

FO 261



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

## PRODUCCION Y CARACTERIZACION DE LA ENZIMA FENILALANINA AMONIO - LIASA DE *Rhodospiridium toruloides*

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

T E S I S

SILVIA KAWASAKI WATANABE

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO



## **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 está 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.

# INDICE

	Página
1. INTRODUCCION	9
2. OBJETIVO	15
3. GENERALIDADES	
3.1 Características generales de <i>Rhodosporidium toruloides</i>	16
3.2 Producción de fenilalanina amonio-liasa (FAL)	
3.2.1 Medios de cultivo	18
3.2.2 Preparación del microorganismo para el ensayo de actividad	21
3.2.3 Ensayo de actividad de la FAL	21
3.3 Purificación de la FAL	23
3.4 Características de la enzima FAL	
3.4.1 Síntesis de la FAL	26
3.4.2 Degradación de la FAL	28
3.4.3 Regulación de la FAL	29
3.4.4 Intermediarios del catabolismo de la fenilalanina en <i>Rhodotorula glutinis</i>	30
3.4.5 Peso molecular de la FAL	31
3.4.6 Sitio activo	31
3.4.7 Punto isoeléctrico	32
3.4.8 pH Óptimo	33
3.4.9 Temperatura Óptima	33
3.4.10 Estabilidad en función del pH	33
3.4.11 Estabilidad en función de la Temperatura	33
3.4.12 Efecto de reactivos sulfhidrilo	33
3.4.13 Efecto de metales	34
3.4.14 Efecto de reactivos que atacan al grupo carbonilo	35
3.4.15 Especificidad de sustrato y efecto de su concentración	36
3.4.16 Inhibidores de la FAL	37
3.5 Otras fuentes de fenilalanina amonio-liasa	38
3.6 Antecedentes de aplicaciones de la FAL	
3.6.1 Producción de L-fenilalanina	41

3.6.2	Tratamiento de tumores	43
3.6.3	Determinación cuantitativa de fenilalanina en el plasma	43
3.6.4	Tratamiento de la fenilcetonuria	44
3.6.4.1	Tratamiento extracorporal	45
3.6.4.2	Tratamiento intracorporal	47
	a) Unión de ligandos	47
	b) Células permeabilizadas	48
	c) Inmovilización	49
	i) Microencapsulación	50
	ii) Cápsulas de gelatina dura	50
	iii) En metoxipolietilenglicol	51
	iv) En fibrina de seda	52
4.	MATERIALES Y METODOS	
4.1	Microorganismo	54
4.2	Medios de cultivo	54
4.3	Inóculos	57
4.4	Fermentaciones	58
	4.4.1 En matraz agitado	58
	4.4.2 En Bio-Flo New Brunswick	59
4.5	Técnicas para evaluar el crecimiento del microorganismo	59
4.6	Preparación de las muestras para el ensayo de actividad:	
	4.6.1 Permeabilización con acetona	62
	4.6.2 Permeabilización con alcohol isoamílico	62
4.7	Ensayo de actividad	63
	Definición de una Unidad de FAL	63
	Cálculo de la actividad de la FAL	64
4.8	Efecto del pH sobre la actividad de la FAL	65
4.9	Efecto de la temperatura sobre la actividad	65
4.10	Estabilidad a diferentes temperaturas	66
4.11	Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de reacción	66
4.12	Estabilidad de las células permeabilizadas durante el almacenamiento	66
4.13	Reacción de conversión de L-fenilalanina en ácido trans-cinámico y de L-tirosina en ácido para-cumárico	68
4.14	Mutación química de <i>Rhodospiridium toruloides</i>	69
5.	RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS	
5.1	Crecimiento de <i>Rhodospiridium toruloides</i>	
	5.1.1 Fermentación en YM líquido	71
	5.1.2 Fermentación en el medio para inducción	74

5.1.3	Optimización del medio de cultivo para el crecimiento	75
	Fermentación en el medio CONTROL	76
	Estudios de optimización del medio de cultivo	77
	Efecto del oxígeno	85
5.2	Producción de la enzima fenilalanina amonio-liasas	
5.2.1	Fermentaciones en matraz	90
5.2.1.1	Medio para inducción sin tratar las células	90
5.2.1.2	Medio para inducción permeabilizando las células	91
5.2.1.3	Medios de cultivo definidos	99
5.2.1.3	Medio con glucosa	103
5.2.2	Fermentaciones en Bio-Flo New Brunswick	
5.2.2.1	Medio con glucosa, controlando el pH a 6.0	108
5.2.2.2	Medio para inducción	
	A) Sin controlar el pH	110
	B) Controlando el pH a 6.0	112
5.3	Mutación química de <i>R. toruloides</i> (Cepa de Colección)	119
5.4	Caracterización de la enzima FAL de <i>R. toruloides</i>	
5.4.1	Estabilidad de la FAL durante el almacenamiento	124
5.4.2	Caracterización cinética de la FAL	
5.4.2.1	Efecto del pH sobre la actividad	134
5.4.2.2	Efecto de la temperatura sobre la actividad	136
	5.4.2.2.1 Energía de activación	136
	5.4.2.2.2 Estabilidad a diferentes temperaturas	140
5.4.2.3	Influencia de la concentración de sustrato sobre la velocidad de reacción	142
5.4.2.4	Conversión de L-fenilalanina en ácido trans-cinámico y de L-tirosina en ácido para-cumárico	150
6.	CONCLUSIONES	157
7.	BIBLIOGRAFIA	163

## 1. INTRODUCCION

La fenilcetonuria es una enfermedad que pertenece a los errores innatos del metabolismo y que es transmitida por un gene autosomal recesivo (Rong-Sen, 1977). Se manifiesta por la presencia de retraso mental acompañado de otras características como eccema, convulsiones, aumento del tono muscular, hiperactividad y falta de pigmentación en la piel y en el cabello (Alton, 1965).

La fenilcetonuria clásica se debe a la deficiencia de la enzima hepática fenilalanina-hidroxilasa que actúa catalizando el primer paso del catabolismo de la fenilalanina en el hombre produciendo tirosina que posteriormente es degradada a compuestos que generan energía de acuerdo a la ruta metabólica que se muestra en la Figura 1.

Debido a que los fenilcetonúricos no pueden realizar la transformación antes mencionada, la fenilalanina se acumula alcanzando niveles muy elevados que fluctúan entre 10 y 60 mg/100 ml de plasma, mientras que en individuos sanos se encuentra entre 1 y 2 mg/100 ml de plasma. Además se excretan en la orina cantidades elevadas de fenilalanina (1 g/día) y de sus metabolitos: ácido fenilpirúvico (1-2 g/día), ácido feniláctico (1-2 g/día) y fenilacetilglutamina (2-3 g/día) (Alton, 1965).

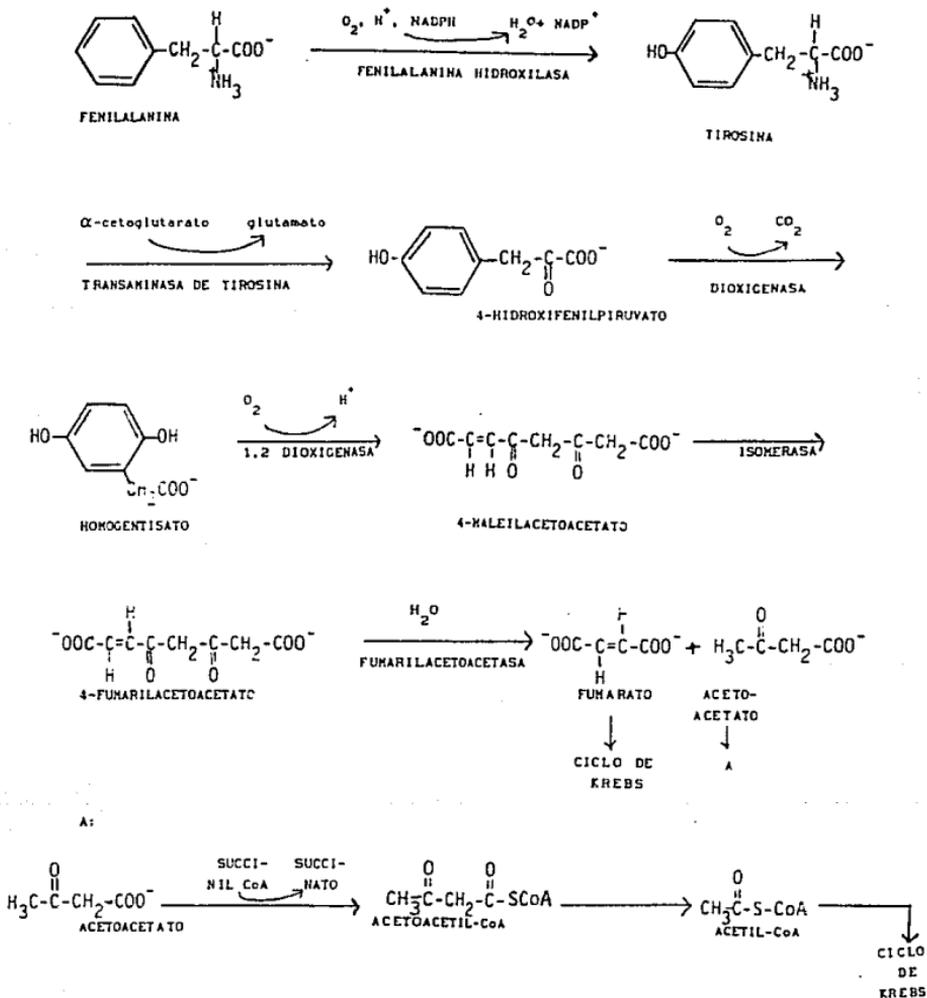


FIGURA 1. CATABOLISMO DE LA FENILALANINA EN EL HOMBRE (Lehninger, 1980)

La fenilalanina es un aminoácido esencial, es decir, que no puede ser sintetizado por el hombre y por lo tanto lo debe adquirir a través de los alimentos que ingiere. Se encuentra presente en todas las proteínas constituyendo en las de origen animal aproximadamente el 5%. Una dieta normal aporta al organismo una mayor cantidad de fenilalanina que la necesaria para mantener un balance positivo de nitrógeno, para sintetizar las proteínas requeridas para el crecimiento y para la renovación celular. En individuos sanos la fenilalanina en exceso es catabolizada de la manera mencionada anteriormente pero en el caso de los fenilcetonúricos se acumula produciendo daños irreversibles en el desarrollo cerebral. Antes de los tres meses de edad, los bebés fenilcetonúricos no presentan alteraciones. Si se les somete inmediatamente a una dieta adecuada se evitan las consecuencias de la enfermedad permitiendo que el niño crezca y se desarrolle normalmente desde el punto de vista físico e intelectual (Bourges y Velázquez, 1987).

Para poder evitar el retraso mental es indispensable realizar un diagnóstico oportuno que permita detectar la fenilcetonuria antes de que se presenten daños en el cerebro. La Secretaría de Salud publicó en 1988 una "Guía para la prevención del retraso mental producido por hipotiroidismo congénito, toxoplasmosis congénita activa y fenilcetonuria". En este documento se establece que se debe tomar una muestra de sangre por punción en el talón, recogiéndola en un papel filtro especial, a todos los bebés entre las 48 horas y los tres meses de edad y enviarla a un

laboratorio especializado para que sea analizada. En caso de que se detecte fenilcetonuria, de inmediato se somete al bebé a un tratamiento que consiste en aplicar una dieta tal que no aporte exceso de fenilalanina. Se vigila continuamente la concentración del aminoácido y se varía la dieta de manera que se satisfagan todas las necesidades nutricionales del paciente para que se desarrolle normalmente. Es conveniente mantener el tratamiento dietético hasta los 10 años, edad en la que el cerebro está desarrollado prácticamente en su totalidad (Cederbaum, 1984).

La incidencia de la fenilcetonuria es variable. En 1987 en Estados Unidos fue de 1 por cada 10 000 nacimientos, mientras que en las poblaciones de origen celta fue de 1 por cada 2000. En los países africanos y en Japón la fenilcetonuria fue prácticamente inexistente. En México no se conoce con exactitud la frecuencia de dicha enfermedad.

Las mujeres fenilcetonúricas que deseen tener un bebé deben igualmente someterse a la dieta baja en fenilalanina antes del embarazo para evitar lesiones al feto que incluyen microcefalia, retraso en el crecimiento, daños neurológicos, malformaciones del corazón, de los huesos, de los ojos y de otros órganos (Bickel, 1980).

Para el control de la fenilcetonuria existen productos especialmente formulados pero no se elaboran en México lo cual dificulta su disponibilidad. Los productos antes mencionados se pueden dividir en dos grupos:

A) Formulaciones con bajo contenido de L-fenilalanina. Tal es

el caso del LOFENALAC de Mead-Johnson que es un hidrolizado de caseína al cual se le remueve la mayor parte de la fenilalanina; además contiene grasas, carbohidratos, vitaminas y minerales en cantidades adecuadas para el bebé. Se utiliza como único alimento solamente para disminuir la concentración de la fenilalanina hasta el nivel normal y posteriormente se combina con otros alimentos de manera que se aporten todos los nutrimentos, incluyendo fenilalanina, que el bebé requiere para su crecimiento.

B) Mezclas de L-aminoácidos libres de fenilalanina. Por ejemplo, el PHENYL-FREE, de Mead-Johnson, el PKU 1 (para bebés de 1-12 meses) y el PKU 2 (de los 13 meses en adelante) elaborados por Milupa. Estas formulaciones contienen todos los aminoácidos, excepto L-fenilalanina y además incluyen vitaminas, minerales y elementos traza. Se combinan con otros alimentos para suministrar proteínas, grasas, carbohidratos y L-fenilalanina. Permiten mayor flexibilidad de la dieta que el LOFENALAC ya que son productos totalmente libres de L-fenilalanina.

En la elaboración del primer grupo de alimentos el método que se utiliza en la actualidad para separar la fenilalanina de los hidrolizados de caseína es por adsorción en carbón activado. Sin embargo, dicho método presenta la desventaja de que se adsorben también otros aminoácidos hidrofóbicos como tirosina y triptofano que deben añadirse al producto después del tratamiento.

Una alternativa para la elaboración de los productos que se utilizan en el tratamiento de la fenilcetonuria consiste en aplicar un método más específico que el mencionado anteriormente, como podría ser una degradación enzimática. La enzima fenilalanina amonio-liasa (FAL) (EC 4.3.1.5) cataliza la desaminación no oxidativa de fenilalanina produciendo dos compuestos: por una parte, ácido trans-cinámico que no es tóxico para el organismo y que es metabolizado hasta formar ácido hipúrico que se excreta en la orina (Snapper, 1940) y por otra, amoníaco que tampoco es tóxico. En la Figura 2 se muestra la reacción catalizada por la FAL.

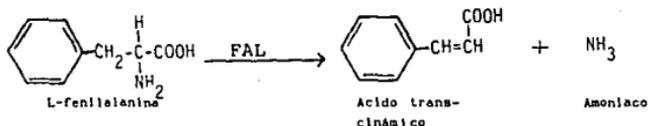


FIGURA 2. REACCION CATALIZADA POR LA FENILALANINA AMONIO-LIASA

La enzima FAL se encuentra en plantas superiores y en algunos microorganismos. En las primeras participa en la síntesis de compuestos fenilpropanoides como ligninas y flavonoides (Orndorfi, 1988) y en los microorganismos se relaciona con el primer paso en el catabolismo de fenilalanina para generar carbono y/o nitrógeno cuando lo requiere la célula (Kane, 1985).

## 2. OBJETIVO

El trabajo que se presenta a continuación tiene como objetivo producir la enzima fenilalanina amonio-liasas de *Rhodosporidium toruloides*, caracterizarla y determinar las condiciones óptimas para su aplicación potencial en la elaboración de productos bajos en fenilalanina para el tratamiento de la fenilcetonuria y para poder disponer de ellos en el país a un menor costo que los importados.

Este proyecto se ubica en el marco del programa nacional de prevención del retraso mental, establecido por la Secretaría de Salud junto con diversas dependencias de la Universidad Nacional Autónoma de México. En el Departamento de Alimentos de la Facultad de Química se está desarrollando un proceso para la elaboración de un alimento bajo en fenilalanina. El trabajo que se presenta forma parte de un programa global de optimización técnica de dicho proceso.

### 3. GENERALIDADES

#### 3.1 CARACTERISTICAS GENERALES DE *Rhodosporidium toruloides*

El género *Rhodosporidium* está constituido por levaduras con pigmentos carotenoides que producen teliosporas como parte de su ciclo de vida. Hasta el momento se conocen nueve especies de dicho género que difieren en cuanto a sus características fisiológicas, a la morfología de sus teliosporas y en sus incompatibilidades sexuales (Kreger-van Rij, 1984).

*Rhodosporidium toruloides* es la cepa imperfecta de *Rhodotorula glutinis*. Las células del primer microorganismo cuando se cultiva en agar con extracto de malta incubando a temperatura ambiente durante cuatro días, tienen forma esférica a elongada (2-7) x (4-12)  $\mu\text{m}$ . El color del cultivo varía de rosa a anaranjado.

En la Tabla 1 se comparan algunas características de *Rhodosporidium toruloides* y de *Rhodotorula glutinis*. Se puede apreciar que ninguna de las dos levaduras es fermentativa, ni forman almidón pero presentan algunas diferencias en cuanto a la asimilación de las diferentes fuentes de carbono que se mencionan.

TABLA 1

COMPARACION DE ALGUNAS CARACTERISTICAS DE  
*Rhodosporidium toruloides* y *Rhodotorula glutinis*  
 (Kreger-van Rij, 1984)

CARACTERISTICA	<i>Rhodosporidium toruloides</i>	<i>Rhodotorula glutinis</i>
Pigmento carotenoide	+ <sup>a</sup>	+
Fermentativa	- <sup>b</sup>	-
Formación de almidón	-	-
Asimilación de nitratos	+	+
Asimilación de diferentes fuentes de carbono:		
Acido cítrico	-	v <sup>c</sup>
Acido succínico	-	+
Almidón	-	v
Celobiosa	-	+
Galactosa	+	+
Inositol	-	-
Lactosa	-	-
L-arabinosa	+	v
Maltosa	+	+
Manitol	+	v

- a: Característica positiva  
 b: Característica negativa  
 c: Variable

Se ha encontrado *Rhodosporidium toruloides* en diversas fuentes: pulpa de madera, aire y mamíferos marinos. Las fuentes de *Rhodotorula glutinis* son: aire, suelo, pulpa de madera, hojas de plantas, conservas en salmuera, mar, y textiles (Kreger-van Rij, 1984).

La referencias que existen respecto a la enzima fenilalanina amonio-liasa de *Rhodospiridium toruloides* son escasas por lo cual la información que se presenta a continuación se refiere a *Rhodotorula glutinis* ya que se trata de la misma levadura correspondiendo la primera a la fase asexual de la segunda.

### 3.2 PRODUCCION DE FENILALANINA AMONIO-LIASA

#### 3.2.1 Medios de cultivo

La enzima fenilalanina amonio-liasa no es constitutiva en *Rhodotorula glutinis* ni en *Rhodospiridium toruloides*. Para que la produzcan es necesario incluir en el medio de cultivo alguna sustancia que funcione como inductor, por ejemplo: L-fenilalanina, D,L-fenilalanina, L-tirosina, D,L-tirosina, hidrolizados de proteínas como caseína o sangre (Finkelman, 1986).

En las Tablas 2A y 2B se muestra la composición de medios de cultivo para la producción de la FAL de *R. glutinis* reportados por diferentes autores. Se puede observar que en todos se utiliza fenilalanina como inductor.

El 80% de los medios de cultivo (para *R. glutinis* y para otros microorganismos) analizados en 20 referencias son complejos. El 20% restante son medios definidos. Wick y colaboradores (1982) reportaron que en un medio complejo obtuvieron una actividad de FAL tres veces mayor que en uno definido. Por otro lado, Marusich

y colaboradores (1981) lograron una actividad 5 veces mayor en un medio definido que en uno complejo. La diferencia en los resultados que reportaron los autores mencionados puede deberse a que los primeros emplearon glucosa como fuente de carbono en el medio definido y según Orndorfi (1988) dicho carbohidrato reprime la síntesis de la enzima. En cambio Marusich y colaboradores (1981) utilizaron fenilalanina como fuente de carbono y sulfato de amonio como fuente de nitrógeno. Los resultados contradictorios se deben probablemente a la diferencia en la composición de los medios de cultivo y en las cepas empleadas.

Las condiciones de fermentación presentan diferencias dependiendo del autor, pero en general, la temperatura es de 28<sup>o</sup>a 30<sup>o</sup>C, la agitación varía entre 125 y 600 r.p.m., la aireación es de 0.5 a 1.0 v.v.m. y el tiempo de fermentación reportado es muy heterogéneo ya que varía de acuerdo con la composición del medio de cultivo, con la forma de preparar el inóculo, con el fermentador utilizado y con la cepa empleada. La máxima actividad de la FAL se presenta en la fase logarítmica media a tardía.

TABLA 2A

MEDIOS DE CULTIVO PARA LA PRODUCCION DE  
LA FENILALANINA AMONIO-LIASA  
DE *Rhodotorula glutinis*  
(Sin incluir oligoelementos)

REFERENCIA	COMPONENTE (g/l)							
	Extracto de levadura	Extracto de malta	Peptona	Stotina	Glucosa	L-glutamato	L-fenilalanina	L-isoleucina
OGATA et al. (1967)	0.5	---	---	---	---	---	1.0	---
HODGINS (1971)	1.0	10	---	---	---	---	1.0	---
FRITZ et al. (1976)	1.0	10	---	---	---	---	1.0	---
WICK et al. (1982)	1.0	10	---	---	---	---	1.0	---
YAMADA et al. (1980)	---	10	10	---	---	---	0.5	5
MARUSICH et al. (1981)	1.0	10	---	---	---	---	2.57	---
MARUSICH et al. (1981)	---	---	---	.01	---	---	2.57	---
WICK et al. (1982)	---	---	---	---	10	3.0	1.00	---

**TABLA 2B**  
**OLIGOELEMENTOS EMPLEADOS EN LOS MEDIOS DE CULTIVO PARA LA**  
**PRODUCCION DE LA FENILALANINA AMONIO-LIASA**

REFERENCIA	COMPONENTE (g/l)					pH
	$KH_2PO_4$	$K_2HPO_4$	$MgSO_4$	NaCl	$(NH_4)_2SO_4$	
OGATA et al. (1967)	2.0	1.0	0.1	----	----	6.0
YAMADA et al. (1980)	---	---	---	5.0	----	6.0
MARUSICH et al. (1981)	1.40	0.78	0.1	----	1.5	6.2
WICK et al. (1982)	1.65	1.38	---	0.5	----	6.8

### 3.2.2 Preparación del microorganismo para el ensayo de actividad

En 11 de 16 referencias analizadas se rompen las células ya sea con un sonicador, con una prensa o con un molino. Después de romper las células, se centrifuga eliminando la pastilla y el sobrenadante constituye la enzima cruda.

En las cinco restantes se dejan las células intactas al término de la fermentación pero se incluye en la mezcla de reacción para el ensayo de actividad algún agente tensoactivo o bien, se incluye un tratamiento de permeabilización previo al ensayo.

### 3.2.3 Ensayo de actividad de la FAL

Se reportan dos métodos para ensayar la actividad de la FAL:

Uno de ellos es el desarrollado por Ogata y colaboradores (1967). La mezcla de reacción contiene 20 mg de células secas, 40  $\mu$ mol de L-fenilalanina, 200  $\mu$ moles de buffer de Tris-HCl, pH=8.5 y 1 mg de bromuro de cetiltrimetilamonio en un volumen final de 4.0 ml. Se incuba una hora a 37°C, se detiene la reacción añadiendo 0.2 ml de HCl 6N y se centrifuga. Del sobrenadante se toma 1 ml y se extrae con 2 ml de éter; la fase etrea se extrae con NaOH 0.1N y se mide la absorbancia de la solución alcalina a 268 nm. Se interpola el valor obtenido en una curva patrón de ácido trans-cinámico para conocer su concentración.

El otro método que se reporta y que es de mayor aplicación que el anterior consiste en medir durante algunos minutos el aumento de absorbancia debido a la conversión de L-fenilalanina en ácido trans-cinámico y determinar la velocidad de formación de dicho compuesto en base a su coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) a la longitud de onda empleada.

En 15 de las 20 referencias analizadas, se sigue la reacción a 290 nm y en las restantes, a una longitud de onda diferente.

En 14 de las 20 referencias que se revisaron la mezcla de reacción se incuba a 30°C mientras que en las 6 restantes se realiza a temperaturas superiores en algunos casos o inferiores en otros. La mezcla de reacción presenta diferencias en cuanto a las concentraciones de sus componentes, pero en todas se emplea buffer de Tris-HCl, L-fenilalanina (sustrato) y enzima. La reacción se inicia añadiendo la enzima.

### 3.3 PURIFICACION DE LA FAL

Se reportan varias tcnicas para purificar la FAL que difieren en cuanto a la cantidad y naturaleza de las etapas del proceso. Por la misma causa se obtienen diferentes grados de pureza de la enzima. A continuación se describe el proceso de purificación más empleado:

Se parte del extracto crudo de la enzima que se obtiene rompiendo las células con un sonicador Branson W-185-D, 30 minutos a la máxima potencia; con una prensa francesa a 10 000 lb/in<sup>2</sup>, o bien con un molino Dyno Mill. Se centrifuga para eliminar los residuos celulares y el sobrenadante constituye la enzima cruda.

En algunos casos el primer paso de purificación consiste en añadir sulfato de protamina al 5% en una relación de 155 mg de protamina por cada gramo de proteína para precipitar los ácidos nucleicos. Se centrifuga y se descarta la pastilla. El sobrenadante se concentra como se indica a continuación. En otros casos lo primero que se hace es precipitar toda la proteína de la solución enzimática agregando sulfato de amonio (50-65 gramos por cada 100 ml de solución) con agitación. Se centrifuga y se recupera el precipitado en un menor volumen de buffer de Tris-HCl, 50 mM, pH = 8.5. Todas las operaciones se realizan a una temperatura entre 0° y 5°C.

