

Ensaio enzimático para seleção de nitrila hidratases

Letícia M. L. Angelini (IC), Lucas F. C. Rocco (IC), Talitta C. D. Barbosa (IC), Cintia D. F. Milagre (PQ)*

cmilagre@rc.unesp.br

Departamento de Bioquímica e Microbiologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP – Campus Rio Claro, Av. 24A, 1515, 13506-900, Rio Claro, SP.

Palavras Chave: *triagem enzimática, nitrila hidratase*

Introdução

As nitrila hidratases (NHases, E.C. 4.2.1.84) são enzimas que catalisam a conversão de nitrilas nas correspondentes amidas. Micro-organismos que contêm estas enzimas têm sido utilizados com sucesso em processos biocatalíticos industriais em escala multi-tonelada para a produção de acrilamida (Mitsubishi Rayon), nicotinamida (Lonza) e 5-cianovaleramida (Dupont). No metabolismo microbiano as NHases associam-se em cascata às amidases e podem ou não coexistir com nitrilases (Nases) levando à produção de ácidos carboxílicos (Figura 1).

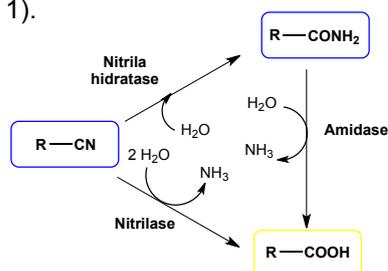


Figura 1. Duas rotas da Natureza para a conversão de nitrilas em ácidos carboxílicos.

O objetivo deste trabalho é realizar a triagem enzimática de NHases em micro-organismos brasileiros que serão posteriormente utilizados para a obtenção de blocos construtores quirais para síntese de compostos industrialmente relevantes.

Resultados e Discussão

Quarenta micro-organismos foram isolados de fontes ricas em glicosídeos cianogênicos como a raiz de mandioca e solo de lagoa de decantação de água de manipueira através de metodologias clássicas de seleção (ágar contendo meio complexo enriquecido com composto nitrilado). Como a maioria das NHases são enzimas indutivas, ou seja, são sintetizadas pelas células apenas na presença de seu substrato, foram avaliados alguns indutores enzimáticos dentre os quais a acetonitrila apresentou o melhor resultado enquanto a mandelonitrila o pior. A etapa seguinte consistiu na adaptação de um ensaio enzimático para nitrilases a

fim de selecionarmos micro-organismos produtores de nitrila hidratases. O ensaio enzimático colorimétrico miniaturizado recém implementado em nosso laboratório é baseado em alterações de pH. Neste ensaio uma suspensão microbiana em tampão fosfato pH 7,2 acrescida da nitrila de interesse e azul de bromotimol como indicador de pH é monitorada visualmente quanto à formação de ácido carboxílico (viragem do azul para amarelo) após a incubação da microplaca (Figura 2). Para que as NHases sejam diferenciadas das Nases adiciona-se à reação um inibidor de amidase, no caso a dietilaminofosforamida.

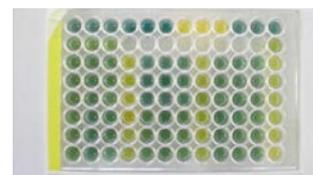


Figura 2. Triagem enzimática de nitrila hidratases em formato miniaturizado.

Este ensaio foi empregado tanto para nitrila alifática (acetonitrila) e aromática (mandelonitrila). Através desta metodologia foi possível selecionar 3 micro-organismos produtores exclusivos de nitrila hidratases, 5 produtores de nitrilases e 10 produtores de ambas as enzimas. Para fins de validação deste ensaio colorimétrico, as reações enzimáticas também foram monitoradas por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama. Análises para verificar a enantiosseletividade das NHases recém triadas estão em andamento.

Conclusões

A adição de inibidores de amidases ao ensaio enzimático para Nases permitiu a discriminação entre Nases e NHases em células microbianas. Os micro-organismos produtores de NHases serão utilizadas para obtenção de amidas de importante valor sintético.

Agradecimentos

Agrademos à FAPESP pelo apoio financeiro.

¹ van Pelt, S; van Rantwijk, F; Sheldon, R. A. *Chemica Oggi-Chemistry Today* 2008, 26, S2-4.