formación del producto respectivo es mínima en ausencia del biocatalizador.



Gráfica 2
Transformación de P-
anisaldehído a P-
metoximandelonitrilo.

En la transformación del mandelonitrilo a benzaldehído (desincorporación del grupo ciano), las semillas del capulín y la ciruela presentaron una actividad biocatalítica prácticamente igual a la almendra dulce (Gráfica 2), mientras que las del durazno y chabacano presentaron una actividad bio-

Para comprobar que la actividad catalítica observada se debe a una enzima, se efectuó la biotransformación de benzaldehído a mandelonitrilo utilizando la harina desengrasada de cada una de las semillas, desnaturizada por calentamiento. Se seleccionó esta biotransformación debido a que las



Gráfica 4
Transformación de Benzaldehído a mandelonitrilo con enzima desactivada.

Conclusiones

Todas las semillas estudiadas presentaron actividad catalítica para la biotransformación de: benzaldehído, mandelonitrilo y p-anisaldehído. Las semillas de la ciruela y el capulín resultaron con actividad catalítica similar a la que presenta la almendra dulce. Desafortunadamente, debido a diferencias en las condiciones experimentales y a los parámetros utilizados para valorar la actividad catalítica, no se pudo efectuar una comparación estricta con los resultados descritos en la literatura. Es posible que la actividad catalítica sea debido a una enzima, ya que al calentar se desnaturiza y por lo tanto se inactiva

diferencias entre las pendientes de la reacción química y las biocatalizadas es más evidente (ver Gráfica 1). Los resultados obtenidos se muestran en la Gráfica 4, en la cuál se observa la ausencia del efecto biocatalítico.

desapareciendo la diferencia en velocidad de reacción con respecto al blanco. El método propuesto dió resultados satisfactorios para la evaluación de la actividad catalítica de la harina de las semillas de: almendra dulce, ciruela, capulín, chabacano y durazno. Con esto se demuestra la presencia potencial de enzimas oxinitrilasas en las semillas estudiadas.

Bibliografía

Gráfica 3
Transformación de mandelonitrilo a benzaldehído.

- 1) Coffen D. D, Chiral'93. *Symposium. Estados Unidos*, 6-7 mayo 1993, p 95.
- 2) Stirling D, Chiral'93. *Symposium. Estados Unidos*, 6-7 mayo 1993, p 139.
- 3) Roberts M, Turner N, Willets A, Chiral'93. *Symposium. Estados Unidos*, 6-7 mayo 1993, p 119.
- 4) Jones B, *Tetrahedron*, 42, 3351, (1986).
- 5) North M, *Synlett*, 807, (1993)
- 6) Collins A. N., Sheldrake G. N., Crosby J, *Chirality in Industry*. Editorial John Wiley & Sons, p 278, (1992).
- 7) Krief A, *Pestic. Sci.*, 41, 237 (1994).
- 8) Huuhtanen T, Kanerva L, *Tetrahedron Asymm.*, 3, 1223,(1992)
- 9) Seely M, Criddle R, Conn E, *J. of Biol. Chem.*, 241,4457, (1966)
- 10) Bozé C, Conn E, *J. of Biol. Chem.*, 236, 207,(1961)
- 11) Scharrenburg G., Sloothaak J., Kruse C, *Indian J. Chem.*, 32B, 16, (1993)
- 12) Zandbergen P, van der Linden J, Brussee J, van der gen A, *Synth. Commun.*, 21, 1387, (1991)
- 13) Seely M, Criddle R, Conn E, *J. of Biol. Chem.*, 241,4457, (1966)