El segundo paso es un fraccionamiento con sulfato de amonio. La enzima precipita cuando se añaden entre 28 y 37 g/100 ml. El precipitado se redisuelve en el buffer antes mencionado.

El tercer paso es un fraccionamiento con citrato de sodio. La enzima precipita después de agregar 30 a 37 g/100 ml de la sal. Se resuspende en el mismo buffer.

El cuarto paso es en algunas ocasiones un fraccionamiento con fosfato de potasio ( $K_2HPO_4$ ). La enzima precipita con 15 a 23 g/100 ml de solución, se suspende en buffer y se concentra la solución después de precipitar la enzima añadiendo sulfato de amonio (40 g/100 ml). Después de redissolver el precipitado se dializa contra el mismo buffer. En otras ocasiones, la solución obtenida en el tercer paso se dializa contra el buffer mencionado anteriormente y luego se aplica a una columna de DEAE-celulosa (DE 70); las fracciones con actividad de la FAL se precipitan con sulfato de amonio (4 gramos por cada 100 ml de solución). El precipitado se resuspende en buffer de Tris-HCl.

El último paso es una cromatografía en columna de Sephadex G-200. Se colectan las fracciones con actividad de FAL y se concentran como se mencionó en el paso 4. El precipitado se redissuelve en buffer de fosfato de potasio 0.01M, pH = 7.2 o en Tris-HCl 0.05M, pH = 8.5. (Fritz, 1976 y Hodgins, 1971).

Gilbert y colaboradores (1982) reportan otra técnica de purificación que consta únicamente de dos etapas. El extracto crudo se hace pasar por una precolumna con inmunoglobulina G unida a Sefarosa 4B (sin actividad anti-FAL) y la proteína que eluye sin ser retardada se pasa por otra columna con Inmunoglobulina G anti-FAL unida a Sefarosa 4B. Se lava hasta no detectar proteína en el eluyente (por absorbancia a 280 nm). La enzima se eluye con

buffer de Tris-HCl 0.1M, pH = 10.0 con NaCl 0.5M.

En la Tabla 3 se muestra la secuencia de purificación reportada por Fritz y colaboradores (1976) y en la Tabla 4 la publicada por Gilbert y colaboradores (1982). La primera consta de 5 etapas lográndose purificar la enzima 260 veces, mientras que la segunda incluye solamente dos etapas pero se purifica únicamente 58 veces.

**TABLA 3**  
PURIFICACION DE LA FAL DE *Rhodotorula glutinis*  
(Fritz, 1976)

PASO	$U_t^1$	PROTEINA (mg)	A.E. (U/mg)	$Y^2$ (%)	VECES PURIFI- CACION
1. EXTRACTO CRUDO	2000	200000	0.01	100	1
2. FRACCIONAMIENTO CON SUL- FATO DE AMONIO	1800	30000	0.06	90	6
3. FRACCIONAMIENTO CON CI- TRATO DE SODIO	1530	4250	0.36	76	36
4. CROMATOGRAFIA EN DEAE-CELULOSA	765	765	1.00	38	100
5. CROMATOGRAFIA EN SEPHADEX G-200	575	220	2.60	28	260

1  $U_t$  = Unidades totales (1 unidad = cantidad de proteína que cataliza la aparición de 1 $\mu$ mol de ácido trans-clináamico por minuto a 30°C.

2 Y = Rendimiento

**TABLA 4**  
**PURIFICACION DE LA FAL DE *R. glutinis* (Gilbert, 1982)**

PASO	U <sub>t</sub> <sup>1</sup>	PROTEINA (mg)	A.E. (U/mg)	Y <sup>2</sup> (%)	VECES PURIFI CACION
1. EXTRACTO CRUDO	16.0	175	0.091	100	1
2. CROMATOGRAFIA POR INMUNO- AFINIDAD	10.62	2	5.300	66	58

1 U<sub>t</sub> = Unidades totales (1 unidad = cantidad de proteína que cataliza la aparición de 1μmol de ácido trans-cinámico por minuto a 30°C.

2 Y = Rendimiento

### 3.4 CARACTERISTICAS DE LA ENZIMA FENILALANINA AMONIO-LIASA

#### 3.4.1 Síntesis de la FAL

Si se cultiva *R. glutinis* en un medio definido libre de fenilalanina, no se manifiesta la enzima a menos que se adicione el aminoácido al medio de cultivo. En un medio complejo al cual no se le añade fenilalanina, se obtiene cierta actividad, pero es alrededor de cuatro veces inferior a la que se logra en el mismo medio con el aminoácido. Lo anterior se explica considerando que en el medio complejo existe una cantidad baja de fenilalanina, que actúa como inductor (Wick, 1982).

Se demostró que la FAL es sintetizada de novo en base a los siguientes resultados:

a) La formación de antígeno de la FAL y la aparición de la actividad es simultánea. Se podría pensar que existe un precursor inactivo que no es antigénico. Con el fin de descartar esta

hipótesis, se añadió leucina tritiada a cultivos en el inicio de la fase logarítmica y se determinó la cantidad de tritio incorporada en las proteínas totales y en el antígeno de la FAL. Se observó que se incorporó mucho más en el antígeno que en las proteínas totales. Si existiera un precursor no antigénico, sería muy similar la incorporación de leucina tritiada en ambos pues el precursor ya estaría formado antes de inducir la enzima (Gilbert, 1982).

b) Al analizar por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio los inmunoprecipitados de la FAL en los que se incorporó leucina tritiada, se observó que la proteína marcada radiactivamente presenta iguales características de migración que las subunidades de la FAL auténticas.

c) Al tratar cultivos con cicloheximida (inhibidor de la síntesis de proteínas) agregada al mismo tiempo que el inductor, no se presentó actividad de la enzima ya que no se sintetizó proteína; pero al añadir el inhibidor cuando ya se había alcanzado la máxima actividad, ésta disminuyó eventualmente como sucede en condiciones normales (Wick, 1982).

La inducción de la enzima FAL ocurre en la fase logarítmica media a tardía independientemente del tiempo en el que se añada el inductor antes de este período; pero si se agrega en la fase estacionaria, no se manifiesta la FAL (Wick, 1982).

El hecho de que la máxima actividad de la FAL se presente en la fase logarítmica tardía indica que el microorganismo utiliza la fenilalanina sólo después de que se agotaron otras fuentes

preferidas de carbono o nitrógeno del medio de cultivo. Se sugiere que se manifiesta la FAL cuando se agota la fuente de nitrógeno debido a que la actividad específica en cultivos desarrollados en el medio complejo tiene un valor más similar al obtenido cuando L-fenilalanina es la fuente de nitrógeno en un medio mínimo que al logrado cuando es la fuente de carbono (Marusich, 1981). Sin embargo, Wick y colaboradores (1982) establecieron que no se requiere el agotamiento de la fuente de carbono ni de la de nitrógeno para inducir la FAL.

La FAL tiene dos funciones en los microorganismos: liberar amoníaco generando una fuente de nitrógeno y catalizar el primer paso de la ruta metabólica para obtener carbono a partir de L-fenilalanina (Wick, 1982).

#### **3.4.2. Degradación de la FAL**

La velocidad de degradación de la enzima y de las proteínas totales es similar tanto en la fase exponencial como en la estacionaria. En la segunda, se degrada rápidamente con un tiempo de vida media de aproximadamente tres horas; en la fase exponencial su tiempo de vida media es de 12 horas. Existen hipótesis que establecen que la degradación se debe a la inducción de la actividad de las proteasas del microorganismo o a fugas de los lisozomas (Gilbert, 1982). Por otra parte, Kane y colaboradores (1985) reportaron que la enzima es estable en la fase estacionaria contradiciendo lo establecido por Gilbert y colaboradores (1982), si se resuspende en medio de cultivo para

crecimiento. La variación en los resultados puede deberse a que resuspenden las células en medios de cultivo distintos y a diferencias en las cepas utilizadas.

### 3.4.3 Regulación de la FAL

La glucosa reprime la síntesis de la enzima sobre todo en la fase estacionaria probablemente por acumulación de catabolitos o bien, por un aumento de la proteólisis. No es un inactivador.

Por otra parte, los iones amonio también reprimen la síntesis de la enzima pero por exclusión del inductor inhibiendo la permeasa de fenilalanina o por otras razones relacionadas con la disminución de la cantidad intracelular del aminoácido (Gilbert, 1982). Wick y colaboradores (1982) establecieron que si se añade glucosa al mismo tiempo que el inductor no se altera ni se evita la síntesis de la FAL ni disminuye su actividad. Orndorfi y colaboradores (1988) alimentan glucosa una vez que se agota la inicial y es cuando se termina dicho carbohidrato que se manifiesta la enzima FAL.

Evans y colaboradores (1987) establecieron que es posible que exista una proteasa que degrada a la FAL. Es probable que las concentraciones altas de ácido trans-cinámico activen a la proteasa mencionada ya que dicho compuesto es tóxico para el microorganismo. El hecho de que se inactive la FAL resultaría ventajoso para las células en este caso. En la Figura 3 se pueden observar los factores que favorecen la síntesis de la FAL y aquellos que activan a la proteasa que degrada a la enzima de

acuerdo con lo reportado por Evans y colaboradores (1987).

Para estabilizar la FAL, Finkelman y colaboradores (1986), sugieren que una vez alcanzada la máxima actividad de la enzima, se someta el cultivo a condiciones anaerobias y casi estáticas.

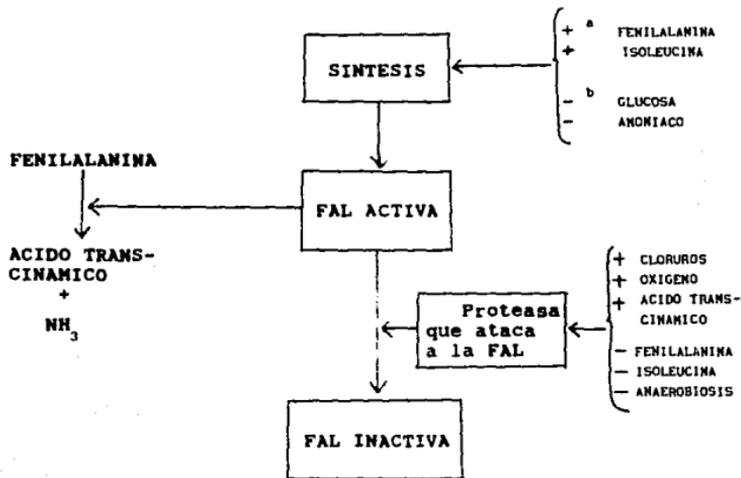


FIGURA 3. REGULACION DE LA SINTESIS Y DE LA DEGRADACION DE LA ENZIMA FAL (Evans, 1987)

a: + = Favorece  
 b: - = No favorece

#### 3.4.4 Intermediarios en el catabolismo de la fenilalanina en *R. glutinis*

La fenilalanina es desaminada por la FAL liberando amoníaco y ácido trans-cinámico el cual es transformado a ácido benzóico que

a su vez es hidroxilado formando ácido 4-hidroxibenzóico. El ácido trans-cinámico y el benzóico inhiben fuertemente el crecimiento del microorganismo. Por tanto, si la fenilalanina induce la ruta catabólica mencionada anteriormente durante la limitación de nitrógeno, además de producir amoniaco (fuente de nitrógeno), se transforman los compuestos tóxicos a 4-hidroxibenzoato que no impide el crecimiento (Marusich, 1968).

#### **3.4.5 Peso molecular de la FAL**

El peso molecular de la enzima es de 275,000 a 300,000 determinado por filtración en gel de Sephadex; y de 275,000 determinado por centrifugación en gradientes de sacarosa (Hodgins, 1971).

Aplicando electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio, Gilbert y Jack (1981) determinaron que la enzima está constituida por cuatro subunidades de igual peso molecular (75,000 daltons cada una).

#### **3.4.6 Sitio activo de la FAL**

Hodgins y colaboradores (1971) demostraron que el sitio activo de la FAL contiene dehidroalanina de la siguiente manera:

Inactivaron la enzima con borohidruro de sodio tritiado y luego efectuaron una hidrólisis ácida. Observaron que únicamente había un fragmento radiactivo que migraba junto con alanina al someter el hidrolizado a una electroforesis a pH = 1.9. Por lo tanto, se forma alanina radioactiva que proviene de la dehidroalanina que es atacada por el borohidruro de sodio.

No se sabe bien la función del grupo dehidroalanina, pero se cree que su carbono  $\beta$  se une al grupo amino del sustrato y que aumenta la habilidad para separarse del grupo amino protonado. Después de la disociación del cinamato, el complejo formado sería el de la enzima-amonio, el cual puede liberar iones amonio o bien, volver a formar L-fenilalanina si se adiciona nuevamente el cinamato. El grupo amino de la dehidroalanina facilita la unión del sustrato a la enzima.

Por otra parte, se comprobó que existe un grupo amino esencial en la enzima. Lo anterior se determinó añadiendo TNBS (ácido trinitrobencensulfónico), que ataca grupos amino. En presencia de ácido cinámico 61.25 mM, no se inactiva la FAL, conserva el 66% de su actividad.

Es probable que este grupo amino esencial pertenezca a la dehidroalanina. Si esto fuera cierto, es posible la formación de puentes de hidrógeno o que se presenten interacciones carga-carga entre el carboxilo del sustrato y el amino de la dehidroalanina. Esta interacción además de la del  $\alpha$ -amino del sustrato con el carbono  $\beta$  de la dehidroalanina, formaría un intermediario cíclico que estabiliza la transición restringiendo el giro de los enlaces y por lo tanto haciendo la catálisis más probable (Parkhurst, 1972).

#### 3.4.7 Punto isoeléctrico

El punto isoeléctrico de la FAL es de 5.4 (Hodgins, 1971; Fritz, 1976).

#### **3.4.8 pH óptimo**

Para la reacción de desaminación de L-fenilalanina el pH en el que se observa la máxima actividad es de 8.5 (Wieder, 1979), mientras que para la síntesis del aminoácido es de 10.0 (Yamada, 1981).

#### **3.4.9 Temperatura óptima**

La temperatura óptima de la FAL es de 49°C (Wieder, 1979).

#### **3.4.10 Estabilidad en función del pH**

Para determinar la estabilidad a diversos pHs, se preincubó la enzima a 60°C durante 15 minutos en buffer de fosfatos 0.01M cada uno a un pH distinto y se midió la actividad remanente. Se determinó que la estabilidad de FAL es mayor a un pH = 7.0 (Ogata, 1967).

#### **3.4.11 Estabilidad a la temperatura**

Se sometió la enzima suspendida en buffer de Tris-HCl 0.06M de pH = 8.5 a un calentamiento a diferentes temperaturas durante 5 minutos y se midió la actividad remanente. Al calentar a 60°C se conservó el 100% de la actividad; a 65°C el 25% y a 70°C se inactivó la enzima (Ogata, 1967).

#### **3.4.12 Efecto de reactivos sulfhidrilo**

En la Tabla 5 se muestra el efecto de varios reactivos que atacan selectivamente los grupos sulfhidrilo. El para-cloro

mercuribenzoato ( $10^{-5}M$ ) inhibe completamente a la FAL pero es posible recuperar el 96% de la actividad si se agrega 2-mercaptoetanol o 90% si se añade glutati3n.

**TABLA 5**  
**EFFECTO DE REACTIVOS SULFHIDRIL0 SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA**  
**FENILALANINA AMONIO-LIASA (Ogata, 1967)**

COMPUESTO	CONCENTRACION (M)	INHIBICION (%)
Acido p-cloromercuriben-z3ico	$10^{-5}$ $10^{-6}$	100 93
L-cisteina	$10^{-3}$	68
L-cistina	$10^{-3}$	0

### 3.4.13 Efecto de metales

En la Tabla 6 se puede apreciar que el mercurio (II) y el cadmio (II) en las concentraciones indicadas inhiben completamente a la enzima. Otros metales como magnesio, manganeso, calcio y fierro (II) no tienen efecto.

TABLA 6

EFFECTO DE METALES SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA  
FENILALANINA AMONIO-LIASA (Ogata, 1967)

COMPUESTO	CONCENTRACION (M)	INHIBICION (%)
MgSO <sub>4</sub>	10 <sup>-3</sup>	0
MnSO <sub>4</sub>	10 <sup>-3</sup>	0
FeSO <sub>4</sub>	10 <sup>-3</sup>	0
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	10 <sup>-3</sup>	23
CdSO <sub>4</sub>	10 <sup>-3</sup>	100
HgCl <sub>2</sub>	10 <sup>-5</sup>	100

#### 3.4.14 Efecto de reactivos que atacan grupos carbonilo

La enzima FAL es inactivada al añadir borohidruro, bisulfito o cianuro. Lo anterior se evita añadiendo análogos de sustrato como ácido feniláctico o D,L-2-hidroxifenilalanina.

El cianuro se une al carbono β del residuo esencial dehidroalanina. Si se trata la FAL con Na(<sup>14</sup>CN) y el producto resultante se hidroliza en medio ácido evaporando el exceso de ácido, al someter a una electroforesis junto con estándares se observa que la mayor parte de la radioactividad migra junto con el ácido aspártico. Esto indica que el cianuro se une al carbono β que puede provenir de la hidrólisis ácida de β-cianoalanina. A su vez, ésta última probablemente se formó por ataque del cianuro en el carbono β de la dehidroalanina (Hodgins, 1971)

#### 3.4.15 Especificidad de sustrato y efecto de su concentración

La L-fenilalanina, la L-tirosina, así como los derivados de ambos compuestos funcionan como sustratos de la FAL. Otros aminoácidos como alanina, ácido aspártico, ácido glutámico, L-histidina, L-lisina, D-triptofano, y L-triptofano no son sustratos de la enzima (Ogata, 1967)

La D-fenilalanina es un inhibidor competitivo de la FAL, pero puede actuar como sustrato cuando se emplean concentraciones elevadas de enzima. Esto último es indispensable debido a la baja afinidad de FAL hacia dicho aminoácido.

La FAL obedece la cinética de Michaelis-Menten. En la Tabla 7 se muestran la  $K_m$  y la velocidad máxima ( $V_{max}$ ) de la enzima de *Rhodotorula glutinis* y se comparan con las de *Sporobolomyces pararoseus*. La enzima de la primera levadura es más afín a la L-fenilalanina que la de la segunda, pero para la tirosina sucede lo contrario. La FAL de *R. glutinis* tiene una alta afinidad hacia D,L-3-hidroxifenilalanina, análogo de L-fenilalanina y su velocidad máxima con dicho sustrato tiene un valor cercano al obtenido con L-fenilalanina como sustrato. La  $K_m$  con D-fenilalanina es muy alta lo cual indica que la enzima es poco afín a dicho sustrato.

**TABLA 7**

**COMPARACION DE LA  $K_M$  Y  $V_{max}$  DE LA FAL DE *R. glutinis*  
Y DE *S. pararoseus***

COMPUESTO	<i>R. glutinis</i> <sup>a</sup>		<i>S. pararoseus</i> <sup>b</sup>	
	$K_M$ ( $\mu M$ )	$V_{max}$	$K_M$ ( $\mu M$ )	$V_{max}$
L-fenilalanina	250	1.4	300	1.17
L-tirosina	150	0.67	85	0.33
D,L-3-hidroxi-fenilalanina	50	1.22	---	---
D-fenilalanina	945	$3.09 \times 10^{-4}$	---	---

a Hodgins, 1971

b Parkhurst, 1972

### 3.4.16 Inhibidores de la FAL

Todos los compuestos probados resultaron ser inhibidores competitivos de la enzima. En la Tabla 8 se muestran los valores de la constante de inhibición de diferentes sustancias. Se observa que el ácido cinámico y sus derivados son los que producen un mayor grado de inhibición.

**TABLA 8**

**INHIBIDORES COMPETITIVOS DE LA FAL (Hodgins, 1971)**

COMPUESTO	$k_i$ (mM)
D-fenilalanina	3.3
D,L-2-hidroxifenilalanina	0.027
ácido L- $\beta$ - feniláctico	1.02
D,L- $\beta$ -fenilserina	1.95
D,L- $\alpha$ -metil-3-hidroxifenilalanina	3.86
ácido cinámico	0.026
ácido cafeico	0.27
ácido 3-hidroxicinámico	0.017
ácido 4-hidroxicinámico	0.016
ácido hidroxicinámico	0.290

### 3.5 OTRAS FUENTES DE FENILALANINA AMONIO-LIASA

La enzima FAL se encuentra presente en todas las plantas verdes incluyendo las criptógamas superiores (Camm, 1972). También se encuentra en basidiomicetes (Bandoni, 1968) y en *Streptomyces* (Bezanson, 1970).

Las características de la enzima varían dependiendo de su fuente. El peso molecular fluctúa entre 226 000 y 330 000. En la mayoría de los casos la FAL está constituida por cuatro

subunidades (Havir, 1968; Bezanon, 1970; Parkhurst, 1971; Hodgins, 1971). La de *Rhizoctonia solani* consta de dos subunidades (Kalghatgi, 1975).

En general, la FAL puede utilizar como sustrato tanto fenilalanina como tirosina. En el caso de la enzima de maíz (Camm, 1971), la de papa (Havir, 1968), la de *R. glutinis* (Hodgins, 1971), la de *S. pararoseus* (Parkhurst, 1972) y la de *Rhizoctonia solani* (Kalghatgi, 1975) se trata de una sola enzima con actividad hacia los dos sustratos antes mencionados. En el caso de *Sporobolomyces roseus* se encuentran dos enzimas diferentes (Camm, 1969).

El sitio activo de la enzima presenta dehidroalanina en todos los casos. En general, la FAL de fuente microbiana obedece la cinética de Michaelis-Menten, a excepción de la de *Rhizoctonia solani*; la enzima de origen vegetal, por ejemplo, la de papa (Havir, 1968) y la de maíz (Camm, 1972), no cumplen con dicha cinética.

En la Tabla 9 se comparan los valores de la  $K_m$  de la FAL de diferentes fuentes usando L-fenilalanina como sustrato. Se puede apreciar que la de *Neurospora crassa* es la menos afín al sustrato mencionado, mientras que la de *Streptomyces verticillatus* es la que presenta mayor afinidad.

El pH óptimo varía en un rango de 8.5 a 9.0, excepto para la de *Rhodotorula rubra* que es de 9.5.

TABLA 9

$K_m$  DE LA FAL PURIFICADA DE DIFERENTES FUENTES MICROBIANAS  
(Sustrato = L-fenilalanina)

FUENTE	$K_m$ ( $\mu M$ )	REFERENCIA
<i>Rhodotorula glutinis</i>	250	Hodgins (1971)
<i>Rhodospiridium toruloides</i> *	600	Gilbert et al. (1985)
<i>Streptomyces verticillatus</i>	160	Bezanon et al. (1970)
<i>Sporobolomyces pararoseus</i>	300	Parkhurst et al. (1971)
<i>Sporobolomyces roseus</i>	400	Camm et al. (1969)
<i>Rhodotorula rubra</i>	380	Evans et al. (1987)
<i>Neurospora crassa</i>	500	Sikora et al. (1982)

\* Enzima contenida dentro de las células permeabilizadas del microorganismo

La actividad de la enzima FAL que se obtiene con los diferentes microorganismos presenta diversos valores debido a que el medio de cultivo, la forma de preparar las células para ensayar la actividad y el ensayo mismo no son iguales. La enzima de *Streptomyces verticillatus* presenta una actividad muy baja en comparación con la de otras fuentes.

En general, la FAL de cualquier fuente es inhibida por reactivos que atacan el grupo carbonilo, como por ejemplo, NaCN, NaBH<sub>4</sub>, entre otros.

En la mayoría de los casos, la enzima es sensible a reactivos sulfhidrilo, excepto la de papa, la de *Streptomyces verticillatus* y la de *Rhizoctonia solani*.

### 3.6 ANTECEDENTES DE APLICACIONES DE LA FENILALANINA AMONIOLIASA

#### 3.6.1 Producción de L-fenilalanina

Desde que surgió el edulcorante "aspartamo" ha aumentado considerablemente la demanda de L-fenilalanina. Tradicionalmente este aminoácido se prepara por medio de síntesis química y por fermentación directa. El proceso más utilizado parte de ácido fenilpirúvico que en presencia de la transaminasa correspondiente, es convertido a L-fenilalanina.

Otra ruta parte del ácido acetamidocinámico que en presencia de acilasa forma fenilpiruvato el cual es transformado a L-fenilalanina por acción de la enzima L-fenilalanina deshidrogenasa y de NADH y  $\text{NH}_4^+$ . El NADH se regenera por la enzima formato deshidrogenasa (Schmidt, 1987).

Existe la posibilidad de sintetizar L-fenilalanina a partir de ácido trans-cinámico y amoniaco en presencia de la enzima FAL. El problema que presenta este proceso es que la conversión es baja y que al reutilizar la enzima disminuye considerablemente su actividad además de que se inhibe en presencia de concentraciones altas de ácido trans-cinámico (Evans, 1987). Es posible estabilizar la FAL y reutilizarla si se somete el cultivo a condiciones anaerobias (por ejemplo, burbujeando un gas inerte), si se controla la temperatura disminuyéndola una vez que se produjo la enzima, añadiendo un alcohol polihidroxílico y omitiendo cloruros (Evans, 1987).

En la Tabla 10 se muestran las condiciones para la producción de L-fenilalanina propuestas por Yamada y colaboradores (1981) y

por Volimer y colaboradores (1986).

