

O25

ESTABILIZACIÓN DE AMINO OXIDASA DE *PISUM SATIVUM* POR INMOVILIZACIÓN DE AGREGADOS ENZIMÁTICOS

P. García-García¹, G. Fernández-Lorente¹, J.M. Guisán²

¹ Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación CIAL (CSIC-UAM). C/Nicolás Cabrera 9, Universidad Autónoma de Madrid, España.

² Instituto de Biotecnología y Petroleoquímica: Calle Marie Curie, 2, Universidad Autónoma de Madrid, España

Palabras clave: enzimas multiméricas, unión covalente multipuntual, polietilenglicol.

Resumen

Las diamino oxidasas (DAO) son enzimas multiméricas encargadas de llevar a cabo la desaminación oxidativa de aminas biógenas presentes en alimentos fermentados como el vino¹. Debido a su potencial uso biotecnológico a escala industrial, es necesario el desarrollo de protocolos de inmovilización que permitan la estabilización de sus subunidades, mejoren sus propiedades y permitan su reutilización. La inmovilización de enzimas por unión covalente multipuntual (UCM) a soportes altamente activados a través de los grupos amino de la enzima es el protocolo de estabilización de enzimas por excelencia. En el caso de enzimas multiméricas, la inmovilización a través del extremo amino terminal es posible siempre y cuando éstos estén en el mismo plano. Esto permite la estabilización de la estructura cuaternaria, evitando así su disociación y posible liberación al medio².

El objetivo principal será estudiar el efecto estabilizante sinérgico que ofrece la UCM en presencia de un agente estabilizante como es el polietilenglicol (PEG). Para ello llevamos a cabo la inmovilización de AO por UCM a soportes glioxil-agarosa, a pH8.5, orientando la enzima dimérica a través de sus dos residuos amino terminales sobre el soporte³. Estudiamos la cinética de inmovilización en ausencia y en presencia de diferentes concentraciones de PEG.

Los resultados obtenidos demuestran la importancia del PEG en la inmovilización de AO. Logramos inmovilizar la AO a través de sus extremos aminos terminales con una cinética de inmovilización muy lenta, lo cual indica que éstos están en el mismo plano pero relativamente separados. Por tanto, desarrollamos una estrategia de estabilización para mejorar la cinética de inmovilización añadiendo PEG, que favorece la agregación bi-molecular de la AO y aumenta la velocidad. Observamos que la agregación óptima se consigue en presencia de 30% PEG, donde la cinética de inmovilización es 754 veces más rápida que en ausencia del mismo. Además, este derivado es 5 veces más estable que el derivado inmovilizado por UCM a través de lisinas.

Agradecimientos: Los autores agradecen la financiación otorgada por la Fundación Ramón Areces en el XVII Concurso Nacional de Ayudas a la Investigación en Ciencias de la Vida y la Materia del año 2014.

Bibliografía:

- [1] O.V. Yagodina, E.B. Nikol'skaya, A.E. Khovanskikh, B.N. Kormilitsyn. (2002) J Evol Biochem Physiol, 38(3), pp. 251–258.
- [2] G. Fernandez-Lorente, F. Lopez-Gallego, J.M. Bolivar, J. Rocha-Martin, S. Moreno-Perez, J.M. Guisan. (2015) Curr Org Chem, 19 (12), pp. 1–13.
- [3] V. Grazu, L. Betancor, T. Montes, F. Lopez-Gallego, J.M. Guisan, R. Fernandez-Lafuente. (2006) Enzyme Microb Technol, 38(7), pp. 960–966.