TABLA 10  
CONDICIONES PARA LA PRODUCCION DE L-FENILALANINA

PARAMETRO	YAMADA et al. (1981)	VOLIMER et al. (1986)
Temperatura	30°C	14-24°C
pH	10.0	10.4-10.8
Acido trans-cinámico	30-60 mM	67-135 mM <sup>a</sup>
Amoniaco	7.5 M	5-8 M
Inductor	L-Fenilalanina	L-fenilalanina, L-tirosina, o hidrolizados de proteina.
Inductor	0.5g/l	4-8 g/l
Estabilización de la FAL	0.5% L-isoleuci- na	+ N y disminu- yendo la agita- ción.
Fenilalanina obtenida	18 g/l	30 g/l

<sup>a</sup> Alimentado el sustrato gradualmente al avanzar la fermentación.

La Compañía Genex en Estados Unidos utilizaba las células de *Rhodotorula rubra* inmovilizadas en vermiculita para producir L-fenilalanina a partir de ácido trans-cinámico, logrando obtener hasta 60 g/l del aminoácido (Hamilton, 1985) para Searle que elabora aspartamo, sin embargo, recientemente Ajinomoto desarrolló un proceso fermentativo en el que utiliza cepas mejoradas genéticamente de *R. rubra* y que es más eficiente que el de Genex. Además ofrece la ventaja de que se utilizan azúcares como sustrato

y no ácido trans-cinámico cuyo costo es elevado.

### 3.6.2 Tratamiento de tumores

Abell y colaboradores (1973) evaluaron la eficiencia quimioterapéutica de la FAL inyectada (300 Unidades/kg) en ratones. Encontraron que el nivel de fenilalanina y de tirosina en el plasma disminuye rápidamente y se inhibe el crecimiento de cierto tipo de tumores. En seres humanos, se encontró que *in vitro*, la FAL inhibe el crecimiento celular de linfoblastos.

Si se combina la inyección de la enzima purificada con dietas bajas en fenilalanina, aumenta el tiempo de vida de los ratones con tumores y se logra una curación en el 40% de los casos.

### 3.6.3 Determinación cuantitativa de fenilalanina en el plasma

Es posible utilizar la FAL para determinar la concentración de fenilalanina en muestras de plasma de todos los neonatos para efectuar el diagnóstico oportuno de la fenilcetonuria aplicando un método espectrofotométrico rápido, sensible y que requiere sólo una pequeña cantidad de muestra de sangre (aproximadamente 80µl) que se obtienen en tubos capilares con heparina por punción en un dedo o en el talón. Es una alternativa al ensayo semicuantitativo de Guthrie que se basa en el cambio de la inhibición del crecimiento de *Bacillus subtilis* por  $\beta$ -2-tienilalanina debido a la presencia de fenilalanina, que es el método más utilizado para detectar la fenilcetonuria.

El método propuesto por Rong-Sen y colaboradores (1977) para

cuantificar fenilalanina presenta resultados comparables con los que se obtienen con el analizador de aminoácidos o por espectrofluorometría, con la ventaja de que es mucho más rápido (se efectúa en 20 minutos) y sencillo, además de que no se requiere desproteinizar la sangre. Únicamente se centrifuga la muestra de sangre y se defibrina el plasma agregando cloruro de calcio 0.2M en una relación de 5% (v/v) y se vuelve a centrifugar. Se determina la absorbancia a 315 nm para tirosina y como a 290 nm absorben tanto el ácido para-cumárico como el trans-cinámico, la fenilalanina se evalúa por diferencia.

#### 3.6.4. Tratamiento de la fenilcetonuria

Como se mencionó anteriormente, la fenilcetonuria se debe a la deficiencia de la enzima fenilalanina hidroxilasa. Sin embargo, no resulta práctico el tratamiento mediante el reemplazo de dicha enzima ya que es difícil aislarla y purificarla de tejidos de mamíferos en cantidades suficientes. Además, su tiempo de circulación en el organismo es muy corto y requiere cofactores. Es factible el tratamiento con otra enzima: la fenilalanina amonio-liasa que se puede obtener de fuentes microbianas, no requiere cofactores (Ambrus, 1978) y los productos que se forman (ácido trans-cinámico y amoníaco) no son tóxicos para el hombre (Bourget, 1986). La enzima FAL presenta dos inconvenientes: por un lado, que es antigénica y por otro, que se elimina rápidamente de la circulación en especial al administrarla repetidamente. Después de cuatro a ocho horas de haber inyectado la FAL

purificada a ratas con fenilcetonuria inducida experimentalmente, la concentración de fenilalanina disminuye al 7% respecto a la inicial y se mantiene este nivel durante 24 horas. En la primera aplicación, el tiempo de vida media de la enzima resultó ser de  $21 \pm 2$  horas y después de siete inyecciones, sólo de 1.7 horas (Fritz, 1976).

Debido a lo anterior, no resulta conveniente utilizar la FAL en forma libre para el tratamiento de la fenilcetonuria.

Existen publicaciones en las que se propone la inmovilización de la enzima en diversos soportes para el tratamiento extacorporal y en otras para el tratamiento intracorporal. A continuación se describen varias alternativas para hacer factible el tratamiento de la fenilcetonuria con la FAL.

#### 3.6.4.1 Tratamiento extracorporal

Ambrus y colaboradores (1978) reportaron el uso de reactores enzimáticos multitubulares elaborados con fibras huecas asimétricas de AMICON de 250 mm de longitud y un diámetro interno tal que no permite el paso de la FAL pero sí el de la fenilalanina de la sangre y el de los productos de la reacción. Se colocan 70-90 fibras dentro de una cubierta de Plexiglass y el cartucho se carga con seroalbúmina seguida de FAL, ambas suspendidas en buffer de fosfato de sodio 50 mM, pH = 7.5.

Los reactores enzimáticos se pueden utilizar para controlar la concentración de fenilalanina cuando aumenta mucho debido a

fiebre, infecciones o embarazo. Se probó que después de circular la sangre de perros anestesiados y heparinizados por el reactor enzimático durante 15 minutos, el nivel de fenilalanina disminuye al 10-20% respecto al inicial y esta concentración se mantiene por más de dos días. Los reactores se incorporan entre la arteria y la vena femoral añadiendo heparina para evitar la coagulación de la sangre.

Los reactores enzimáticos presentan las siguientes ventajas:

- No se producen alteraciones fisiológicas: el ritmo respiratorio y la presión sanguínea se mantienen estables durante el tratamiento.
- No se modifica la cuenta de glóbulos rojos, blancos ni de plaquetas.
- La enzima no es atacada por el sistema inmunológico, ni es inactivada por el organismo.
- Es posible reutilizarlos.

Sin embargo, los reactores enzimáticos presentan desventajas:

- Se requiere acceso al sistema vascular del paciente.
- Es necesario aplicar un anticoagulante.
- No se pueden emplear para el tratamiento continuo de la fenilcetonuria, sólo de manera intermitente.

### 3.6.1.2 Tratamiento intracorporal

El tratamiento de la fenilcetonuria aplicando una dieta con bajo contenido de fenilalanina es efectivo, pero resulta difícil el controlar la concentración del aminoácido en el organismo de modo que no sea deficiente pero tampoco excesiva. Es un tratamiento costoso y cuando el niño comienza a ir a la escuela es muy problemático continuar con la dieta restringida.

Una alternativa es la terapia con la FAL administrada en forma oral. El problema que se presenta es que la enzima libre es inactivada rápidamente por la proteasas del jugo duodenal. Después de tres minutos se pierde el 50% de su actividad y al cabo de 30 minutos, se inactiva completamente.

En el jugo duodenal existen tres proteasas principales: tripsina, quimotripsina y carboxipeptidasa A. Esta última no ataca a la FAL, mientras que la quimotripsina la inactiva 30 veces más rápido que la tripsina. Para disminuir la velocidad de inactivación de la enzima se reportan varias opciones:

a) UNIR LIGANDOS. Por ejemplo: inhibidores competitivos como ácido amino-oxiacético, ácido amino-oxifenilpropiónico, o-tirosina o ácido trans-cinámico. En presencia de ligandos la velocidad de degradación de la enzima es más lenta. (Gilbert, 1981).

b) UTILIZAR CELULAS PERMEABILIZADAS DE *R. toruloides* con actividad de FAL. La pared celular del microorganismo protege del ataque de las proteasas del jugo duodenal y permite la difusión del sustrato y de los productos de reacción. La degradación de la enzima libre en el jugo duodenal presenta una cinética bifásica con una velocidad inicial de inactivación rápida y luego lenta. En el caso de la enzima contenida dentro de las células de la levadura, la cinética de degradación es también bifásica, pero la velocidad de inactivación inicial es lenta y luego es rápida. Lo anterior sugiere que durante la inactivación inicial la pared celular está siendo degradada por las proteasas, lipasas, etc. Posteriormente, las células son rotas y se libera la enzima que es degradada a igual velocidad que la FAL libre.

En la Tabla 11 se compara la actividad de la FAL libre y de la contenida dentro de las células del microorganismo sobre la fenilalanina en presencia de jugo duodenal.

La enzima protegida por las células es más resistente al ataque de las proteasas del tracto gastrointestinal que la enzima libre; la primera es atacada en mayor grado por tripsina que por quimotripsina, lo contrario sucede con la segunda. El tiempo de vida media en presencia de jugo duodenal aumenta de 3.5 minutos a 60 minutos (Gilbert, 1985).

TABLA 11

COMPARACION DE LA ACTIVIDAD DE LA FAL LIBRE Y DE LA FAL CONTENIDA DENTRO DE LAS CELULAS DE *R. toruloides* EN PRESENCIA DE JUGO DUODENAL (Gilbert, 1985)

	Concentración de fen (mM) a diferentes tiempos				
	Tiempo en minutos				
	0	10	30	60	120
Control sin FAL	0.52	0.71	0.90	1.12	1.35
Jugo duodenal + FAL libre	0.48	0.72	0.86	1.02	0.10
Jugo duodenal + células permeabilizadas	0.57	0.46	0.24	0.13	0.00

c) INMOVILIZACION DE LA FAL: Existen publicaciones en las que se reporta la inmovilización de la enzima en diferentes soportes con el fin de poder administrarla oralmente para el tratamiento de la fenilcetonuria.

En todos los casos que se mencionan a continuación la enzima inmovilizada ofrece las siguientes ventajas en comparación con la enzima libre:

- Mayor resistencia al ataque de las proteasas del tracto gastrointestinal.
- Menor inmunogenicidad.
- Mayor resistencia a los cambios de pH del tracto gastrointestinal.
- Mayor tiempo de vida media en la circulación aún después de aplicarla repetidamente.

i) MICROENCAPSULACION en células artificiales de nitrato de celulosa ultradelgada. Para preparar las microcápsulas se diluye cierto número de unidades de FAL en solución al 15% de hemoglobina y se encapsulan en células artificiales con membrana ultradelgada de nitrato de celulosa de 150 $\mu$ m de diámetro. Se lavan con solución que contiene Tween 20 al 1% (v/v) y se almacenan en el mismo medio a 4°C hasta que se utilicen.

Después de la administración oral diaria durante seis días de microcápsulas con cinco unidades de FAL se logra disminuir la fenilalanina al 25% respecto al nivel inicial logrando alcanzar un nivel normal.

Las células artificiales son permeables al sustrato y a los productos y actúan desaminando la fenilalanina proveniente de los alimentos a nivel del tracto gastrointestinal antes de que sea absorbida y pase a la sangre. La enzima microencapsulada presenta un 30% de la actividad con respecto a la enzima libre a pH fisiológico, pero a pH=8.5 su actividad es igual a la de la segunda (Bourget, 1986).

ii) ENCAPSULACION DE LA FAL EN GELATINA DURA: Se empaacan 50 Unidades de FAL por cápsula en gelatina dura y se cubre con una capa entérica y se administran de 100-200 Unidades después de cada alimento. Se hicieron pruebas con adultos sanos y con fenilcetonúricos y se observó que al ingerir la enzima inmovilizada, disminuye la fenilalanina del organismo y aumenta la concentración de ácido hipúrico, proveniente del catabolismo del

ácido trans-cinámico, en la orina. Los resultados que se obtuvieron no siempre fueron satisfactorios. Lo anterior puede deberse a que las cápsulas flotan en el estómago y son eliminadas sin dar la oportunidad de que la FAL actúe sobre la fenilalanina proveniente de la dieta, o bien, a que el mezclado de la enzima con el contenido del duodeno no fue eficiente o que la cápsula no se disolvió en el duodeno. Para que este método tenga éxito, es necesario encontrar una cubierta adecuada para las cápsulas.

### iii) INMOVILIZACION EN POLIETILENGLICOL

El metoxipoli-etilenglicol de 5000 daltons (PEG) se puede unir covalentemente a grupos amino de la FAL. Al aumentar el pH durante la modificación, es mayor el grado de modificación debido a la desprotonación de grupos amino primarios. Al aumentar el grado de modificación, disminuye la actividad de la enzima probablemente debido a que el PEG reacciona con grupos sulfhidrilo esenciales. En presencia de cinamato 5 mM se protege un poco la actividad.

Wieder y colaboradores (1979) reportaron que para efectuar la inmovilización de la FAL, se adiciona PEG en polvo a la enzima suspendida en buffer de fosfato de sodio 0.05M en presencia de cinamato 5 mM con el pH ajustado al valor que se desee. Se agita y se remueve el exceso de PEG por diálisis utilizando una membrana de Amicon.

Al unir la FAL al PEG se modifican sus propiedades catalíticas: el pH óptimo de la enzima con 52% de sus grupos

amino unidos a PEG está entre 9 y 10 que es mayor al de la enzima libre; la temperatura óptima de la FAL modificada es de 44-45°C, valor inferior al de la enzima libre; no obedece la cinética de Michaelis-Menten y es menos afin a la fenilalanina (Wieder, 1979).

#### (V) INMOVILIZACION EN FIBRINA DE SEDA

Inoue y colaboradores (1980) reportaron la inmovilización de la FAL en fibrina de seda que es un material natural empleado para uso oral. Primero se purifica la enzima (actividad específica de 2.3 unidades/mg de proteína). Se prepara una solución de fibrina al 5% (w/v), para lo cual se calienta a 80°C durante tres horas en solución alcalina. Se lava con agua y se deja secar, para posteriormente solubilizarla incubando a 80-85°C con 41% (w/w) de etanol. Una vez disuelta se filtra y se dializa contra agua. Se añaden 49 ml de solución de fibrina a 25.3 ml de solución de FAL purificada (1000 unidades). Se agrega 1 litro de buffer de fosfato de potasio 50mM, pH = 6.5 con sulfato de amonio (43% de saturación) agitando vigorosamente durante 3 minutos. Se deja reposar 30 minutos y se filtra. Se lava con buffer de fosfato de potasio 5mM, pH = 6.5. La enzima inmovilizada se suspende en 30 ml del mismo buffer, se liofiliza y se logra obtener una actividad de 110 unidades/gramo.

Se verificó que la desaminación de la fenilalanina se realiza en el duodeno, haciendo un estudio *in vivo* con ratas a las cuales se les inyectó la FAL inmovilizada o bien, la enzima libre y luego fenilalanina. Se midió la concentración de t-cinamato en el plasma

a diferentes tiempos y se vió que en presencia de la primera (20 unidades/ kg de rata), aumenta considerablemente el nivel del metabolito, mientras que al administrar la enzima libre no sucedió lo mismo. El tiempo de vida media del cinamato inyectado intravenosamente es de 10-15 minutos mientras que al inyectar la FAL inmovilizada y fenilalanina el tiempo de vida es de 45 minutos lo cual indica que la enzima degrada el aminoácido a nivel del tracto gastrointestinal (Inoue, 1986).

No se alteran las propiedades enzimológicas de la FAL y además de las ventajas mencionadas anteriormente, en este caso se comprobó que la enzima inmovilizada conservada en forma liofilizada es mas estable que la enzima libre también liofilizada.

Se puede concluir que para poder administrar la FAL en forma oral para el tratamiento de la fenilcetonuria es indispensable protegerla de la acción de las proteasas del tracto gastrointestinal para que logre llegar al duodeno y que pueda actuar sobre la fenilalanina proveniente de la dieta antes de que sea absorbida. El hecho de poder aplicar la enzima FAL por vía oral resulta ventajoso ya que hace posible dar una mayor flexibilidad en la dieta facilitando el tratamiento de la fenilcetonuria.

## 4. MATERIALES Y METODOS

### 4.1 MICROORGANISMO

Se trabajó con *Rhodospiridium toruloides* (ATCC 10788, NRRL Y-1091) obtenido del Northern Regional Research Laboratory del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) en forma liofilizada.

### 4.2 MEDIOS DE CULTIVO

Todos los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave (olla Presto o autoclave distribuido por Técnica Industrial Decovi, S.A. de C.V. modelo AV-36) a 15 lb/in<sup>2</sup> durante 15 minutos.

#### 4.2.1 Mantenimiento del microorganismo

*R. toruloides* se conservó en agar YM que contiene 0.3% de extracto de levadura, 0.3% de extracto de malta, 0.5% de peptona de soya, 1.0% de glucosa y 2.0% de agar disueltos en agua destilada.

El microorganismo se sembró en tubos con agar YM en plano inclinado y se incubó a 28°C durante 6-7 días. Una vez desarrollado, se conservaron los cultivos en refrigeración hasta ser utilizados. Se resembró cada dos meses.

#### 4.2.2 Crecimiento del microorganismo

4.2.2.1 Caldo YM: Su composición es igual a la de 4.2.1 pero no incluye agar.

4.2.2.2 Medio CONTROL: 1% de extracto de malta, 1% de glucosa, 0.1% de extracto de levadura, pH=5.5.

4.2.2.3 Optimización del medio de cultivo para el crecimiento  
Primera etapa: En la Tabla 12 se indica la composición de los medios de cultivo empleados en la primera fase de la optimización del medio de cultivo por el método estadístico de Box Wilson.

TABLA 12

MEDIOS DE CULTIVO PARA EL PRIMER EXPERIMENTO DE BOX WILSON

Expe- rimento (#)	Extracto de malta (%)	Extracto de le- vadura (%)	Glucosa (%)	pH
1	0.5	0.1	0.5	5.0
2	0.5	0.1	0.5	6.0
3	0.5	0.1	1.5	5.0
4	0.5	0.1	1.5	6.0
5	1.5	0.1	0.5	5.0
6	1.5	0.1	0.5	6.0
7	1.5	0.1	1.5	5.0
8	1.5	0.1	1.5	6.0
CONTROL	1.0	0.1	1.0	5.5

**Segunda etapa:** En la Tabla 18 se indica la composición de los medios de cultivo empleados en la segunda fase de optimización determinados en base a los resultados de la primera etapa.

#### 4.2.2.4 Medio de cultivo óptimo para el crecimiento (Medio con glucosa)

Contiene 2% de glucosa, 0.86% de extracto de malta, 0.1% de extracto de levadura y el pH inicial del medio es de 5.40.

#### 4.2.2.5 Influencia de la aireación sobre el crecimiento de *R. toruloides*

Se colocaron diferentes volúmenes de medio de cultivo 4.2.2.4 en matraces Erlen-Meyer de 500 ml. Cada uno se inoculó con 10% (v/v) de un cultivo previamente desarrollado en el mismo medio.

#### 4.2.3 Medios de cultivo para la inducción de la enzima FAL

##### 4.2.3.1 Determinación de la concentración óptima de L-fenilalanina en el medio con glucosa (4.2.2.4) para la producción de la FAL

Se colocaron 100 ml de medio 4.2.2.4 en seis matraces Erlen-Meyer de 250 ml adicionando diferentes cantidades de L-fenilalanina: Matraz #1: 0.1%; #2: 0.25%; #3: 0.40%; #4: 0.55%; #5: 0.70%; y #6: 1.0%.

##### 4.2.3.2 Medio con glucosa

Contiene 2.0% de glucosa, 0.86% de extracto de malta, 0.1% de extracto de levadura, 0.55% de L-fenilalanina y el pH inicial del medio es de 5.40.

#### 4.2.3.3 Medio para inducción (Hodgins, 1971)

Contiene 1.0% de extracto de malta, 0.1% de extracto de levadura y 0.1% de L-fenilalanina.

#### 4.2.3.4 Medio de cultivo definidos

4.2.3.4.1 0.1% de L-fenilalanina y 1.0 ml de stock de sales\* por cada 100 ml de medio de cultivo.

4.2.3.4.2 0.4% de L-fenilalanina y stock de sales.\*

4.2.3.4.3 1.5% de L-fenilalanina y stock de sales.\*

\* Stock de sales: 0.1% de cloruro de sodio; 0.3336% de sulfato de manganeso monohidratado y 0.1828% de sulfato de fierro heptahidratado.

### 4.3 INOCULOS

4.3.1 Inóculo conservado en glicerol: Se tomó un ml de cultivo en fase logarítmica en medio YM líquido y se adicionó a un ml de glicerol al 30% (v/v) previamente esterilizado. Se prepararon 25 tubos con inóculo y se congelaron hasta ser utilizados.

4.3.2 Inóculos para el experimento de Box-Wilson: Se inocularon dos asadas de *R. toruloides* en 100 ml de medio 4.2.2.2 contenido en un matraz Erlen-Meyer de 250 ml y se incubó durante 24-26 horas a 30°C, con una agitación de 180 rpm en la incubadora New Brunswick modelo G-24. Para inocular cada matraz se añadió un 10% (v/v) del inóculo preparado en la forma mencionada.

**4.3.3 Inóculos para las fermentaciones en el Bio-Flo New Brunswick Modelo C30:** Se inocularon dos asadas de *R. toruloides* conservado en agar YM en plano inclinado en 50 ml de medio 4.2.2.4 y se incubó bajo las mismas condiciones de 4.3.2.

**4.3.4 Inoculación con asadas de *R. toruloides* conservado en agar YM en plano inclinado:** Para las fermentaciones en matraces Erlen-Meyer se inoculó directamente con 2 - 4 asadas del microorganismo dependiendo del medio de cultivo.

#### **4.4 FERMENTACIONES**

##### **4.4.1 Fermentaciones en matraces**

Se utilizaron matraces Erlen-Meyer de 250 ml con 100 ml de medio de cultivo. La inoculación se realizó en una campana de flujo laminar Veco.

Se empleó una incubadora New Brunswick G-24 controlando la temperatura a 30°C y con una agitación rotacional de 180 rpm, a menos que se indique lo contrario.

Para seguir el curso de las fermentaciones se tomaron muestras, bajo condiciones estériles, de diferentes volúmenes según se requería. Las muestras se tomaron a intervalos variables dependiendo del experimento y se determinaron los parámetros convenientes de acuerdo al objetivo que se perseguía en cada caso.

#### 4.4.2 Fermentaciones en el Bio-Flo New Brunswick

Se utilizó un fermentador New Brunswick modelo C-30 con jarra de 500 ml. Se prepararon 450 ml de medio de cultivo y se esterilizó en autoclave. Se inoculó con un 10% (v/v) de cultivo preparado como se mencionó en 4.3.3 .

Las condiciones de fermentación fueron las siguientes:

Temperatura = 30°C

Aireación = 1 vvm

Agitación = 600 rpm

pH = 6.0 \*

\* El pH se controló en algunos casos a un valor de 6.0 empleando una solución 0.1 N de hidróxido de sodio.

#### 4.5 TECNICAS PARA EVALUAR EL CRECIMIENTO DEL MICROORGANISMO

Para seguir el crecimiento de *R. toruloides* en cada fermentación se determinaron en las muestras tomadas a diferentes tiempos, uno o más de los parámetros que se mencionan a continuación:

**4.5.1 Densidad óptica:** Se diluyó la muestra 1:10 en la mayoría de los casos y en las fermentaciones en medios con glucosa generalmente se efectuó una dilución 1:20. Se determinó la densidad óptica a 650 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV 120-02.

**4.5.2 Peso Seco (X):** Se tomaron 10 ml de muestra y se filtraron, utilizando un equipo Millipore, a través de un papel filtro con poros de 45  $\mu$ m de diámetro previamente tarado. Una

vez filtrada la muestra, se secó en una estufa Riossa modelo EC a 90°C hasta peso constante. Se determinó el peso de las células restando el peso del papel del valor del peso del papel con las células. El peso seco (X) se expresó como g de células por unidad de volumen.

**4.5.3 Concentración de azúcares reductores:** Se utilizó el método de DNS diluyendo previamente la muestra y midiendo la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV 120-02. Se interpoló el valor de la absorbancia obtenido en una curva patrón de glucosa previamente realizada (Figura 4).

**4.5.4 pH:** Se determinó en un pHímetro Beckman # 41.

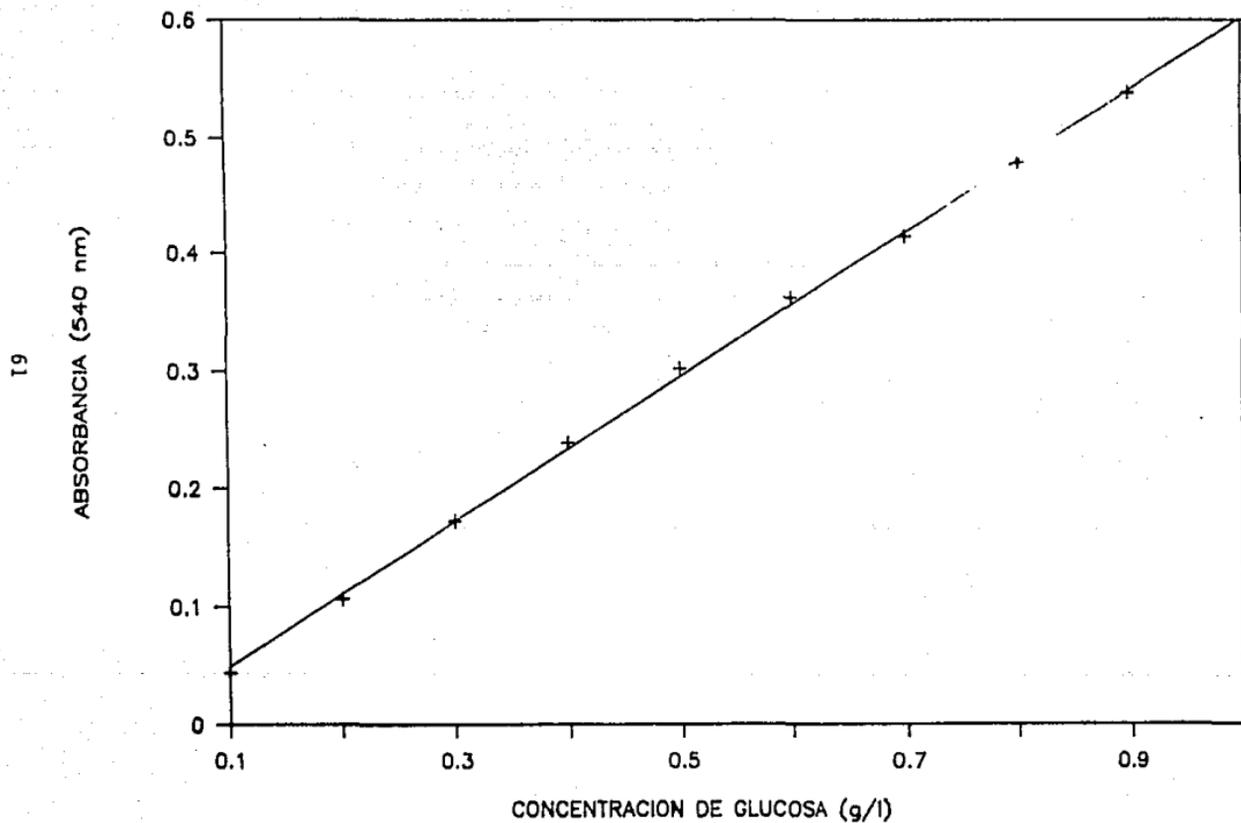
**4.5.5 Conteo de células:** Se utilizó una Cámara de Neubauer para determinar el número de microorganismos por unidad de volumen de muestra. Se hicieron diluciones de manera que fuera posible contarlos. Se contaron las levaduras en 10 cuadros o bien, se contaron los microorganismos en los 25 cuadros cuando su distribución no era homogénea.

Para calcular el No. de células / ml se usó la siguiente fórmula:

$$\frac{\# \text{ células contadas}}{\# \text{ cuadros } 0.004 \text{ mm}^3} \times \frac{1000 \text{ mm}^3}{1 \text{ ml}} \times \text{Dilución} = \frac{\text{No. célula}}{\text{ml}}$$

cuadro

# CURVA PATRON DE GLUCOSA



**FIGURA 4**

#### **4.6 PREPARACION DE LAS MUESTRAS PARA EL ENSAYO DE ACTIVIDAD: PERMEABILIZACION DE LAS CELULAS.**

##### **4.6.1 Permeabilización con acetona**

Se centrifugaron 10 ml de cultivo a 10 000 x g en una centrifuga refrigerada Danetzki K-24, a 4°C durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y se añadieron 20 ml de acetona fría a la pastilla. Se dejó reposar 15 minutos a 4°C agitando ocasionalmente. Transcurrido este tiempo, se centrifugó bajo las condiciones mencionadas anteriormente y la pasilla se lavó dos veces con 5 ml de buffer de fosfato de potasio 0.05M pH=7.4 con 0.85% de cloruro de sodio. Los lavados se efectuaron centrifugando. La pastilla obtenida se suspendió en 1 ml del buffer mencionado y esta suspensión se utilizó como fuente de la enzima FAL para el ensayo de actividad.

##### **4.6.2 Permeabilización con alcohol isoamílico**

Se virtieron 10 ml de cultivo en un matraz aforado de 25 ml y se le añadieron 5 ml de alcohol isoamílico. Se aforó con buffer de fosfato de potasio 0.05M, pH =7.4 con 0.85% de cloruro de sodio. Se agitó durante 1 hora (180 rpm) a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó bajo las condiciones mencionadas en 4.6.1. La pastilla se resuspendió en 1 ml de buffer de fosfatos constituyendo la fuente de enzima.

### 3.7 ENSAYO DE ACTIVIDAD

Se determinó la actividad de la enzima FAL siguiendo el aumento de absorbancia a 290 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer UV/Vis, Lambda 3A, durante 7-10 minutos.

La mezcla de reacción contenía 2.8 ml de buffer de Tris-HCl 0.1 M, pH=8.5; 0.1 ml de suspensión de células y 0.1 ml de solución de L-fenilalanina 24.990 mM. La reacción se inició adicionando el sustrato. El volumen total de la mezcla fue de 3 ml. El ensayo se realizó a temperatura ambiente, a menos que se indique lo contrario.

El blanco contenía 2.9 ml de buffer de Tris-HCl y 0.1 ml de suspensión de células.

Para determinar la actividad usando como sustrato L-tirosina, se procedió igual que con L-fenilalanina, pero se midió el aumento de la absorbancia a 315 nm y se añadieron 0.1 ml de solución de L-tirosina 24.99 mM.

Para determinar la influencia de la concentración de sustrato sobre la velocidad de reacción se varió el volumen de solución de sustrato y se completó a 3.0 ml con buffer de Tris-HCl.

### DEFINICION DE UNA UNIDAD DE FENILALANINA AMONIO-LIASA

Una unidad de FAL (U) es la cantidad de enzima que produce 1  $\mu$ mol de ácido trans-cinámico en 1 min en las condiciones del ensayo.

Actividad específica: Se refirió a la cantidad de células empleadas en el ensayo (U/g células).

### Cálculo de la actividad de la FAL:

Ecuación de Lambert-Beer:

$$A = (c)(b)(C)$$

donde A = Absorbancia  
c = Coeficiente de absorción molar  
b = Longitud de la celda  
C = Concentración molar

En el ensayo de actividad de la FAL se midió el cambio de absorbancia por unidad de tiempo (m), por lo que se modificó la ecuación de Lambert-Beer como se muestra a continuación:

$$m = (c)(b)(v_i)$$

donde m = Cambio de absorbancia / min (Pendiente obtenida en el ensayo de actividad de la enzima)

$v_i$  = Cambio de concentración de ácido trans-cinámico o para-cumárico / min

b = Longitud de la celda = 1 cm

c = Coeficiente de absorción molar:

c ácido trans-cinámico a 290 nm = 10 000 l cm / mol

c ácido para-cumárico a 315 nm = 10 000 l cm / mol

Despejando  $v_i$  de la ecuación anterior:

$$v_i = \frac{m}{(b)(c)}$$

Sustituyendo unidades e introduciendo los factores de conversión convenientes:

$$v_i = m \text{ (min}^{-1}\text{)} \times \frac{1}{1 \text{ cm}} \times \frac{\text{mol}}{10000 \text{ l cm}} \times \frac{10^6 \mu\text{mol}}{1 \text{ mol}} \times \frac{1 \text{ l}}{1000 \text{ ml}} \times 30$$

A            B            C            D            E            F            G

$$v_i = 3 \text{ (m)} \frac{\mu\text{mol producto}}{(\text{min})(\text{ml cultivo})}$$

$$\text{ACTIVIDAD ESPECIFICA} = \frac{v}{A} \times \frac{1}{H} = \frac{\mu\text{mol producto}}{(\text{min})(\text{ml cultivo})} \times \frac{1}{\frac{\text{g células}}{\text{ml cultivo}}}$$

$$\text{Actividad específica} = \frac{\mu\text{mol producto}}{(\text{min})(\text{g células})} = \frac{U}{\text{g células}}$$

donde

- A = Cambio de concentración / min (Velocidad inicial)
- B = Cambio de absorbancia / min (pendiente obtenida en el ensayo de actividad de la FAL)
- C = Longitud de la celda
- D = Coeficiente de absorción molar
- E = Factor de conversión
- F = Factor de conversión
- G = Factor de dilución
- H = Peso seco

#### 4.8 EFECTO DEL pH SOBRE LA ACTIVIDAD

Se prepararon buffers de Tris-HCl, 0.1M ajustando el pH con ácido clorhídrico concentrado o con sosa concentrada a diferentes valores (5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10.0, 10.5 y 11.0). Se determinó la actividad como se indicó en 4.7 pero utilizando los buffers con diferentes pHs.

#### 4.9 EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD

Se procedió como se indicó en 4.7 pero controlando la temperatura. Se determinó la actividad en un espectrofotómetro Beckman DU-7 a 30, 35, 40, 45, 50, 55 y 60°C.

La mezcla de reacción (sin sustrato) se preincubó a la temperatura del ensayo durante 3 minutos.

#### **4.10 ESTABILIDAD A DIFERENTES TEMPERATURAS**

Se incubaron las células permeabilizadas y suspendidas en buffer de fosfato de potasio 0.05M, pH = 7.4 con 0.85% de cloruro de sodio a 30, 45 y 55°C. Se tomaron muestras a diferentes intervalos de tiempo y se determinó la actividad remanente.

#### **4.11 EFECTO DE LA CONCENTRACION DE SUSTRATO SOBRE LA VELOCIDAD DE REACCION**

Se determinó la actividad de la enzima utilizando como sustrato L-fenilalanina o L-tirosina pero variando su concentración. Se procedió como en 4.7 modificando el volumen de buffer de Tris-HCl y el de solución de sustrato de modo que el volumen final de la mezcla de reacción fuera de 3.0 ml.

También se midió la actividad variando la concentración de sustrato como se mencionó, pero añadiendo 0.05 ml de suspensión de células en vez de 0.1 ml.

#### **4.12 ESTABILIDAD DE LAS CELULAS PERMEABILIZADAS DURANTE EL ALMACENAMIENTO**

Se almacenaron células permeabilizadas bajo condiciones diferentes y se midió la actividad remanente tomando muestras a intervalos de tiempo variados. A continuación se describen las condiciones de almacenamiento:

**4.12.1 En buffer de fosfatos a 4°C:** Las células permeabilizadas se almacenaron en buffer de fosfato de potasio 0.05M pH=7.4 con 0.85% de cloruro de sodio a 4°C. Se usaron frascos color ámbar y

con tapón de rosca para conservar las células.

**4.12.2 En buffer de fosfatos a 4°C en atmósfera de nitrógeno:**

Se suspendieron las células en el mismo buffer de 4.12.1 y se almacenaron bajo las mismas condiciones, pero burbujeando nitrógeno durante tres minutos antes de cerrar el recipiente.

**4.12.3 En buffer de fosfatos adicionando 20% de glicerol:**

Se suspendieron las células permeabilizadas en el buffer mencionado en 3.12.1 pero con 20% de glicerol y se almacenó a bajo las mismas condiciones de 4.12.1

**4.12.4 En buffer de fosfatos adicionando 20% de glicerol en atmósfera de nitrógeno:**

Se procedió como en 4.12.3, pero se burbujeó nitrógeno cada vez que se abrió el recipiente.

**4.12.5 En buffer de fosfatos con 30% o con 50% de glicerol en atmósfera de nitrógeno:**

Se procedió como en 4.12.4, pero con las cantidades de glicerol mencionadas.

**4.12.6 Secado al vacío:**

Las células permeabilizadas se secaron en una estufa de vacío Thelco modelo 19 a 30°C y 20 lb / in<sup>2</sup> durante 24 horas. Una vez secas se almacenaron en un desecador a temperatura ambiente. Para determinar la actividad remanente se pesó una muestra y se suspendió en buffer de fosfato de potasio 0.05M, pH=7.4 con 0.85% de cloruro de sodio y se procedió como se mencionó en 4.7.

**4.12.7 Liofilización:** Las células permeabilizadas se liofilizaron en una Liofilizadora Labconco. Parte de las células se almacenó a temperatura ambiente dentro de un desecador y otra parte se almacenó a 4°C también dentro de un desecador. Para determinar la actividad remanente se procedió como en 3.12.6.

**4.13 REACCION DE CONVERSION DE L-FENILALANINA EN ACIDO TRANS-CINANICO Y DE L-TIROSINA EN ACIDO PARA-CUMARICO EN UN REACTOR AGITADO**

**4.13.1 SUSTRATO = L-fenilalanina:** Se preparó una mezcla de reacción que contenía 2.5 ml de suspensión de células, 6.5 ml de buffer de Tris-HCl 0.1M, pH=8.5 y 1.0 ml de solución de L-fenilalanina 24.99 mM de modo que la concentración final del sustrato en el ensayo fue de 2499  $\mu$ M. El volumen total fue de 10 ml. La reacción se realizó a 40°C en celdas con chaqueta colocadas sobre una parrilla Corning PC-353 con agitación magnética. Para mantener constante la temperatura se usó un recirculador Haake E-52. A intervalos, se tomaron muestras y se hizo una dilución 1:20 para medir la absorbancia a 290 nm. Se muestreó hasta que la absorbancia permaneció constante.

**4.13.2 SUSTRATO = L-tirosina:** Se preparó un mezcla de reacción que contenía 2.67 ml de buffer de Tris-HCl 0.1M, pH=8.5; 6.0 ml de suspensión de células y 1.33 ml de solución de L-tirosina 24.99  $\mu$ M de manera que la concentración final del sustrato fue de 3323.67  $\mu$ M. Se procedió como en 3.13.1, pero la absorbancia se determinó a 315 nm.

#### **4.14 MUTACION QUIMICA DE *R. toruloides***

Para realizar la mutación del microorganismo se usaron guantes y se tuvo la precaución de limpiar con metanol toda gota del agente mutagénico que se derramara. Antes de lavar el material empleado se dejó 24 horas en ácido clorhídrico 0.1 N.

**4.14.1 Agente mutagénico:** Se usó N-metil-N-nitroso-N-nitrosoguanidina. Se pesaron 5 mg del agente mutagénico y se disolvieron en 25 ml de buffer de citratos 0.01 M, pH=5.0. Se esterilizó por filtración recibiendo el filtrado en un matraz estéril.

**4.14.2 Preparación del cultivo del microorganismo:** Se inocularon 3 asadas de *R. toruloides* en 100 ml de medio 4.2.3.3 y se incubó en una incubadora New Brunswick G-24 a 30°C con una agitación de 180 rpm durante 18 horas.

**4.14.3 Mutación:** Se colocó 1.0 ml de cultivo en 5 cajas Petri desechables y se agregó 1.0 ml de nitrosoguanidina a cada una. Se dejó el cultivo en contacto con el agente mutagénico durante 10, 20, 30, 40 y 50 minutos. Para detener la reacción se añadieron 8.0 ml de agua estéril / caja. Se hicieron diluciones sucesivas de cada muestra:  $10^{-2}$  a  $10^{-7}$ . Se tomó 1.0 ml de cada dilución correspondiente a cada tiempo de exposición y se colocó en una caja Petri con medio de cultivo 4.2.3.4.3 con 2.0% de agar. Se extendió utilizando una varilla de vidrio. Se hicieron duplicados

de todas las muestras. Se incubó a 28°C hasta observar el desarrollo de colonias.

Se preparó un control que no fue tratado con nitrosoguanidina. Se hicieron diluciones sucesivas ( $10^{-2}$  a  $10^{-6}$ ) y también se inoculó en cajas Petri con el mismo medio de cultivo.

Una vez desarrolladas las colonias, se contaron.

**4.14.4 Selección de las cepas que probablemente son hiperproductoras de la enzima FAL:** Se probaron varias técnicas para seleccionar las posibles mutantes que a continuación se describen:

**4.14.4.1 Por el tamaño de las colonias:** Se hizo la suposición de que las colonias de mayor tamaño en el agar 4.2.3.4.3 podrían ser hiperproductoras.

**4.14.4.2 Inoculando en un medio de cultivo sólido con un indicador ácido-base:** Se prepararon cajas Petri con el siguiente medio de cultivo: 1% de peptona de caseína, 0.5% de cloruro de sodio, 0.0018% de rojo fenol, 2% de agar y ajustando el pH a 7.4. También se prepararon cajas con otro medio de cultivo con 0.1% de L-fenilalanina, 1 ml de stock de sales y 0.0018% de rojo fenol. Una vez inoculadas las cajas, se incubaron a 28°C en una estufa Riessa modelo EC hasta observar el vire del indicador. Se probó otro indicador: azul de bromotimol que se adicionó al medio de cultivo mencionado anteriormente pero excluyendo el rojo fenol.

## 5. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

### 5.1 CRECIMIENTO DE *R. toruloides*

#### 5.1.1 Fermentación en medio YM líquido

Se siguió el curso de la fermentación en caldo YM midiendo la densidad óptica, el pH, el No. de células / ml y la concentración de glucosa con el fin de definir la curva de crecimiento del microorganismo y determinar la duración de cada una de las fases. En la Tabla 13 se presentan los resultados obtenidos.

En la Figura 5 se muestran las gráficas de la cinética del crecimiento de *R. toruloides* en el medio YM. Se puede observar que el pH disminuyó al avanzar la fermentación debido al consumo de glucosa así como también de otras fuentes de carbono del medio de cultivo que el microorganismo utiliza para obtener la energía necesaria para su desarrollo y como producto del catabolismo se liberan ácidos.

Se puede apreciar que la concentración de glucosa disminuyó durante la fermentación lo cual verifica su consumo por parte del microorganismo. La concentración inicial de azúcares reductores, expresada como glucosa, fue mayor que la cantidad de glucosa que forma parte del medio líquido YM (10 g/ l ) debido a que el extracto de malta también aporta azúcares.

La densidad óptica (DO) y el No. de células / ml de cultivo variaron de manera muy similar al transcurrir la fermentación.

En estas dos curvas se pueden apreciar las diferentes fases del crecimiento de *R. toruloides*. La fase lag fue muy larga (16 horas) después de la cual se inició la fase logarítmica aproximadamente a las 18 horas y posteriormente, a partir de las 38 horas de fermentación comenzó la fase estacionaria en la cual prácticamente ya no creció el microorganismo.

TABLA 13  
EVOLUCION DE UNA FERMENTACION EN MATRAZ AGITADO  
EN EL MEDIO YM LIQUIDO

Tiempo de fermentación(hrs)	pH	D.O. ( $\lambda=650m\mu$ )	No. céls ml ( $\times 10^3$ )	Concentración de glucosa (g/l)
0	6.08	0.03	2.44	12.92
3	6.07	0.04	3.25	10.87
5	6.02	0.05	4.05	10.10
8	5.96	0.13	90.94	9.60
10	5.95	0.25	261.46	9.31
12	5.94	0.28	304.10	----
14	5.89	0.42	503.04	----
16	5.88	0.63	801.46	8.30
18	5.86	1.10	1466.93	7.40
22	5.84	3.30	4595.60	6.20
24	5.71	3.69	5149.80	5.80
28	5.65	4.35	6017.68	5.10
30	5.60	4.59	6300.00	4.90
35	5.52	5.33	7466.20	4.50
40	5.50	5.68	7952.50	4.20

# FERMENTACION EN MEDIO YM LIQUIDO

EN MATRAZ AGITADO

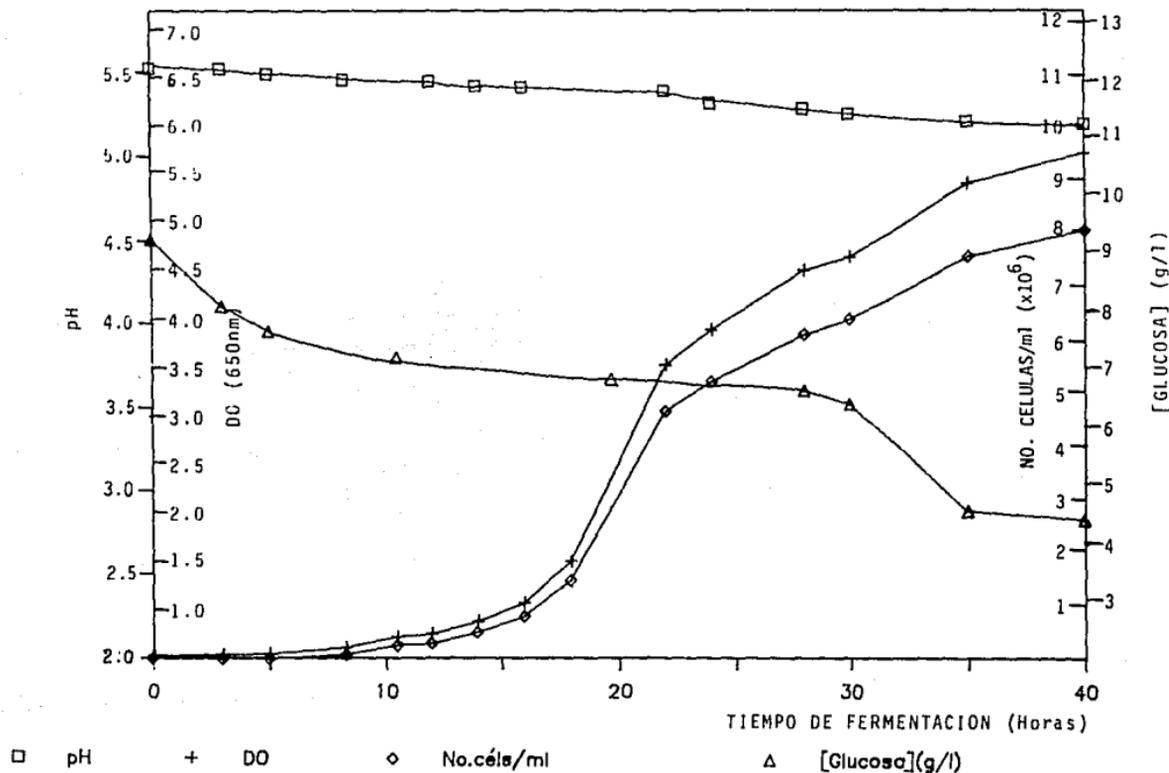


FIGURA 5

El número de células/ml indica la cantidad total de microorganismos, tanto viables como no viables, pero es un parámetro que permite apreciar el avance de la fermentación. No es un dato confiable debido a que resultó difícil contar las levaduras a pesar de que se hicieron diluciones altas de las muestras, ya que las levaduras tienden a agruparse y agregarse impidiendo efectuar un conteo exacto. Además, su distribución en la cámara de Neubauer no fue siempre homogénea.

La duración de la fermentación en este medio de cultivo fue aproximadamente de 40 horas. Se prepararon inóculos en tubos con glicerol al 30% con el fin de conservarlos congelados y de poder disponer de ellos para iniciar otras fermentaciones posteriores. Sin embargo se presentó el problema de que después de permanecer un mes en almacenamiento (0°C), el inóculo perdió su viabilidad, razón por la cual en adelante se inoculó directamente con asadas del microorganismo conservado en agar YM a 4°C.

#### 5.1.2 Crecimiento en el medio para inducción de la FAL

Se siguió la evolución de una fermentación en el medio recomendado por Hodgins y colaboradores (1971) evaluando los cuatro parámetros que se indican en la Tabla 14. Se observa que el pH aumentó debido a la acción de la enzima FAL sobre la L-fenilalanina del medio de cultivo liberándose amoníaco como uno de los productos de la reacción. Se determinó el peso seco (g células/ml cultivo) obteniéndose valores muy bajos comparados con los reportados en las publicaciones de diferentes autores. Por

esta razón, se procedió a optimizar el medio de cultivo para el crecimiento del microorganismo de manera que aumentara la biomasa que se produce durante la fermentación.

**TABLA 14**  
**EVOLUCION DE UNA FERMENTACION EN MATRAZ AGITADO**  
**EN EL MEDIO PARA INDUCCION DE LA FAL**

Tiempo de fermentación (hrs)	pH	DO ( $\lambda = 650\text{nm}$ )	No. de células ml $\times 10^5$	Peso seco (g/l)
0	5.38	0.38	5	0.03626
12	5.97	2.66	440	0.8389
14	6.01	2.80	517	0.8880
16	6.18	3.35	526	1.0807
18	6.66	3.70	533	1.2034
20	7.05	3.94	672	1.2876
22	7.25	4.07	705	1.3333

### 5.1.3 Optimización del medio de cultivo para el crecimiento

El medio YM, recomendado para levaduras aporta los nutrimentos que requieren para su desarrollo; sin embargo, no es necesariamente el óptimo para el crecimiento de *R. toruloides*. Se aplicó el método de Box Wilson para optimizar el medio de cultivo fijando como objetivo el aumentar la cantidad de biomasa que se produce durante la fermentación.

Primeramente se efectuó una fermentación en el medio de cultivo que se usó como CONTROL y que contiene 1% de extracto de

malta, 1% de glucosa y 0.1% de extracto de levadura, ajustando el pH a 5.5.

En la Tabla 15 se muestran los resultados obtenidos. Se puede observar que se obtiene mayor cantidad de biomasa que en los medios de cultivo probados anteriormente pero la duración de la fermentación fue mayor.

**TABLA 15**  
**EVOLUCION DE UNA FERMENTACION EN MATRAZ AGITADO**  
**EN EL MEDIO CONTROL**

Tiempo de fermentación (hrs)	DO ( $\lambda=650nm$ )	Peso Seco (g/l)
0	0.49	0.5946
3	0.70	0.6418
13	2.53	1.0532
15.5	3.80	1.3386
17.5	5.09	1.6286
19.5	5.88	1.8062
21	6.32	1.9051
22	7.35	2.1366
24	7.87	2.4108
26.5	8.57	2.5030
28.5	8.98	2.6199
30.5	9.50	2.8941
39.5	10.72	3.0087
42	11.23	3.0987
44	11.63	3.2133
46	12.14	3.4965
66.5	13.40	3.6314
92	14.00	3.7213

En la Figura 6 se muestra la variación del peso seco al avanzar la fermentación en el medio control. Se puede apreciar que la fase lag en este medio de cultivo fue mucho mas breve (menor de 10 horas) que en el YM; la exponencial se inició a partir de las 12 horas en el primer medio mientras que en el segundo comenzó a las 18 horas; la fase estacionaria se inició a partir de las 60 horas de fermentación.

Una vez realizada la fermentación en el medio CONTROL y sabiendo que después de las 60 horas de fermentación comienza la fase estacionaria, se procedió a realizar la optimización del medio de cultivo como se menciona a continuación:

#### 5.1.3.1 Primer estudio de optimización del medio de cultivo

Se realizó un primer estudio en el cual se variaron 3 parámetros: concentración de glucosa, concentración de extracto de malta y pH, manteniendo constantes la concentración de extracto de levadura, la temperatura de incubación y la agitación.

Debido a que se variaron 3 factores se trabajó con 8 experimentos inicialmente:

$$\# \text{ experimentos iniciales} = 2^n$$

donde  $n = \#$  parámetros a optimizar

$$\text{como } n = 3, \# \text{ experimentos iniciales} = 2^3 = 8$$

Para diseñar los medios de cultivo se tomó como base el medio CONTROL y la unidad de variación fue de  $\pm 0.5$ , por lo tanto, para el extracto de malta el nivel inferior (concentración

# FERMENTACION EN EL MEDIO CONTROL

MATRAZ AGITADO

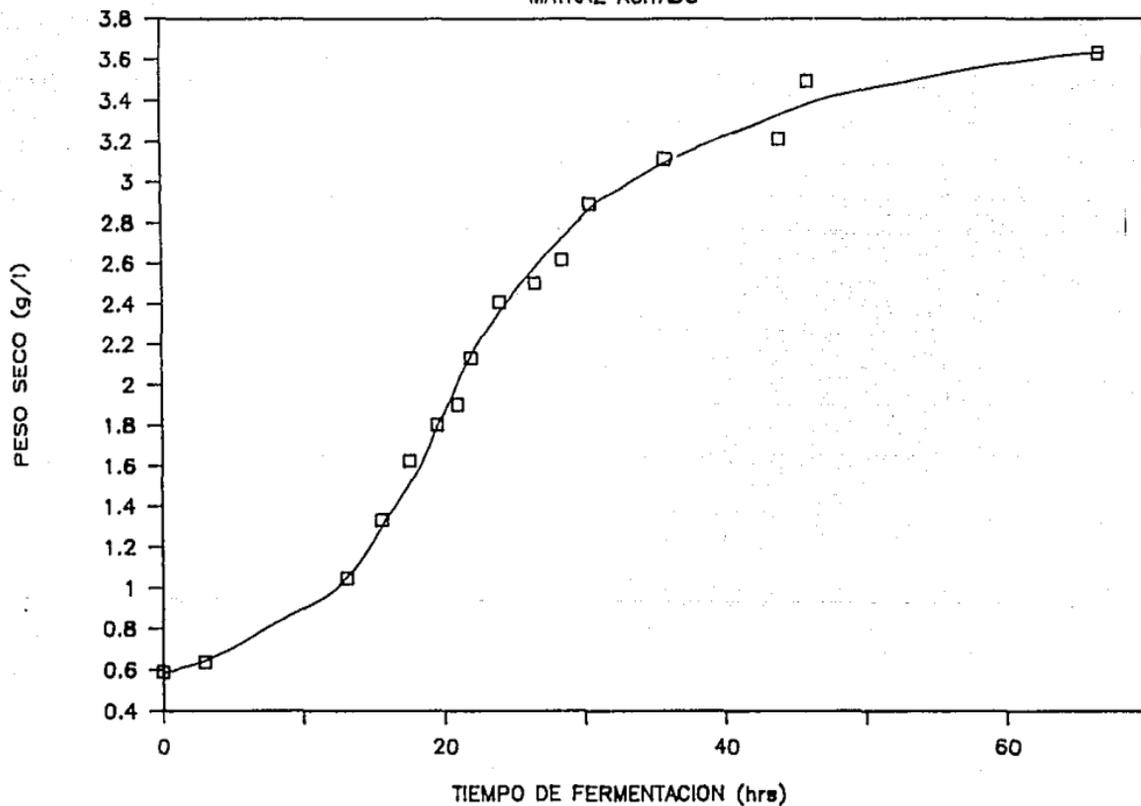


FIGURA 6

inferior) fue de 0.5% y el nivel superior fue de 1.5%, al igual que para la glucosa; y para el pH, el nivel inferior fue de 5.0 y el superior de 6.0.

Se prepararon los medios de cultivo cuya composición se muestra en la Tabla 12; se inocularon con un 10% (v/v) de un cultivo previamente desarrollado en el medio control y se incubaron a 30°C, con agitación de 180 rpm determinando la DO a las 0 horas y a las 64 horas de fermentación (fase estacionaria). En la Tabla 16 se muestran los resultados obtenidos.

**TABLA 16**

**RESULTADOS OBTENIDOS EN EL PROCESO DE OPTIMIZACION DEL MEDIO DE CULTIVO POR EL METODO ESTADISTICO DE BOX-WILSON**

Experi- mento (#)	DO		Peso Seco (g / l) 0 hrs	Peso Seco (g / l) 64 hrs	$\mu^*$ (hr <sup>-1</sup> )
	0 hrs	64 hrs			
1	0.94	13.96	0.6958	3.5283	0.0209
2	0.94	13.44	0.6958	3.3262	0.0204
3	1.04	18.38	0.7182	5.1514	0.0236
4	1.16	17.10	0.7452	4.6785	0.0226
5	1.02	12.34	0.7137	2.9198	0.0189
6	0.90	12.04	0.6868	2.8089	0.0190
7	0.92	17.78	0.6913	4.9297	0.0235
8	0.98	18.12	0.7048	5.0553	0.0236
CONTROL	1.04	16.16	0.7182	4.3312	0.0224

\*  $\mu$  = Velocidad específica de crecimiento

Se calculó la v. específica de crecimiento para cada experimento. Se puede observar que cuando la concentración de

glucosa en el medio de cultivo fue superior a la del CONTROL (experimentos # 3, #4, #7 y #8) la velocidad específica de crecimiento fue mayor en comparación con la obtenida en el medio CONTROL, mientras que en los casos en que la cantidad del monosacárido mencionado fue menor ( experimentos #1, #2, #5 y #6) sucedió lo contrario.

Se calcularon los coeficientes de regresión para cada uno de los parámetros a optimizar en este experimento aplicando la siguiente fórmula:

$$C.R. = \frac{\sum DO_{(nive\ l\ superior)} - \sum DO_{(nive\ l\ inferior)}}{no. de experimentos}$$

donde:

C.R. = Coeficiente de regresión

$\sum DO_{(nive\ l\ superior)}$  = Sumatoria de las densidades ópticas cuando el parámetro a optimizar tenía un valor superior al del CONTROL.

$\sum DO_{(nive\ l\ inferior)}$  = Sumatoria de las densidades ópticas cuando el parámetro a optimizar tenía un valor inferior al del CONTROL.

No. de experimentos = 8

En la Tabla 17 se muestran los coeficientes de regresión. Se observa que el parámetro que influye en mayor grado y de manera positiva sobre el crecimiento de *R. toruloides* es la glucosa ya que se obtuvo el valor más alto y positivo del coeficiente de regresión (+2.45), lo cual indica que para aumentar la biomasa que se produce durante la fermentación, es necesario incrementar la concentración del componente mencionado.

Por otra parte, se obtuvo un valor negativo para el extracto de malta (-0.325) indicando que se debe disminuir su concentración en el medio de cultivo. Para el pH el coeficiente de regresión también fue negativo (-0.220) y por lo tanto, se debe disminuir.

El promedio de las densidades ópticas a las 64 horas de fermentación es de 15.48. A continuación se muestra la ecuación de regresión obtenida:

$$Y = 15.48 - 0.163a + 1.225b - 0.110c$$

donde: Factor A = Extracto de malta:  $(-0.325) (0.5) = -0.163a$

Factor B = Glucosa:  $(2.45) (0.5) = 1.225b$

Factor C = Extracto de levadura:  $(-0.22) (0.5) = -0.110c$

TABLA 17

COEFICIENTES DE REGRESION OBTENIDOS A PARTIR DE LOS EXPERIMENTOS DE OPTIMIZACION DEL MEDIO DE CULTIVO

Parámetro	A	B	(A x B)
	Coefficiente de Regresión	Unidades de Variación	Producto
Extracto de malta	-0.325	0.5	-0.163
Glucosa	2.450	0.5	1.225
pH	-0.220	0.5	-0.110

De acuerdo con los resultados obtenidos en el primer experimento, se diseñó una segunda etapa. Debido a que la glucosa resultó ser el parámetro más importante para el crecimiento del microorganismo, se tomó como base para determinar



de malta, 0.1% de extracto de levadura y el pH inicial del medio es de 5.40. Comparando los resultados de la Tabla 19 con los de la 16 se puede observar que en el primer experimento del método de Box Wilson en dos de los experimentos (#7 y #8) se obtuvo mayor biomasa final que en el segundo experimento pero esto se debe muy probablemente a que el inóculo fue mayor en el primer experimento.

**TABLA 18**

**MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS EN LOS EXPERIMENTOS DE LA SEGUNDA ETAPA DEL METODO DE OPTIMIZACION DE BOX-WILSON**

Experi- mento (#)	[Glucosa] (%)	[Extracto de malta] (%)	[Extracto de levadura] (%)	pH
CONTROL	1.0	1.00	0.1	5.50
2	1.5	0.93	0.1	5.45
3	2.0	0.86	0.1	5.40
4	2.5	0.79	0.1	5.35
5	3.0	0.72	0.1	5.30

Debido a que la fermentación en los medios de cultivo con glucosa es muy larga, se realizó un experimento en el cual se varió la velocidad de transferencia de oxígeno y que se describe mas adelante.

## SEGUNDA ETAPA DE OPTIMIZACION DEL MEDIO

METODO DE BOX WILSON

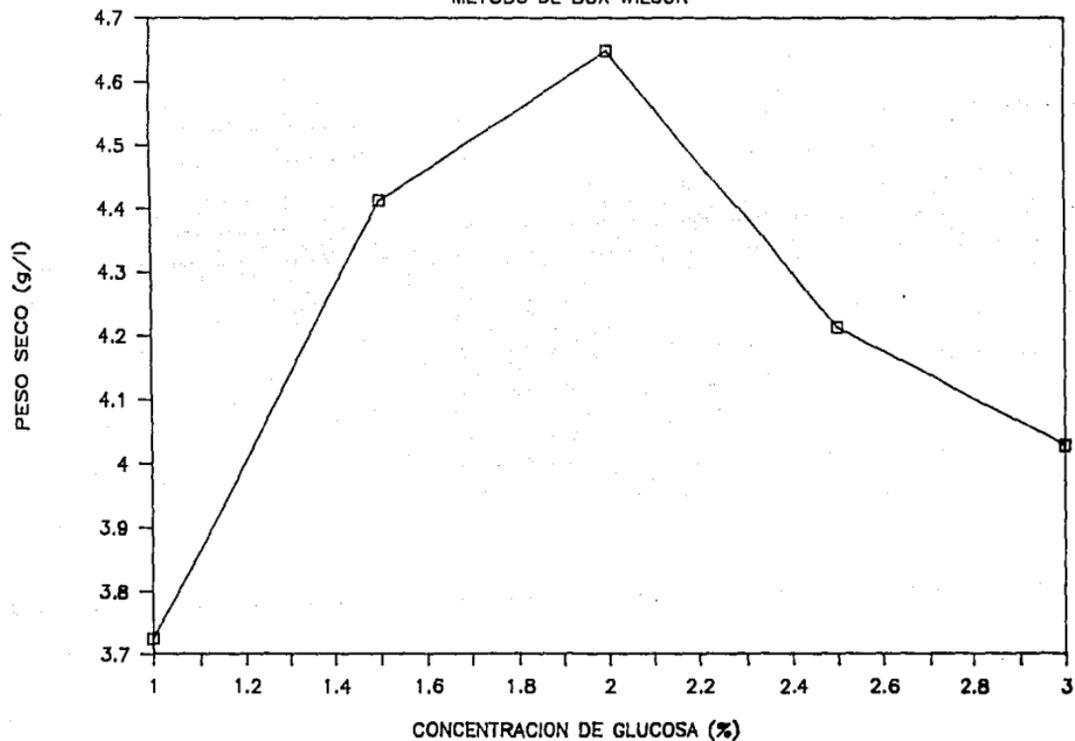


FIGURA 7

**TABLA 19**  
**RESULTADOS DE LA SEGUNDA ETAPA DE LA OPTIIZACION**  
**DEL MEDIO DE CULTIVO**

Matraz #	DO 0 hrs	DO 66 hrs	Peso Seco 0 hrs (g / l)	Peso Seco 66 hrs (g / l)	$\mu^*$ (hr <sup>-1</sup> )
CONTROL	0.94	14.52	0.6958	3.7252	0.0207
2	0.86	16.38	0.6779	4.4125	0.0222
3	0.80	17.02	0.6643	4.6489	0.0227
4	0.78	15.84	0.6598	4.2129	0.0221
5	0.78	15.34	0.6598	4.0282	0.0218

\*  $\mu$  = velocidad específica de crecimiento

#### EFFECTO DEL OXIGENO

Por medio del método de Box-Wilson se logró optimizar el medio de cultivo para el crecimiento de *R. toruloides* con la desventaja de que el tiempo de fermentación resultó ser muy largo lo cual representa una desventaja desde el punto de vista económico. Con el objeto de reducir la duración de la fermentación se efectuó un experimento colocando diferentes volúmenes de medio de cultivo óptimo en matraces Erlen-Meyer de 500 ml con el fin de determinar el efecto de la aireación sobre el crecimiento del microorganismo. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 20. Se puede observar que al aumentar la aireación, el crecimiento fue mayor (Figura 8). Esto indica, como es de esperar, que el oxígeno es un parámetro determinante para el crecimiento. En 47 horas de fermentación, con una

TABLA 20

EFFECTO DE LA AIREACION SOBRE EL CRECIMIENTO DE R. toruloides

Matraz (#)	Volumen de medio (ml)	N <sup>a</sup> (mM/hr)	DO ( $\lambda=650$ nm)			Peso Seco (g/l)			$\mu^b$ (hr <sup>-1</sup> )
			0 hrs	47 hrs	67 hrs	0 hrs	47 hrs	67 hrs	
1	25	90	0.92	18.38	23.42	0.6913	5.1514	7.0140	0.0571
2	50	50	0.94	16.96	19.74	0.6958	4.6267	5.6539	0.0563
3	75	40	0.90	16.52	19.10	0.6868	4.4642	5.4174	0.0552
4	100	30	0.94	16.44	19.08	0.6958	4.4346	5.3200	0.0547
5	200	18	0.90	16.26	18.52	0.6868	4.3681	5.2031	0.0540
6	300	13	0.98	15.80	17.88	0.7048	4.1982	4.9666	0.0539

a N = Velocidad de transferencia de oxígeno

b  $\mu$  = Velocidad específica de crecimiento

# EFFECTO DE LA AIREACION

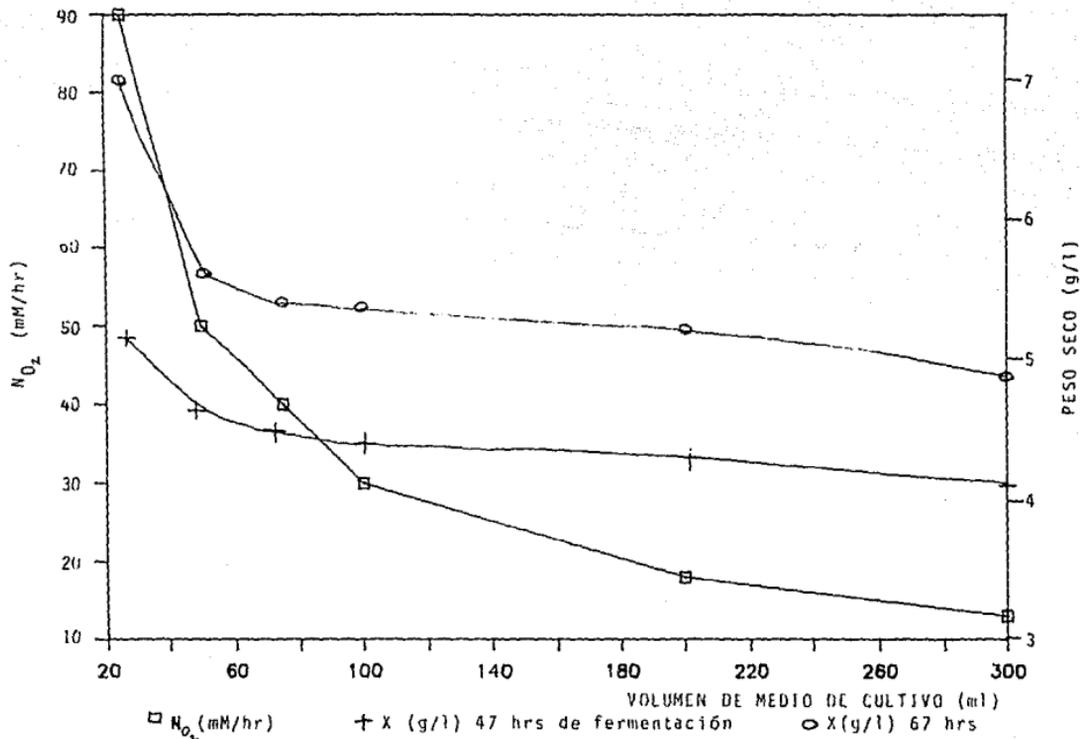


FIGURA 8

velocidad de transferencia de oxígeno de 50 mM/l hr, se lograron obtener 4.6 g/l que es el resultado logrado en 66 horas de fermentación cultivando el microorganismo bajo las condiciones establecidas para los experimentos del Box Wilson. Se logró reducir 19 horas el tiempo de fermentación.

En la Figura 9 se aprecia la relación entre la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) y la aireación. Se observa que mientras mayor es la transferencia de oxígeno, mayor es la  $\mu$ . Las velocidades específicas de crecimiento obtenidas en este experimento son aproximadamente 2.5 veces mayores que las logradas en las fermentaciones anteriores.

Al aumentar la velocidad de transferencia de oxígeno (N) se logró incrementar considerablemente el crecimiento: a las 67 horas de fermentación, con una N de de 90 mM/l hr, se obtuvieron 7.014 g de células/l de cultivo que es una concentración elevada comparándola con las obtenidas anteriormente.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se puede concluir que existen dos factores que son críticos para el crecimiento del microorganismo: por un lado, la concentración de glucosa y por otro, la aireación.

# EFFECTO DE N (mM/hr) SOBRE LA $\mu$

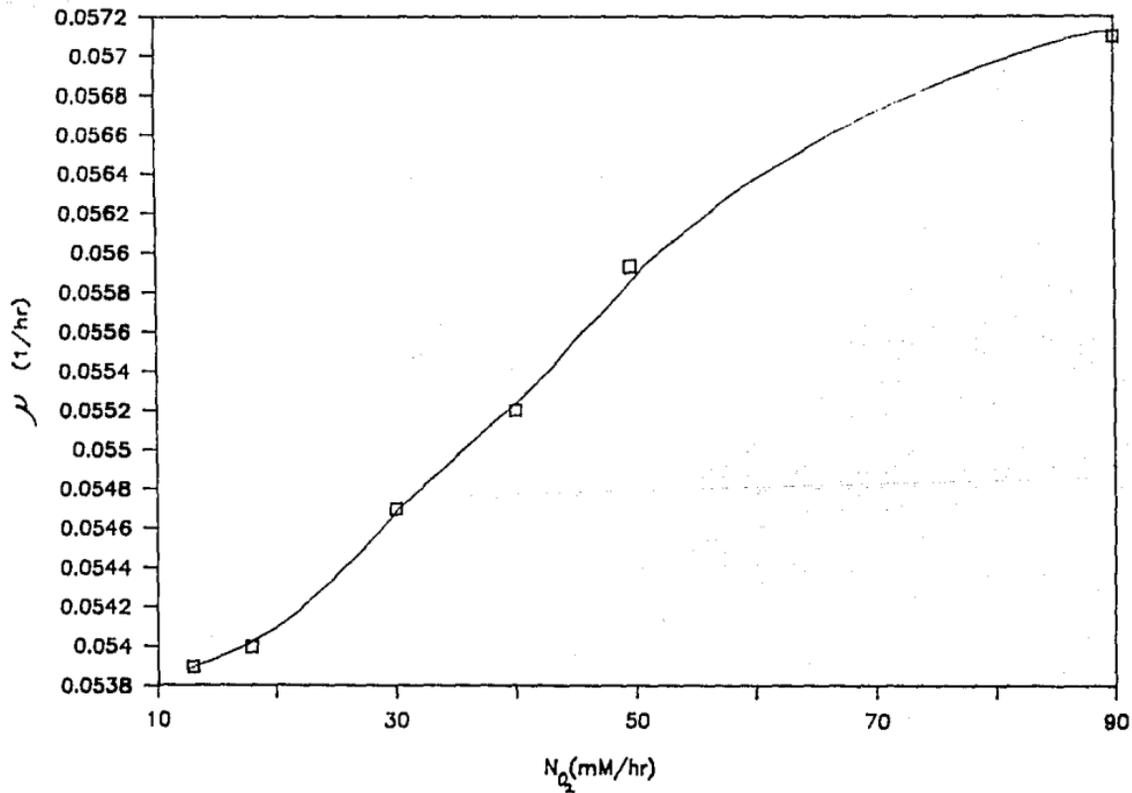


FIGURA 9

## **5.2 PRODUCCION DE LA ENZIMA FENILALANINA AMONIO-LIASA**

Como se mencionó en las generalidades la enzima fenilalanina amonio-liasa de *R. toruloides* no es constitutiva por lo que es necesario incluir alguna sustancia que funcione como inductor en el medio de cultivo. En este trabajo se añadió L-fenilalanina ya que como se demostró en la revisión bibliográfica es el inductor más eficiente. A continuación se describen los resultados obtenidos utilizando diferentes medios de cultivo.

### **5.2.1 FERMENTACIONES EN MATRAZ AGITADO**

#### **5.2.1.1 Fermentación en medio para inducción (4.2.3.3) sin tratar las células**

Se siguió la evolución de la fermentación en el medio de cultivo reportado por Hodgins y colaboradores (1971). Se determinó la DO, el pH, el peso seco y la actividad de la FAL a diferentes tiempos.

Inicialmente se utilizaron las células intactas para ensayar la actividad de la enzima. En la Tabla 21 se muestran los resultados obtenidos. Se puede apreciar que la actividad detectada fue muy baja probablemente debido a que la pared celular dificulta el paso del sustrato y/o la salida del ácido trans-cinámico que es el producto que se mide en el ensayo de actividad.

Como se mencionó en el capítulo 3 la mayoría de los investigadores rompe las células para liberar la enzima y algunos otros las permeabilizan ya sea previamente al ensayo o bien,

incluyen en la mezcla de reacción algún agente tensoactivo como por ejemplo, cloruro de cetil piridinio. Se eligió la opción de permeabilizar las células de acuerdo con el método recomendado por Gilbert y Tully (1985) empleando acetona y una centrifuga refrigerada.

TABLA 21

PRODUCCION DE LA FAL EN EL MEDIO PARA INDUCCION (4.2.3.3)

Tiempo de fermentación (horas)	pH	DO( $\lambda=650nm$ )	Peso Seco (g/l)	*Actividad $\frac{U}{g \text{ células}}$
0	5.38	0.37	0.0362	----
12	5.97	2.66	0.8389	----
14	6.01	2.80	0.8880	0.25
16	6.18	3.35	1.0807	0.26
18	6.66	3.70	1.2034	0.48
20	7.05	3.94	1.2876	0.89
22	7.25	4.07	1.3333	0.53

\* Sin tratar las células

5.2.1.2 Fermentación en el medio para inducción de la FAL (Permeabilizando las células)

Cuando se permeabilizaron las células antes de ensayar la actividad de la FAL, ésta se expresó efectivamente. En los primeros experimentos para permeabilizar se añadían 20 ml de acetona por cada 10 ml de cultivo. Se realizaron experimentos en los que se disminuyó el volumen de acetona ya que se consideró que era excesivo. Se procedió como se indicó en Materiales y

Métodos obteniendo los resultados que se muestran en la Tabla 22. Se puede observar que con 1.0 ml de acetona se obtuvo prácticamente la misma actividad que con 20.0 ml y por tanto, resulta innecesario e ineficiente el añadir dicho volumen de reactivo. El hecho de que varíen ligeramente los resultados obtenidos con las diferentes cantidades de acetona se debe probablemente a errores experimentales.

En adelante se permeabilizaron las células empleando 1.0 ml de acetona por cada 10 ml de cultivo.

TABLA 22

PERMEABILIZACION DE CELULAS CON DIFERENTES VOLUMENES DE ACETONA

Volumen de Acetona (ml)	Actividad (%)
20	100.00
10	99.89
5	99.87
3	99.96
1	99.97

\* La actividad se expresa como X respecto a la obtenida cuando se añaden 20 ml de acetona

Para verificar que no se pierde enzima durante el proceso de permeabilización, se determinó la actividad en todos los sobrenadantes. En la Tabla 23 se puede observar que es muy poca la enzima que se pierde: 1.21% de la actividad total. Sin embargo, esto no necesariamente implica que parte de la enzima intracelular salga de las células y quede en los sobrenadantes ya

que es muy probable que al separarlos de la pastilla una pequeña porción de células pase a éstos.

**TABLA 23**  
**ACTIVIDAD EN LOS SOBRENADANTES OBTENIDOS EN EL**  
**PROCESO DE PERMEABILIZACION DE CELULAS**

Muestra	% Actividad*
Células permeabilizadas	98.79
Medio de cultivo	0.15
Acetona	0.00
Primer lavado con buffer de fosfatos	1.06
Segundo lavado con buffer de fosfatos	0.00

\* Expresada como X de la actividad total

Por otra parte, se efectuó la permeabilización de las células empleando alcohol isoamílico siguiendo la técnica mencionada en Materiales y Métodos. Se comparó la actividad de la FAL en dos muestras (de 10 ml cada una) tomadas al mismo tiempo de fermentación pero permeabilizando en un caso con acetona y en el otro con alcohol isoamílico. No se encontraron diferencias significativas entre los dos métodos por lo que se concluye que es posible permeabilizar las células con cualquiera de los dos disolventes. Se consultó la toxicidad de ambos y se vió que el alcohol isoamílico es mucho mas tóxico por inhalación

que la acetona. A pesar de que es mas sencillo el procedimiento para permeabilizar con alcohol isoamílico que con acetona debido a que se manipula menos la muestra, se prefirió utilizar el segundo por ser menos tóxico y mas económico.

Se siguió la evolución de la fermentación en el medio para inducción. Para ensayar la actividad de la FAL se permeabilizaron las células. En las Tablas 24, 25, 26 y 27 se muestran los resultados obtenidos en 4 fermentaciones (I, II, III y IV, respectivamente) en el mismo medio de cultivo. Las fermentaciones I y II se efectuaron el mismo día siendo la única diferencia la cantidad de inóculo: 0.2430 g/l en la I y 0.3776 g/l en la II. Cuando se partió de un inóculo menos abundante, la máxima actividad de la FAL se presentó mas rápido: a las 15.5 hrs comparando con la fermentación II que tardó 17 hrs, y además fue aproximadamente 1 U/g células mayor en la primera.

Por otra parte, se realizaron las fermentaciones III y IV; en el caso de la III se inoculó con un cultivo conservado 64 días en refrigeración; mientras que la IV con un cultivo recién obtenido. La máxima actividad de la FAL alcanzada en ambos casos fue prácticamente la misma pero en la fermentación III tardó 18 horas en presentarse, mientras que en la IV tardó 16.5 hrs.

Con base a los resultados obtenidos, parece ser que el tiempo en que se alcanza la máxima actividad de la enzima FAL en una fermentación así como su valor dependen de la cantidad de inóculo y de su edad.

Por otra parte, se observó que a medida que avanzó la

fermentación, el cultivo cambió de color. Inicialmente era amarillo, posteriormente cambió a un color entre amarillo y anaranjado que coincidió con la máxima actividad de la FAL y después adquirió un color anaranjado bien definido cuando la actividad empezó a disminuir.

En la Fermentación I se puede apreciar que el pH aumentó considerablemente cuando se alcanzó el pico de actividad (de 6.45 a 7.28).

A manera de ejemplo, la Figura 10 ilustra la fermentación III. En las fermentaciones realizadas se observó que la máxima actividad se presentó en la fase logarítmica media a tardía o bien al inicio de la fase estacionaria coincidiendo con lo reportado por Ogata (1967), Fritz (1976), Yamada (1981), Marusich (1981) y Wick (1982).

Se obtuvo una mayor actividad (8-11.5 Unidades/g células) en el medio para inducción de la FAL que la reportada por Fritz y colaboradores (1976) (2 Unidades / g células) en el mismo medio de cultivo. El tiempo que tarda en alcanzarse la máxima actividad de la enzima de acuerdo con los autores mencionados, es de 12-14 horas, mientras que en los experimentos realizados fue de 15-18 horas variando en base al inóculo. La productividad en el caso de los autores mencionados es de 0.1538 U/g hr mientras que en nuestro caso fue de 0.5672 U/g hr. Sin embargo, la biomasa obtenida fue mucho menor (1.3-1.8 g/l cultivo) que en la reportada por Fritz (1976), que es de 12 g/l. Esta diferencia tan grande puede deberse a que el inóculo no se preparó de la misma manera

# PRODUCCION DE LA FAL EN MATRAZ AGITADO

MEDIO PARA INDUCCION

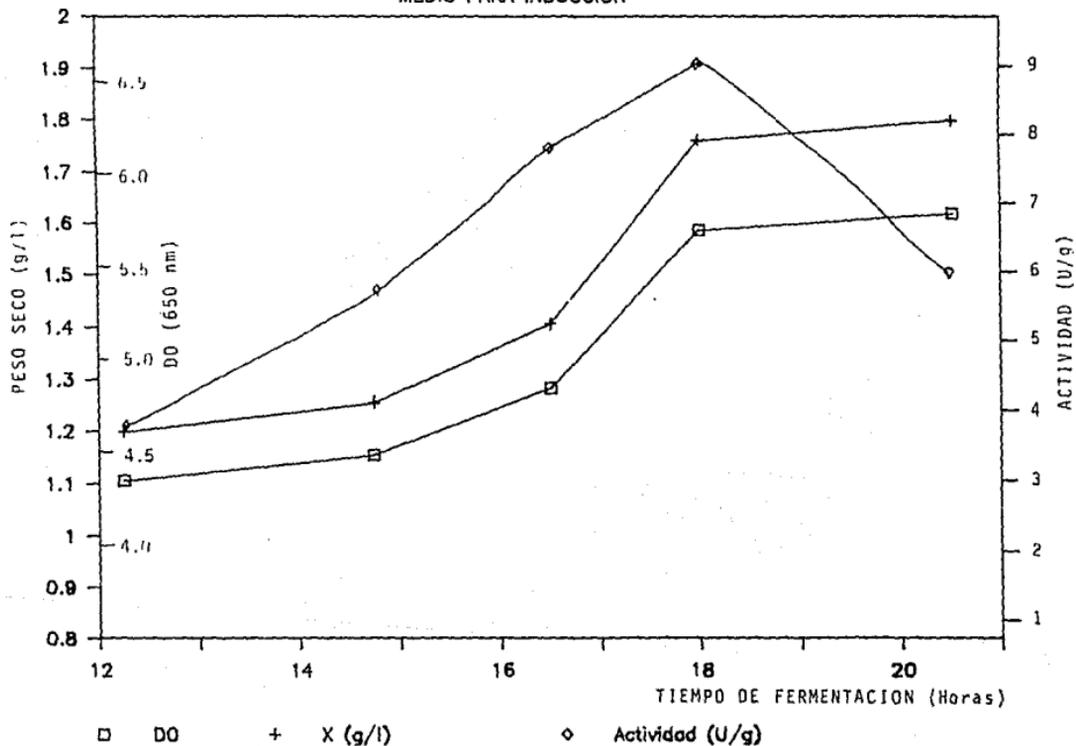


FIGURA 10

además de que las condiciones de fermentación no fueron iguales aunque el factor de mayor influencia puede ser la cepa utilizada.

Se calculó la velocidad específica de crecimiento en el medio para inducción obteniéndose un valor de  $0.045 \text{ hr}^{-1}$ .

**TABLA 24**

**PRODUCCION DE LA ENZIMA FAL. FERMENTACION I**

Inóculo: 0.24 g/l (Cultivo conservado a  $4^{\circ}\text{C}$  12 días)

Tiempo de fermentación (hrs)	pH	DO ( $\lambda = 650\text{nm}$ )	Peso Seco (g / l)	Actividad $\frac{U}{g \text{ células}}$
0	6.07	0.96	0.2430	-----
13	6.45	3.76	1.2245	7.36
15.5	7.28	4.14	1.2911	11.51
18.5	7.32	4.61	1.5224	10.23
20	7.44	5.20	1.7000	6.86
24	7.49	5.33	1.7748	3.27
26.5	7.60	5.56	1.8554	0.33

**TABLA 25**

**PRODUCCION DE LA ENZIMA FAL. FERMENTACION II**

Inóculo: 0.37 g/l (Cultivo conservado a  $4^{\circ}\text{C}$  12 días)

Tiempo de fermentación (hrs)	DO ( $\lambda = 650\text{nm}$ )	Peso Seco (g / l)	Actividad $\frac{U}{g \text{ células}}$
0	1.34	0.3776	-----
13	4.06	1.3296	6.86
15.5	4.56	1.5049	9.40
17	5.00	1.6591	10.57
18	5.33	1.7748	6.39
20	5.40	1.7993	4.60

**TABLA 26**

**PRODUCCION DE LA ENZIMA FAL. FERMENTACION III**

Inóculo: 0.73g/l (Cultivo conservado a 4°C 64 días)

Tiempo de fermentación (hrs)	DO ( $\lambda = 650nm$ )	Peso Seco (g / l)	Actividad U / g células
0	2.36	0.7338	-----
12.25	3.69	1.1999	3.72
14.75	3.85	1.2560	5.75
16.5	4.28	1.4068	7.86
18	5.29	1.7608	8.59
20.5	5.40	1.7993	6.10

**TABLA 27**

**PRODUCCION DE LA ENZIMA FAL. FERMENTACION IV**

Inóculo: 0.45 g/l (Cultivo recién obtenido)

Tiempo de fermentación (hrs)	DO ( $\lambda = 650nm$ )	Peso Seco (g / l)	Actividad U / g células
0	1.57	0.4568	-----
12.24	4.16	1.3647	3.35
14.75	4.64	1.5329	6.37
16.5	4.76	1.5750	8.39
18	5.39	1.7958	6.65
20.5	5.42	1.8239	3.31

Otros autores obtienen mayor actividad de la enzima FAL que la que se logró, utilizando medios de cultivo de diferente composición además de que la cepa es distinta. Se probaron otros medios de cultivo para intentar obtener una actividad mayor.

#### 5.2.1.3 Fermentación en medios de cultivo con L-fenilalanina como fuente única de carbono y nitrógeno.

Se siguió la evolución de la fermentación en medios de cultivo definidos con L-fenilalanina como única fuente de carbono y nitrógeno con el fin de obtener una mayor actividad de la FAL que en el medio para inducción (medio complejo), pensando en la posibilidad de que alguno de los componentes de dicho medio no fuera favorable para la producción de la enzima.

Se realizaron fermentaciones en medios de cultivo con diferentes cantidades de L-fenilalanina (0.1%, 0.4% y 1.5%). Se determinaron la DO, el peso seco y el pH durante el transcurso de la fermentación. En la Figura 11 se muestran los resultados obtenidos en términos del crecimiento. En el caso en que se usó 0.1% de L-fenilalanina a las 30 horas se lograron obtener únicamente 0.17 g células/l debido a que la concentración del nutrimento fue demasiado baja. Cuando se incluyó un 0.4% de L-fenilalanina como componente del medio de cultivo, el crecimiento fue ligeramente mayor: 0.38 g/l al tiempo antes mencionado, pero aún es muy baja la concentración de células si se compara con la que se obtiene en el medio de cultivo complejo. Con 1.5% de L-fenilalanina, se aumentó a 0.47 g/l.

# CRECIMIENTO EN MEDIOS DEFINIDOS

FERMENTACIONES EN MATRACES AGITADOS

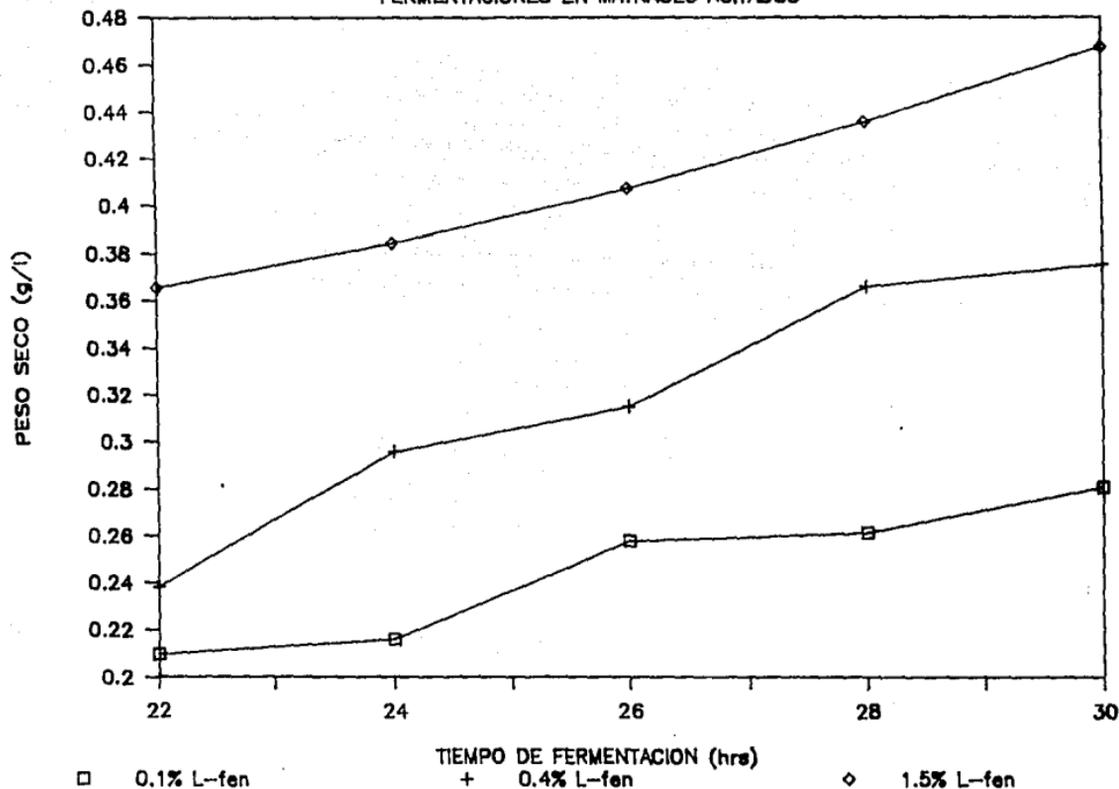


FIGURA II

A pesar de que se produce muy poca biomasa, se determinó la actividad de la FAL utilizando el medio con 1.5% de L-fenilalanina ya que fue en éste en el que se logró un mayor crecimiento del microorganismo. En la Figura 12 se presentan los resultados donde se puede observar que la máxima actividad se presentó a las 27 horas de fermentación lográndose una productividad de 0.24 U/g hr que es menos de la mitad de la obtenida en el medio para inducción. Al igual que en el medio complejo, la máxima actividad se manifestó en la fase logarítmica tardía. La actividad fue baja (6.49 Unidades/g células) en comparación con la que se obtuvo en el medio para inducción (8-11.5 Unidades/g células) además de que la cantidad de biomasa fue inferior: 1.2621 g/l en el pico de actividad. La velocidad específica de crecimiento en este medio fue de  $0.041 \text{ hr}^{-1}$  que es menor a la que se obtuvo en el medio para inducción (medio de cultivo complejo).

Como se puede apreciar en la Tabla 30, el medio de cultivo definido no ofrece ventajas con respecto al medio complejo para inducción de la FAL, ya que el tiempo de fermentación es mayor, la actividad máxima tiene un valor inferior y se obtiene menor cantidad de biomasa. Por lo tanto, fue descartado.

# PRODUCCION DE LA FAL

MEDIO CON 1.5% DE L-FENILALANINA

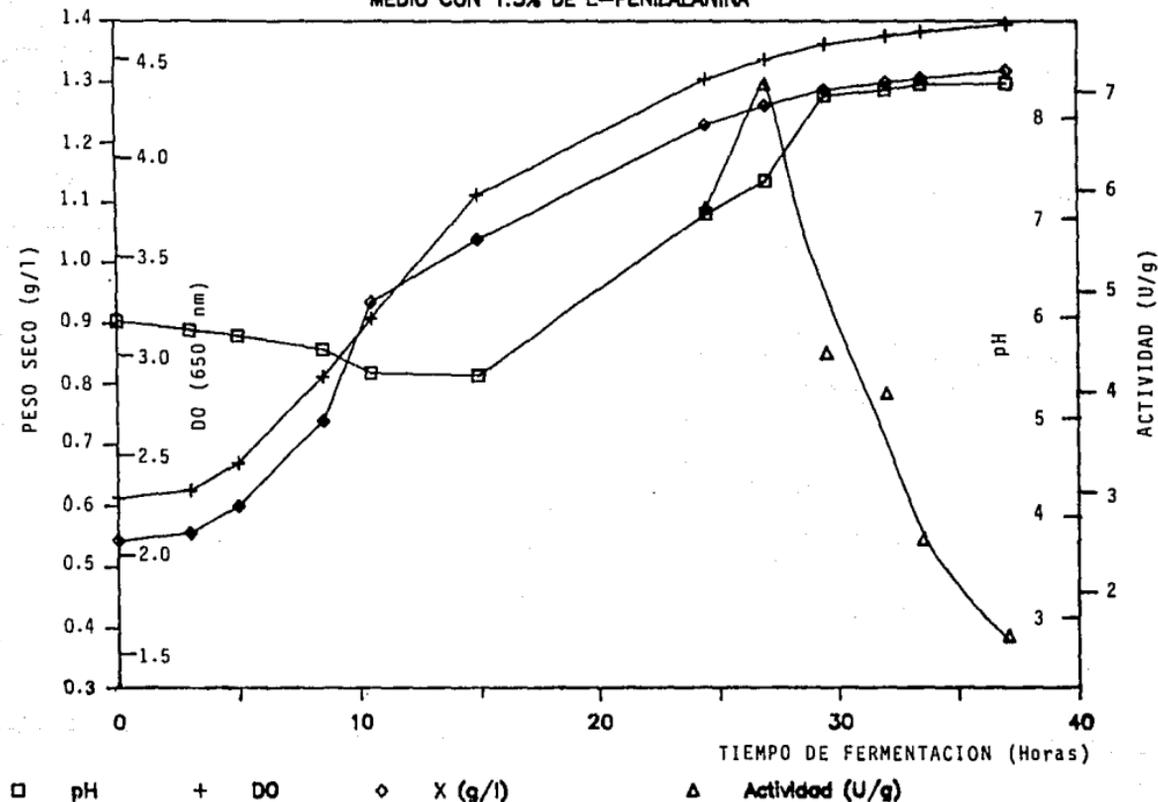


FIGURA 12

#### 5.2.1.4 Fermentación en el medio de cultivo con glucosa

Como quedó manifiesto por los resultados anteriores, en los medios definidos el microorganismo crece muy poco. Se probó el medio de cultivo óptimo para el crecimiento del microorganismo determinado por el método de Box Wilson, pero para inducir la enzima fue necesario incluir L-fenilalanina como componente del medio. Se prepararon matraces con medio de cultivo óptimo para el crecimiento de *R. toruloides* (medio 4.2.2.4) y a cada uno se le añadió diferente cantidad de inductor (de 0.1% - 1.0%). En la Tabla 28 se muestran los resultados obtenidos y en la Figura 13 se observa que al aumentar la concentración de L-fenilalanina, aumentó la actividad de la FAL, pero a partir de una concentración de 0.55% la actividad fue prácticamente la misma. Por lo tanto, se consideró dicha concentración del inductor como la óptima para inducir la FAL en este medio de cultivo.

La actividad obtenida en este medio de cultivo resultó ser muy baja en comparación con la que se obtuvo en el medio para inducción. Como las muestras que se tomaron a las 17.5 y a las 21 horas de fermentación probablemente no correspondían a la máxima actividad de la FAL, se determinó la evolución de la fermentación en el medio óptimo para el crecimiento del microorganismo incluyendo 0.55% de L-fenilalanina.

En la Tabla 29 se presentan los resultados obtenidos en el fermentación en el medio con glucosa. Se puede observar que la máxima actividad de la enzima se presentó a las 26 horas de fermentación y su valor fue menor (4.34 Unidades/g células) que el

TABLA 28

PRODUCCION DE LA FAL EN EL MEDIO CON GLUCOSA (4.2.2.4)

[L-fenilalanina] (%)	0 hrs		17 hrs			21 hrs		
	DO	X (g/l)	DO	X (g/l)	Actividad (U/g)	DO	X (g/l)	Actividad (U/g)
0.10	0.46	0.5878	3.79	1.3364	1.30	4.44	1.4825	2.07
0.25	0.50	0.5968	3.97	1.3768	1.42	4.60	1.5184	2.37
0.40	0.47	0.5901	3.92	1.3206	1.59	4.74	1.5499	2.56
0.55	0.51	0.5991	3.44	1.2577	3.57	4.22	1.4330	3.77
0.70	0.49	0.5946	3.73	1.3229	3.40	4.92	1.5904	3.69
1.00	0.49	0.5946	3.50	1.2712	3.53	4.60	1.5184	3.75

# PRODUCCION DE LA FAL EN MATRAZ AGITADO

MEDIO DE CULTIVO CON GLUCOSA

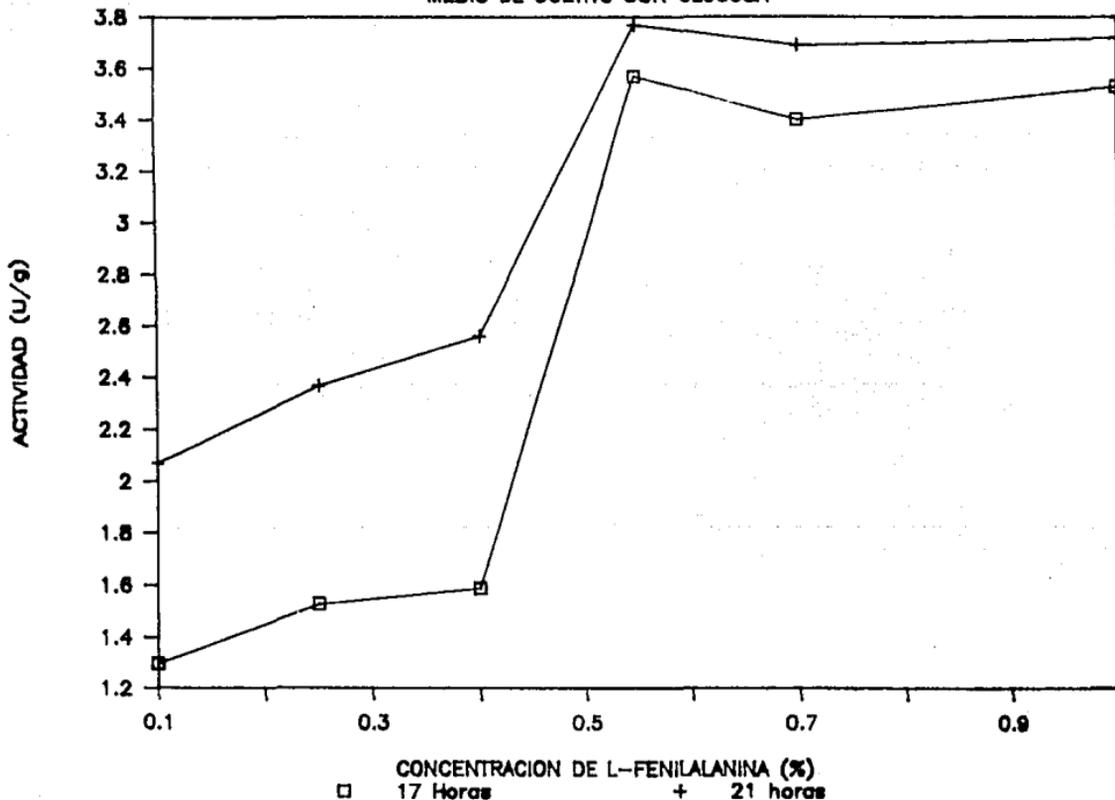


FIGURA 13

determinado en el medio para inducción (8-11.5 Unidades/g células). La productividad fue de 0.17 U/g hr y la velocidad específica de crecimiento de 0.052 hr<sup>-1</sup>. Se aumentó la cantidad de biomasa, de 1.3-1.8 g/l en el medio para inducción a 2.6 g/l en el óptimo para el crecimiento.

Se calcularon las Unidades de FAL que se obtuvieron por cada litro de cultivo en los dos medios mencionados resultando ser de 11.26 U/l en el medio óptimo de crecimiento, de 8.2 U/l en el medio con 1.5% de L-fenilalanina y de 17.54 U/l en el medio de inducción. La actividad que se obtuvo en el medio para inducción fue mayor que en los otros dos medios de cultivo que se probaron.

El medio que contiene glucosa presenta las siguientes desventajas con respecto al de inducción: El tiempo de fermentación es mayor; incluye mayor cantidad de L-fenilalanina y además incluye glucosa lo cual aumenta su costo sin que esto resulte en una mayor productividad.

Gilbert y Tully (1982) reportaron que la glucosa reprime la síntesis de la FAL; por otra parte, Orndorfi y colaboradores (1987) establecieron que es posible aumentar la biomasa si se incluye glucosa en el medio de cultivo y una vez que se agota se alimenta mas monosacárido. Comprobaron que la enzima se manifiesta hasta que se agota toda la glucosa del medio de cultivo. En base a lo establecido por Orndorfi y colaboradores fue que se diseñó el medio de cultivo óptimo para el crecimiento de *R. toruloides* y se incluyó glucosa como uno de sus componentes. Sin embargo los resultados obtenidos no fueron

satisfactorios ya que se logró una actividad muy baja.

**TABLA 29**  
**PRODUCCION DE LA FAL. MEDIO CON GLUCOSA**

Tiempo de fermentación (hrs)	DO ( $\lambda = 650nm$ )	Peso Seco (g / l)	Actividad U / g células
0	1.40	0.5631	-----
23.75	10.84	2.3655	3.77
26	11.46	2.5946	4.34
28	12.14	2.8459	4.04
30	12.20	2.8680	3.72
32	12.32	2.9124	3.63
34	12.58	3.0084	2.86

**TABLA 30**  
**COMPARACION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN DIFERENTES MEDIO DE CULTIVO (FERMENTACIONES EN MATRAZ AGITADO)**

Parámetro	Medio definido <sup>a</sup>	Medios complejos	
		Para Inducción <sup>b</sup>	Box Wilson <sup>c</sup>
Peso seco (g/l)	1.26	1.57	2.59
Máxima actividad (U/g células)	6.49	9.77	4.34
Productividad (U/g hr)	0.24	0.57	0.17
Unidades/l	8.17	15.34	11.20
$\mu$ (hr <sup>-1</sup> )	0.041	0.045	0.052

a: 1.5X L-fenilalanina y sales

b: 1X extracto de malta, 0.1X de extracto de levadura y 0.1X de L-fenilalanina

c: 2X glucosa, 0.86X de extracto de malta, 0.1X de extracto de levadura y 0.55X de L-fenilalanina

## 5.2.2 FERMENTACIONES EN EL BIO-FLO NEW BRUNSWICK

### 5.2.2.1 Medio óptimo para el crecimiento de *R. toruloides*

Se realizó una fermentación en el fermentador Bio-Flo New Brunswick de 500 ml, controlando el pH con el fin de poder apreciar si éste tiene algún efecto sobre la actividad de la FAL en el medio de cultivo que contiene glucosa. En la Tabla 31 se muestran los resultados obtenidos. El pH se controló a 6.0 con una solución 0.1 N de hidróxido de sodio evitando que disminuyera de dicho valor sin importar que el pH adquiriera valores superiores a 6.0 ya que se reporta que la enzima es estable a pH neutro así como también a pHs ligeramente alcalinos.

En la Figura 14 se puede apreciar que la máxima actividad se alcanzó a las 14 horas de fermentación en el fermentador mientras que en matraz se logró a las 26 horas. Se obtuvo mayor cantidad de biomasa (3 g/l) en la primera que en matraz agitado (2.6 g/l). La reducción del tiempo de fermentación y el aumento de biomasa se debieron seguramente a que en el fermentador fue mayor la transferencia de oxígeno, factor que como se vió anteriormente, influye positivamente en el crecimiento del microorganismo.

Se logró una productividad de 0.3728 U/g hr que es aproximadamente 2 veces superior a la obtenida cuando la fermentación se efectuó en matraz y la velocidad específica de crecimiento ( $0.0752 \text{ hr}^{-1}$ ) resultó ser 1.5 veces mayor.

Cuando se controló el pH, se obtuvo una actividad ligeramente mayor que la obtenida sin controlarlo. Sin embargo, la actividad aún fue baja en comparación con la que se logró en

# PRODUCCION DE LA FAL EN EL BIO-FLO

MEDIO CON GLUCOSA (con control de pH)

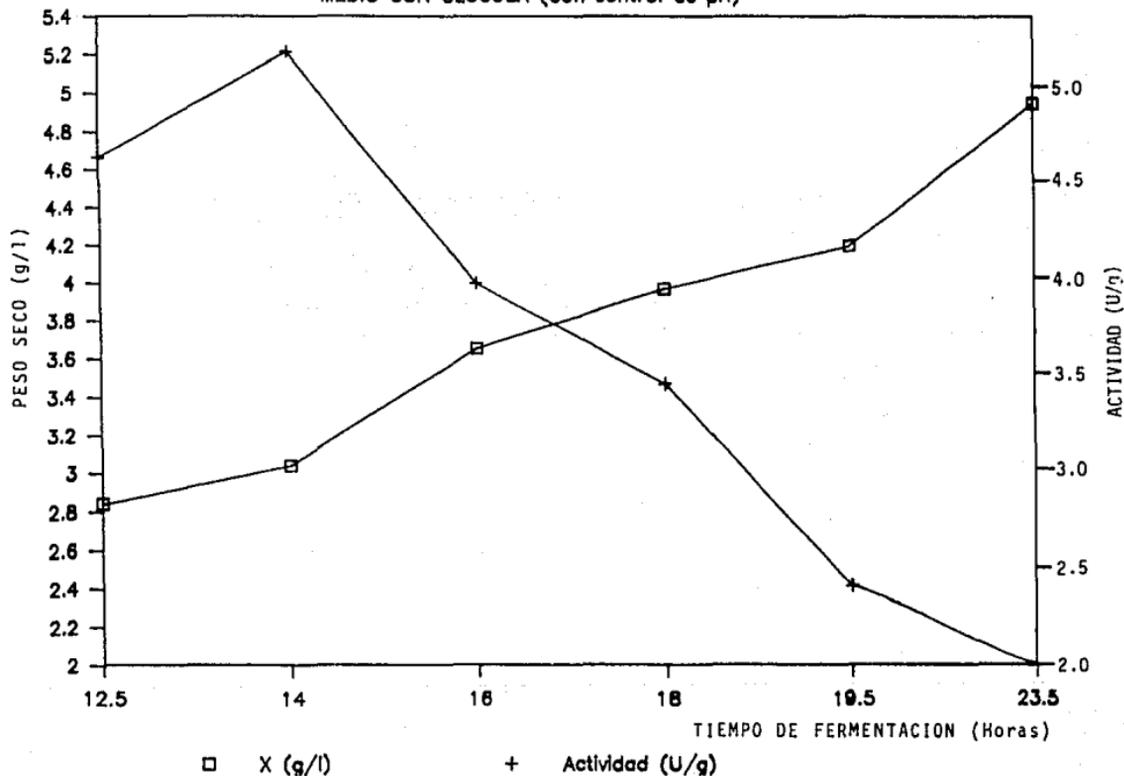


FIGURA 14

el medio para inducción de la FAL. Por esta razón, se descartó definitivamente el medio de cultivo que contiene glucosa.

**TABLA 31**

**PRODUCCION DE LA FAL EN EL MEDIO DE CULTIVO CON GLUCOSA  
FERMENTACION EN EL BIO-FLO CON CONTROL DE pH**

Tiempo de fermentación (hrs)	DO ( $\lambda = 650\text{nm}$ )	Peso Seco (g / l)	Actividad $\frac{U}{g \text{ células}}$
0	2.40	1.0262	-----
12.5	12.14	2.8459	4.67
14	12.68	3.0454	5.22
16	14.34	3.6587	4.00
18	15.18	3.9691	3.47
19.5	15.80	4.1982	2.42
23.5	17.84	4.9519	0.14

#### 5.2.2.2 Fermentación en el medio para inducción de la FAL

##### A) Fermentación sin control de pH

Se siguió el curso de la fermentación en el medio para inducción de la FAL en un fermentador de 500 ml. En la Tabla 32 se muestran los resultados obtenidos y en la Figura 15 se muestra la evolución del proceso. Durante las primeras horas el pH disminuyó a medida que el microorganismo fue creciendo; a las 10 horas de fermentación el pH aumentó considerablemente: de 3.9 a 4.4 coincidiendo con la máxima actividad de la FAL.

# PRODUCCION DE LA FAL EN EL BIO-FLO

MEDIO PARA INDUCCION (Sin control de pH)

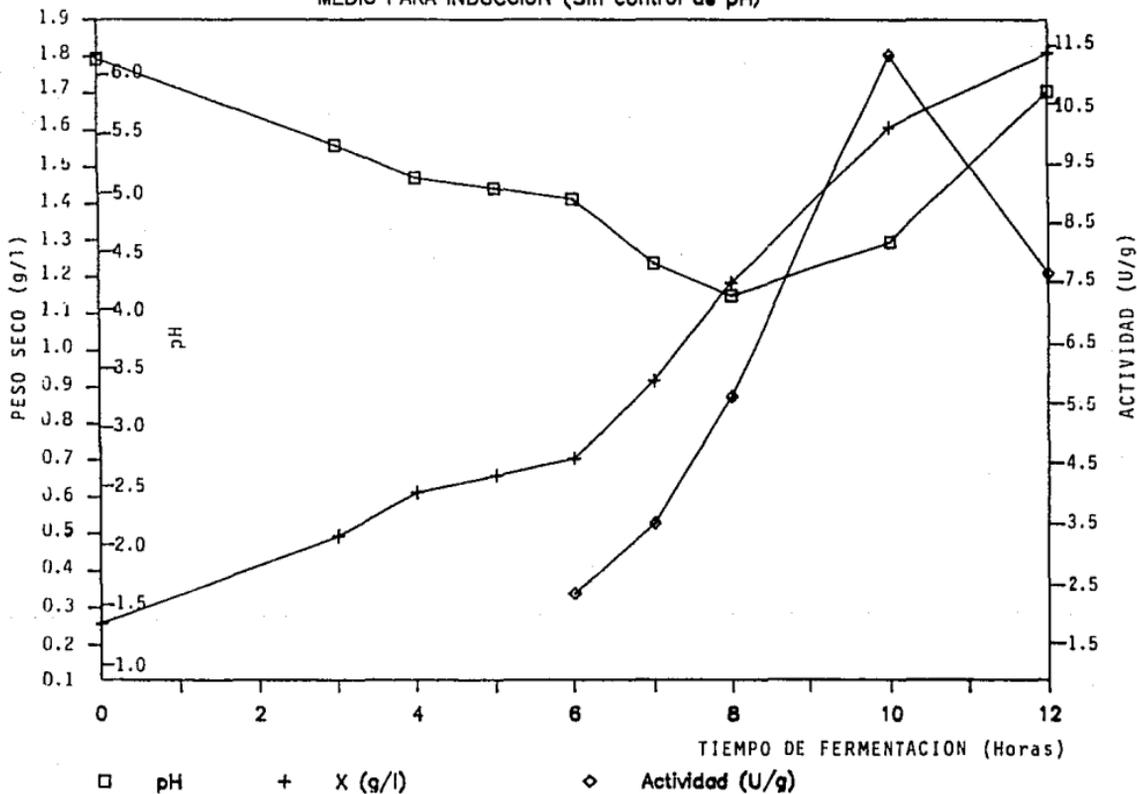


FIGURA 15

En este caso, se obtuvo prácticamente la misma cantidad de biomasa y de actividad de la FAL que en la fermentación que se realizó en matraces agitados. La ventaja lograda al utilizar el fermentador es que se redujo el tiempo de fermentación: de 15-18 horas (en matraz) a 10 horas (en fermentador) lo que implica un incremento de la productividad de 0.57 U/g hr en matraz a 1.37 U/g hr en fermentador (2.4 veces).

**TABLA 32**  
**PRODUCCION DE LA FAL EN EL MEDIO PARA INDUCCION**  
**FERMENTACION EN EL BIO-FLO SIN CONTROL DE pH**

Tiempo de fermentación (hrs)	pH	DO ( $\lambda = 650m\mu$ )	Peso Seco (g / l)	Actividad U / g células
0	6.01	0.34	0.2575	-----
3	5.3	1.67	0.4919	-----
4	5.0	2.01	0.6111	-----
5	4.9	2.14	0.5466	-----
6	4.8	2.27	0.7002	2.13
7	4.2	2.88	0.9160	3.32
8	3.9	3.98	1.1817	5.50
10	4.4	4.85	1.6065	11.37
10.5	5.5	5.00	1.6591	10.88
12	5.8	5.43	1.8098	7.61

**B) Fermentación con control de pH**

En la Tabla 33 se presentan los resultados obtenidos cuando se controló el pH evitando que disminuyera de 6.0. A medida que se

fue produciendo la enzima, el pH alcanzó valores superiores a 6.0. Debido a que el microorganismo crece preferentemente a pHs ácidos, los valores altos de pH ocasionan que el crecimiento sea más lento.

**TABLA 33**  
**PRODUCCION DE LA FAL EN EL MEDIO PARA INDUCCION**  
**FERMENTACION EN EL BIO-FLO CON CONTROL DE pH**

Tiempo de fermentación (hrs)	DO ( $\lambda = 650\text{nm}$ )	Peso Seco (g / l)	Actividad U g células
0	1.17	0.3166	-----
2	1.37	0.3867	-----
3	1.47	0.4218	-----
4	1.66	0.4884	-----
5	1.91	0.5760	-----
6	2.44	0.7618	1.57
7	2.97	0.9476	4.32
8	3.37	1.0878	11.42
9	4.16	1.3647	14.7
10	4.32	1.4208	12.95
14	5.72	1.9115	6.48
15	5.82	1.9465	5.47

En la Figura 16 se observa que la máxima actividad de la enzima FAL se alcanzó en un tiempo similar al de la fermentación sin control de pH, pero el valor obtenido fue 3 U/g mayor. En las fermentaciones realizadas en el BIO-FLO fue posible apreciar con mayor claridad los cambios de color del

cultivo al avanzar la fermentación. Al igual que en las fermentaciones en matraces, inicialmente el color el cultivo es amarillo; al alcanzar la actividad máxima, adquiere un color entre amarillo y anaranjado; y cuando la actividad comienza a disminuir cambia a un color anaranjado bien definido.

En la misma figura se puede observar que la máxima actividad de la enzima se presentó en la fase logarítmica tardía al igual que en las fermentaciones en matraces. Posteriormente, la actividad disminuyó probablemente debido al ataque de las enzimas proteolíticas que se liberan cuando las células se lisan al inicio de la fase estacionaria.

El hecho de que la FAL se manifieste en la fase logarítmica tardía implica que el microorganismo consume otras fuentes de carbono y nitrógeno del medio de cultivo de mas fácil asimilación y no es sino hasta que se agotan que se utiliza la L-fenilalanina.

En esta fermentación la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) fue de  $0.2174 \text{ hr}^{-1}$  que es inferior a la obtenida cuando no se controló el pH, sin embargo, la productividad fue mayor en este caso ( $1.63 \text{ U/g hr}$ ). La productividad en el fermentador fue aproximadamente 3 veces mayor que la lograda en matraces y la  $\mu$  también fue considerablemente más alta.

Comparando los resultados obtenidos cuando se utilizó el medio óptimo para el crecimiento del microorganismo con los logrados con el medio para inducción de la FAL, se puede observar, que la actividad máxima en el segundo fue

aproximadamente 3 veces mayor que en el primero (cuando se controló el pH). Además, el tiempo que tarda en alcanzarse la máxima actividad fue 5 horas menor en el medio para inducción representando una ventaja desde el punto de vista económico.

En la Figura 17 se comparan la actividad y el crecimiento en el medio con glucosa con los obtenidos en el medio para inducción de la FAL (con control de pH y sin controlarlo). Se puede apreciar que este último medio de cultivo es el más conveniente para producir la enzima FAL debido a que se logra una mayor productividad y además requiere menor cantidad de L-fenilalanina.

En el medio para inducción se detectó actividad de la enzima a partir de las 6 horas de fermentación, coincidiendo con lo reportado por Fritz y colaboradores (1976). Dichos investigadores establecieron que la máxima actividad se presenta entre las 12 y 14 horas de fermentación, mientras que en este caso se presentó a las 10 horas cuando no se controló el pH y a las 9 horas en el caso que se controló. En cuanto a la actividad de la FAL, se obtuvo un valor aproximadamente 6 veces mayor que el reportado por los autores mencionados y la productividad fue 9 veces superior a la obtenida por Fritz (1976) (0.15 U/g hr) probablemente debido a que se utilizaron cepas diferentes y que las condiciones de fermentación no fueron iguales.

# PRODUCCION DE LA FAL EN EL BIO-FLO

MEDIO PARA INDUCCION (Con control de pH)

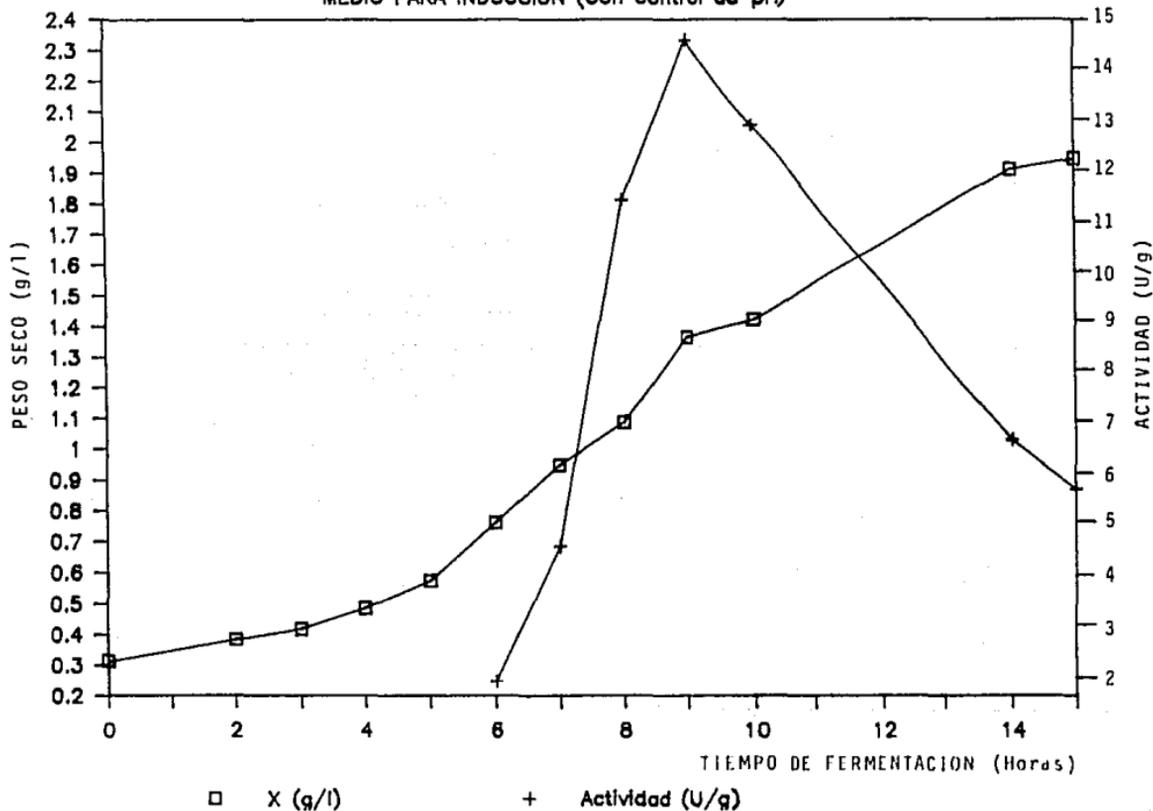
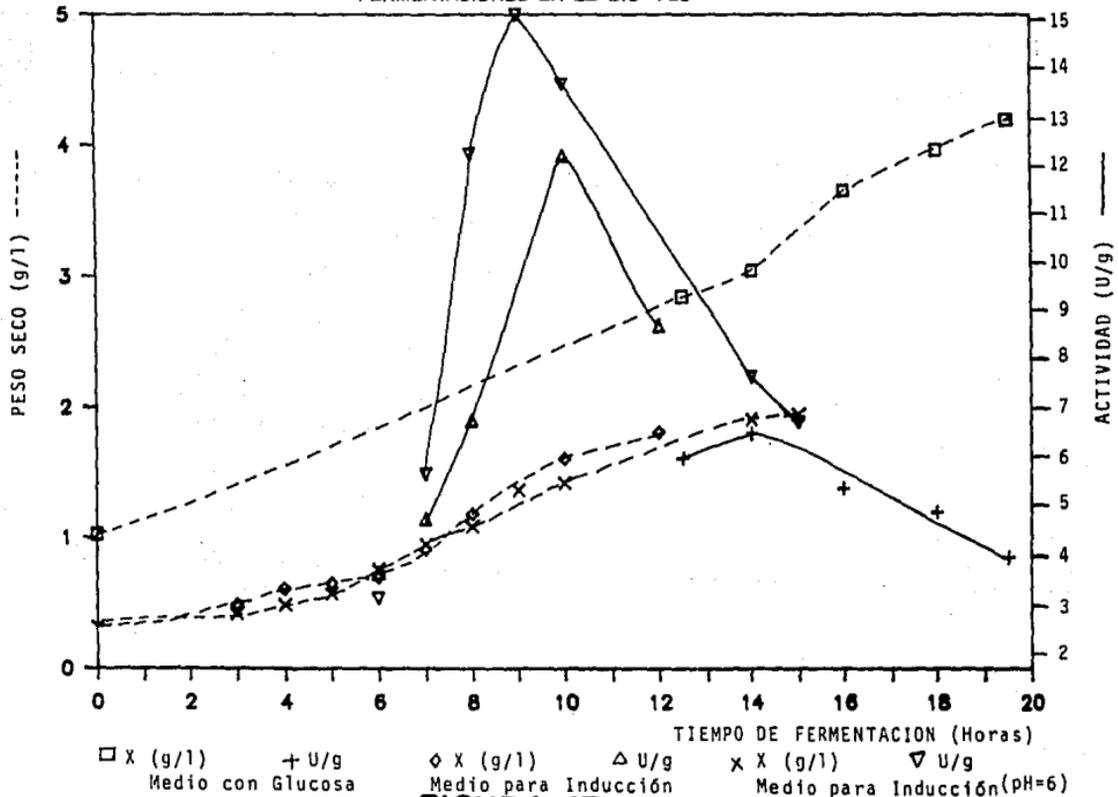


FIGURA 16

# COMPARACION DE RESULTADOS

FERMENTACIONES EN EL BIO-FLO



**FIGURA 17**

En la Tabla 34 se comparan los resultados obtenidos en las fermentaciones realizadas en el BIO-FLO. Se puede apreciar que el medio de cultivo más conveniente para producir la enzima FAL es el de inducción reportado por Hodgins y colaboradores (1971) controlando el pH a un valor de 6.0 ya que es con el que se logra obtener la mayor productividad. Comparando los resultados de la Tabla 30 con los de la Tabla 34 se aprecia que en las fermentaciones en el BIO-FLO se logró incrementar la productividad, la velocidad específica de crecimiento y la actividad de la enzima FAL con respecto a las fermentaciones en matraces agitados.

**TABLA 34**  
**COMPARACION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LAS**  
**FERMENTACIONES EN EL BIO-FLO**

Parámetro	Medio con glucosa <sup>a</sup>	Medio para Inducción <sup>b</sup>	
		Sin control de pH	Con Control de pH
Peso seco (g/l)	3.05	1.61	1.36
Máxima actividad (U/g células)	5.22	11.37	14.70
Productividad (U/g hr)	0.37	1.37	1.63
Unidades/l	15.92	18.30	19.99
$\mu$ (hr <sup>-1</sup> )	0.075	0.25	0.22

a: 2% glucosa, 0.86% extracto de malta, 0.1% extracto de levadura, 0.55% L-fenilalanina

b: 1% extracto de malta, 0.1% extracto de levadura, 0.1% de L-fenilalanina

### 5.3 MUTACION QUIMICA DE *R. toruloides* (Cepa de Colección)

Debido a que en muchas de las publicaciones relacionadas con la FAL de *R. glutinis* se reporta que se obtienen actividades superiores a la lograda en los experimentos realizados, se intentó obtener una o más mutantes hiperproductoras de la FAL tratando con nitrosoguanidina la cepa de colección de *Rhodospiridium toruloides*. A continuación se describen los resultados obtenidos.

Una vez realizado el tratamiento con nitrosoguanidina exponiendo durante diferentes tiempos un cultivo del microorganismo, se incubaron los cultivos en cajas Petri con medio conteniendo L-fenilalanina como única fuente de carbono y nitrógeno hasta que se desarrollaron las colonias y posteriormente se contaron. En la Tabla 35 se puede observar que al aumentar el tiempo de exposición al agente mutagénico, fue menor la cantidad de microorganismos sobrevivientes como era de esperarse.

Debido a que el número de sobrevivientes fue muy alto incluso cuando se expuso el cultivo durante 50 minutos al agente mutagénico, fue necesario seleccionar algunas colonias que pudieran ser hiperproductoras ya que era imposible ensayar la actividad de todas las cepas.

Para efectuar la selección se procedió como se indicó en Materiales y Métodos. Se pensó utilizar medios de cultivo sólidos con L-fenilalanina y con un indicador de pH ya que al producirse la enzima FAL se alcaliniza el medio y por lo tanto se esperaba

observar un vire del indicador. Las colonias que produjeran el vire en menor tiempo, podrían ser hiperproductoras de la enzima. Antes de inocular todas las colonias sobrevivientes se hizo una prueba con cuatro sembrándolas en los medios de cultivo sólidos mencionados.

En el medio de cultivo con rojo de fenol no se pudo detectar el vire de rojo a amarillo pues el rango de pH al que se presenta es alto y el microorganismo tardaría mucho tiempo en poder producir una cantidad suficiente de enzima para alcalinizar el medio de cultivo y provocar el vire de color, por lo que se descartó este medio de selección.

Se probó otro indicador: azul de bromotimol cuyo rango de vire es más bajo que el del rojo fenol. En este caso se presentó el problema de que al alcalinizarse el medio, el cambio de color era total, es decir, no se formaba un halo alrededor de las colonias sino que toda la caja Petri se modificaba. Debido a que este medio no permitía saber cuáles colonias producían más rápido la enzima se descartó.

Ante la dificultad para definir una técnica de selección de posibles mutantes se optó por realizar la selección considerando que las colonias de mayor tamaño desarrolladas en agar con L-fenilalanina, podrían ser hiperproductoras.

Se eligieron las 4 colonias de mayor tamaño y se siguió el curso de la fermentación en dos medios de cultivo: por una parte el medio definido con 1.5% de L-fenilalanina como única fuente de carbono y nitrógeno y por otra el medio complejo para inducción.

**TABLA 35**  
**MUTACION CON NITROSOGUANIDINA**

Tiempo de exposición (min)	No. microorganismos ml	Sobrevivientes (%)
0	$605 \times 10^5$	10.00
10	$461 \times 10^5$	76.24
20	$178 \times 10^5$	29.54
30	$45 \times 10^5$	7.49
40	$35 \times 10^5$	5.86
50	$24 \times 10^5$	4.12

La cepa A se seleccionó de la caja de Petri correspondiente a un tiempo de exposición de 50 minutos, dilución  $10^{-5}$ ; la cepa B del tiempo 40 minutos, dilución  $10^{-5}$ ; la cepa C del tiempo 40 minutos, dilución  $10^{-6}$  y la cepa D del tiempo 30 minutos, dilución  $10^{-6}$ .

En las Tablas 36 y 37 se muestran los resultados obtenidos. Se puede observar que en ambos medios de cultivo la máxima actividad de la FAL lograda por cada una de las posibles mutantes fue menor en comparación con la obtenida cuando se utilizó la cepa de colección. En el medio para inducción, el crecimiento de las posibles mutantes fue mucho más lento que el de la cepa original; el tiempo de fermentación fue mayor y la actividad máxima fue ligeramente inferior. En el medio con 1.5% de L-fenilalanina el tiempo de fermentación fue similar, la cantidad de biomasa correspondiente al tiempo en que se alcanzó la máxima

actividad fue menor que en el caso de la cepa original y su valor fue aproximadamente 50% del obtenido con la cepa de colección en el mismo medio de cultivo.

**TABLA 36**  
**PRODUCCION DE LA FAL EN EL MEDIO CON 1.5% DE L-FENILALANINA**  
**FERMENTACION EN MATRAZ AGITADO**  
**CEPAS A, B, C Y D**

Tiempo de fermentación(hrs)	CEPA A		CEPA B		CEPA C		CEPA D	
	X <sup>a</sup>	U/g <sup>b</sup>	X	U/g	X	U/g	X	U/g
0	0.2641	----	0.2990	----	0.3435	----	0.2990	----
22	0.5771	1.78	0.7917	3.08	0.8330	2.67	0.7440	2.07
25	0.5810	2.12	0.8394	3.91	0.8679	2.91	0.7776	2.85
27	0.6726	3.65	0.8818	2.84	0.8902	3.67	0.8235	3.03
30	0.7427	1.62	0.9806	1.45	0.9792	1.76	0.8489	1.08

a X = Peso seco (g células / l medio de cultivo)

b U/g = Actividad de FAL (Unidades / g células)

Con base en los resultados obtenidos se concluye que las cepas aisladas no resultaron ser hiperproductoras de la FAL sino que por el contrario, el tratamiento mutagénico afectó su crecimiento haciéndolo más lento que el de la cepa de colección.

**TABLA 37**  
**PRODUCCION DE LA FAL EN EL MEDIO PARA INDUCCION**  
**FERMENTACION EN MATRAZ AGITADO**  
**CEPAS A, B, C Y D**

Tiempo de fermentación(hrs)	CEPA A		CEPA B		CEPA C		CEPA D	
	X <sup>a</sup> (g/l)	U/g <sup>b</sup>	X (g/l)	U/g	X (g/l)	U/g	X (g/l)	U/g
0	0.0397	----	0.0274	----	0.3435	----	0.2990	----
22	1.1298	7.37	1.3436	8.20	1.2086	6.39	1.5329	6.55
24	1.1754	9.53	1.4243	8.90	1.4067	7.88	1.5758	8.38
26	1.3712	8.62	1.5119	6.63	1.4278	9.83	1.6301	6.49
28	1.5329	7.42	1.5575	4.81	1.6871	7.81	1.7012	4.99

a X = Peso seco (g células / l medio de cultivo)

b U/g = Actividad de FAL (Unidades / g células)

Es evidente que cualquier programa de obtención de mutantes requiere de un método de selección adecuado o bien, probar miles de las cepas obtenidas además de que es baja la probabilidad de obtener un sobreproductor. Considerando los objetivos de este trabajo con *R. toruloides*, se decidió abandonar la búsqueda de mutantes con el fin de caracterizar la enzima de la cepa de colección.

## **5.4 CARACTERIZACION DE LA ENZIMA FAL DE *Rhodosporidium toruloides***

### **5.4.1 ESTABILIDAD DE LA FAL DURANTE EL ALMACENAMIENTO**

Se almacenaron las células permeabilizadas de *Rhodosporidium toruloides* bajo diferentes condiciones con el fin de poder mantener su actividad el mayor tiempo posible para disponer de la enzima y poder utilizarla posteriormente.

A continuación se describen los resultados obtenidos.

#### **5.4.1.1 Almacenamiento en buffer de fosfatos a 4°C**

Las células permeabilizadas y suspendidas en buffer de fosfato de potasio 0.05M, pH=7.4 con 0.85% de cloruro de sodio, se almacenaron a 4°C. En la Figura 18 se puede observar que la enzima FAL no es estable bajo esta condición de almacenamiento. La actividad disminuyó rápidamente: en seis días perdió casi el 50% y en 12 días el 97%. Debido a que la enzima conservó su actividad muy poco tiempo bajo las condiciones mencionadas, se hicieron modificaciones con el fin de conservarla por períodos más prolongados.

#### **5.4.1.2 Almacenamiento en buffer de fosfatos a 4°C en atmósfera de nitrógeno**

Se almacenaron las células bajo las mismas condiciones que en 5.4.1.1 pero burbujeando nitrógeno cada vez que se abrió el recipiente que contenía las células permeabilizadas con el objeto de disminuir la cantidad de oxígeno en el medio ya que según Evans y colaboradores (1987) y Finkelman y colaboradores (1986),

la estabilidad de la FAL aumenta bajo dicha condición. En la Figura 18 se muestran los resultados obtenidos. Se puede apreciar que en presencia de nitrógeno aumentó ligeramente la estabilidad de la enzima ya que aún a los 16 días de almacenamiento presentó actividad. En este caso las células se estabilizaron durante un tiempo mayor pero a pesar de que la concentración de oxígeno se mantuvo baja, la actividad fue muy inestable. Debido a que un tiempo de vida media de 10 días imposibilita cualquier aplicación comercial de la enzima se probaron otras condiciones de almacenamiento para conservarla durante períodos mayores.

#### 5.4.1.3 Almacenamiento en buffer de fosfatos con 20% de glicerol 4°C sin nitrógeno y con nitrógeno

Se adicionó 20% de glicerol a las células permeabilizadas y suspendidas en buffer de fosfatos ya que Evans y colaboradores (1987) reportaron que los alcoholes polihidroxilicos ayudan a estabilizar la enzima FAL. En la Figura 19 se muestran los resultados obtenidos. Es evidente que la presencia de 20% de glicerol estabilizó la enzima contenida dentro de las células de *R. toruloides* ya que el tiempo de vida media se incrementó de tan solo unos días a 2.5 meses.

En la misma Figura se puede apreciar que sin nitrógeno la vida media fue de 43 días, mientras que en presencia de dicho gas fue de 84 días.

# ESTABILIDAD DURANTE EL ALMACENAMIENTO

BUFFER DE FOSFATOS (4°C)

pH = 7.4

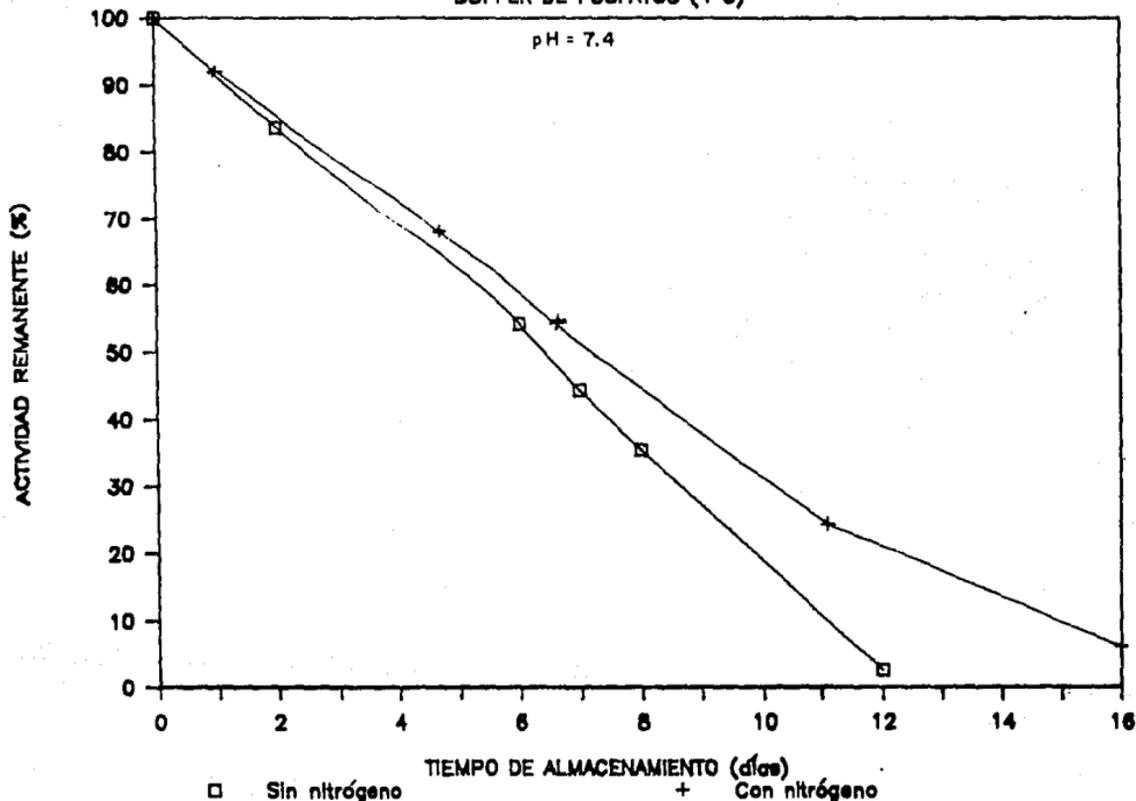


FIGURA 18

#### 5.4.1.4 Almacenamiento en buffer de fosfatos con 30% y 50% de glicerol a 4°C en atmósfera de nitrógeno

Se aumentó la concentración de glicerol a 30% y 50% con el fin de poder conservar la actividad de la enzima FAL durante periodos más prolongados.

En la Figura 19 se compara la estabilidad de la FAL almacenándola suspendida en buffer de fosfatos en presencia de tres concentraciones diferentes de glicerol. Se observa que el mejor resultado se obtuvo almacenando en buffer de fosfato de potasio 0.05M, pH=7.4 con 0.85% de cloruro de sodio, adicionando 30% de glicerol y en atmósfera de nitrógeno ya que se logró mantener una actividad superior al 90% durante 85 días y el tiempo de vida media fue mayor de 116 días. Por lo tanto, el medio antes mencionado es el más conveniente para conservar la enzima en suspensión.

Sorprendentemente con 50% de glicerol la enzima se desactivó más rápido que con 30% lo cual no tiene una explicación clara a menos que en el experimento se haya incurrido en algún error como podría ser la contaminación de la muestra.

Para verificar que el glicerol no interfiere en el ensayo de actividad de la FAL se dividió una muestra de células permeabilizadas en dos partes: una se suspendió en buffer de fosfatos y la otra en el mismo buffer pero con 30% de glicerol. Se determinó la actividad como se indicó en Materiales y Métodos observando que no hubo diferencia significativa entre los resultados obtenidos indicando que el glicerol no interfiere en la determinación de actividad de la enzima.

# ESTABILIDAD DURANTE EL ALMACENAMIENTO

BUFFER DE FOSFATOS CON GLICEROL (4°C)

pH = 7.4

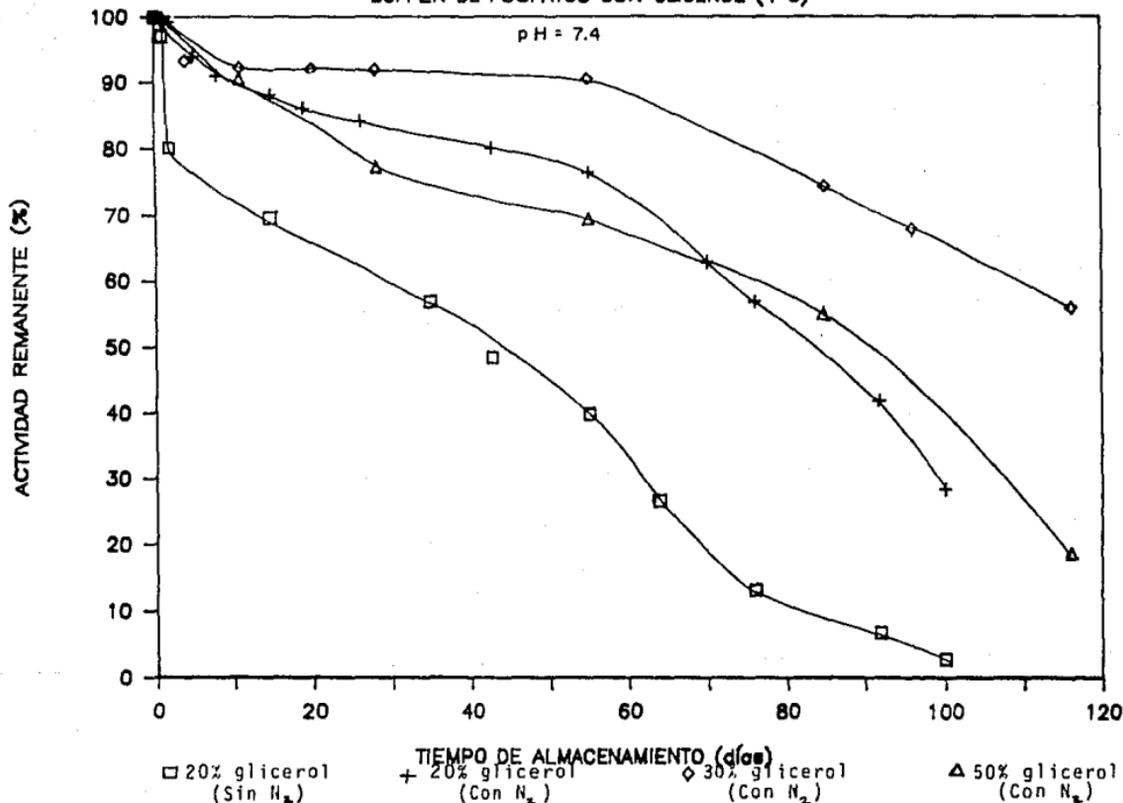


FIGURA 19

#### 5.4.1.5 Secado de las células permeabilizadas

Con el objeto de incrementar el tiempo de vida media de la enzima durante el almacenamiento, se procedió a secar las células después permeabilizarlas, en una estufa con vacío. En la Tabla 38 se presentan los resultados obtenidos. Se observa que la enzima es muy estable si se le conserva en forma seca dentro de un desecador ya que después de 171 días de almacenamiento aún conserva el 43% de actividad con respecto a la inicial.

TABLA 38  
ESTABILIDAD DE LAS CELULAS SECADAS AL VACIO  
Y ALMACENADAS A TEMPERATURA AMBIENTE

Tiempo de Almacenamiento (días)	Actividad Unidades/g células	Actividad Remanente (%)
0	2.14	100.00
3	2.13	99.53
7	1.81	84.58
9	1.76	82.24
20	1.52	71.03
43	1.33	62.15
65	1.20	56.07
81	1.17	54.67
171	0.92	42.99

La desventaja de este método es que al someter las células al secado, la actividad disminuye considerablemente: de 5.7 Unidades/g células a 2.14 Unidades/g células, es decir, un 62%.

A pesar de que se mantiene un nivel alto de actividad durante más de 4 meses, este método no resultó conveniente debido a la pérdida de actividad durante el secado. En un primer experimento, se secó a 40°C con vacío y se pensó que probablemente la temperatura utilizada había sido alta y que se había inactivado parcialmente la enzima. Se hizo un segundo experimento secando a una temperatura de 30°C, pero el resultado obtenido fue el mismo.

Probablemente si se adicionaran adyuvantes durante el secado, (por ejemplo, lactosa, sólidos de maíz, entre otros) se podría mejorar la eficiencia del proceso.

#### 5.4.1.6 Liofilización de las células permeabilizadas

En base al experimento anterior, se observó que la actividad de la FAL se conserva durante períodos largos si se mantiene en forma seca. Una alternativa al secado en una estufa con vacío es la liofilización. Debido a que en este último procedimiento se mantuvieron las células a una temperatura inferior a 4°C, no hubo pérdida de actividad de la enzima. En la Tabla 39 se presentan los resultados obtenidos. Se puede observar que la vida media de la enzima fue superior a los dos meses y medio, al igual que en el caso en que las células se secaron en una estufa con vacío, pero con la ventaja mencionada anteriormente.

Comparando los resultados de las Tablas 38 y 39, se observa que la estabilidad de la enzima seca y de la liofilizada conservadas a temperatura ambiente resultó ser muy similar; pero

a 4°C aumentó el tiempo de vida media. Se puede concluir que el proceso de secado no influye en la estabilidad de la enzima seca, pero sí ocasiona una pérdida de actividad considerable.

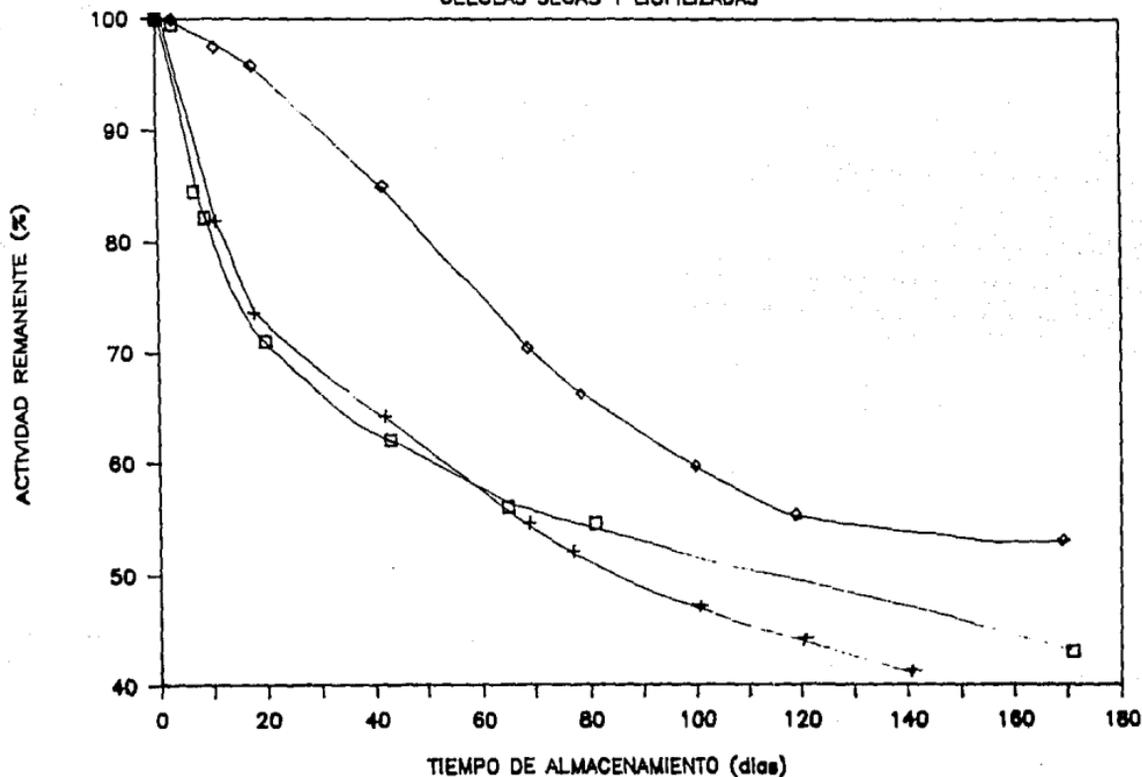
En la Figura 20 se compara la estabilidad de la enzima seca y de la liofilizada almacenada a las dos temperaturas antes mencionadas. Se observa que se logró la mayor estabilidad de la enzima conservándola en forma liofilizada a 4°C.

**TABLA 39**  
**ESTABILIDAD DE LA ENZIMA LIOFILIZADA DURANTE EL ALMACENAMIENTO**  
**A TEMPERATURA AMBIENTE Y A 4°C**

Tiempo de Almacenamiento (días)	T = Ambiente		T = 4°C	
	Actividad Unidades/g células	Actividad Remanente (%)	Actividad Unidades/g células	Actividad Remanente (%)
0	9.64	100.00	9.64	100.00
3	9.64	100.00	9.64	100.00
11	7.90	81.95	9.40	97.51
18	7.10	73.65	9.24	95.85
42	6.20	64.32	8.20	85.06
69	5.27	54.66	6.79	70.44
77	5.02	52.12	6.00	62.24
97	4.63	48.03	5.83	60.48
118	4.41	45.75	5.58	57.88
139	4.04	41.91	5.23	54.25

# ESTABILIDAD DURANTE EL ALMACENAMIENTO

CELULAS SECAS Y LIOFILIZADAS



□ Células secas (T=ambiente) + Células liofilizadas (T=ambiente) ◇ Células liofilizadas (T=4°C)

FIGURA 20

En la Tabla 40 se compara la estabilidad de la enzima FAL almacenada bajo diferentes condiciones. Se observa que la mejor condición para conservar la enzima FAL contenida dentro de las células permeabilizadas de *R. toruloides* es en forma liofilizada almacenándola a 4°C, o bien, en suspensión en buffer de fosfato de potasio con 30% de glicerol con concentraciones bajas de oxígeno almacenando a 4°C.

**TABLA 40**  
**COMPARACION DE LA ESTABILIDAD DE LA FAL**  
**BAJO DIFERENTES CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO**

Condición de almacenamiento	Tiempo de vida media (días)	Tiempo de vida media (días)
	T=ambiente	T = 4°C
Buffer de fosfatos <sup>a</sup>	nd <sup>b</sup>	6
Buffer de fosfatos, atmósfera de N <sub>2</sub>	nd	10
Buffer de fosfatos con 20% glicerol	nd	43
Buffer de fosfatos con 20% glicerol en atmósfera de nitrógeno	nd	84
Buffer de fosfatos con 30% glicerol en atmósfera de nitrógeno	nd	116
Buffer de fosfatos con 50% glicerol en atmósfera de nitrógeno	nd	85
Células secadas en estufa con vacío	81	nd
Células liofilizadas	77	139

a: Buffer de fosfato de potasio 0.05M, pH=7.4 con 0.85% de cloruro de sodio

b: nd = No se determinó

## 5.4.2 CARACTERIZACION DE CINETICA DE LA FAL

### 5.4.2.1 Efecto del pH sobre la actividad de la FAL

Con el fin de determinar el efecto del pH sobre la actividad de la enzima se procedió como se indicó en Materiales y Métodos obteniendo los resultados que se muestran en la Figura 21. Se observa que a pHs menores de 7 la actividad de la enzima es baja en comparación con la que presenta a pHs superiores. Dentro del rango de  $\text{pH} = 7.5$  a  $10.5$  la actividad es mayor del 50% respecto a la obtenida en el pH óptimo que resultó ser de  $9.0$  lo cual indica que la FAL es una enzima alcalina. Wieder y colaboradores (1979) reportaron que el pH óptimo es de  $8.5$ . La diferencia probablemente se debe a que el ensayo para determinarlo se realizó de diferente manera, a que no se utilizó el mismo tipo de buffer para mantener el pH constante durante el ensayo o bien, a diferencias entre las cepas utilizadas. En nuestro caso se trabajó con células con actividad de FAL que se permeabilizaron y no con la enzima libre como en el caso de Wieder y colaboradores y probablemente es por esta razón que la máxima actividad se presentó a un pH superior al reportado.

De estos resultados es posible suponer que podría mejorarse la estabilidad de la enzima si se almacenara a un pH entre  $8.5$  y  $9.0$  en los experimentos mencionados anteriormente.

# EFEECTO DEL pH SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA FAL

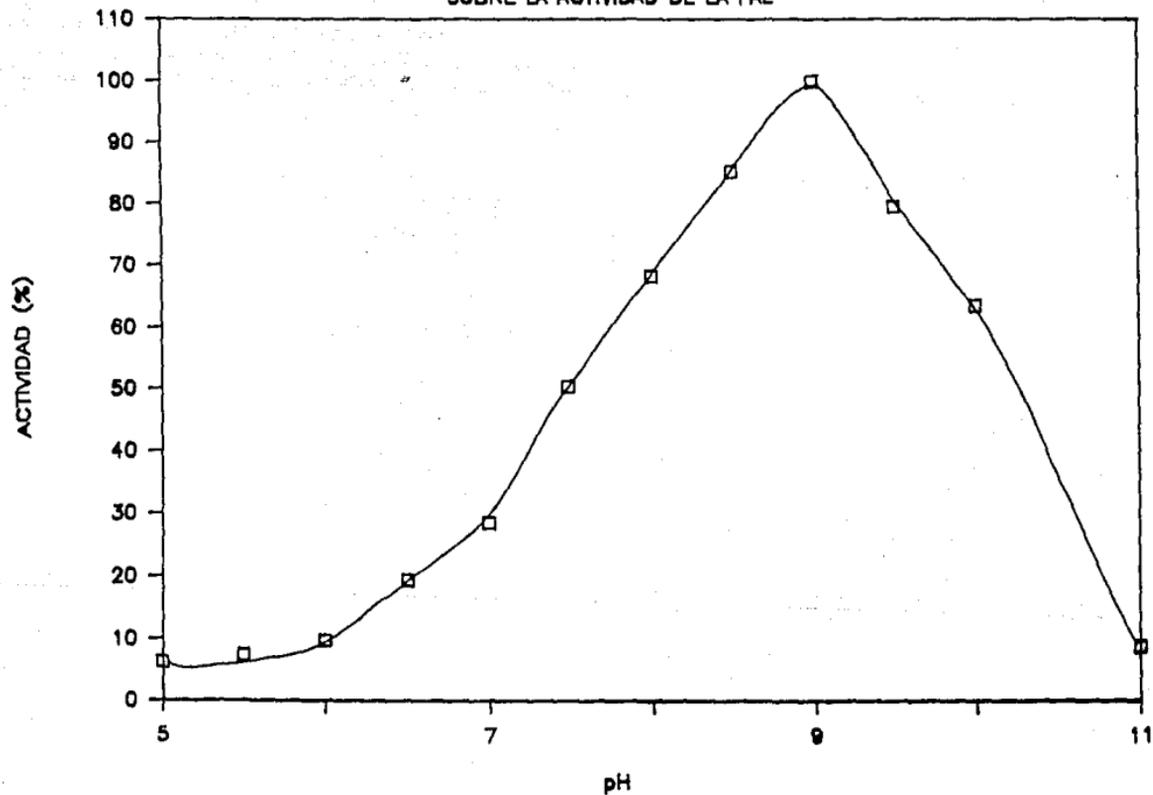


FIGURA 21

#### 5.4.2.2 Efecto de la temperatura sobre la actividad de la FAL

Se determinó la actividad de la enzima a diferentes temperaturas. En la Figura 22 se presentan los resultados obtenidos. Se observa que entre 40 y 60°C la actividad es superior al 60% con respecto a la máxima y entre 50 y 55°C es mayor del 90%.

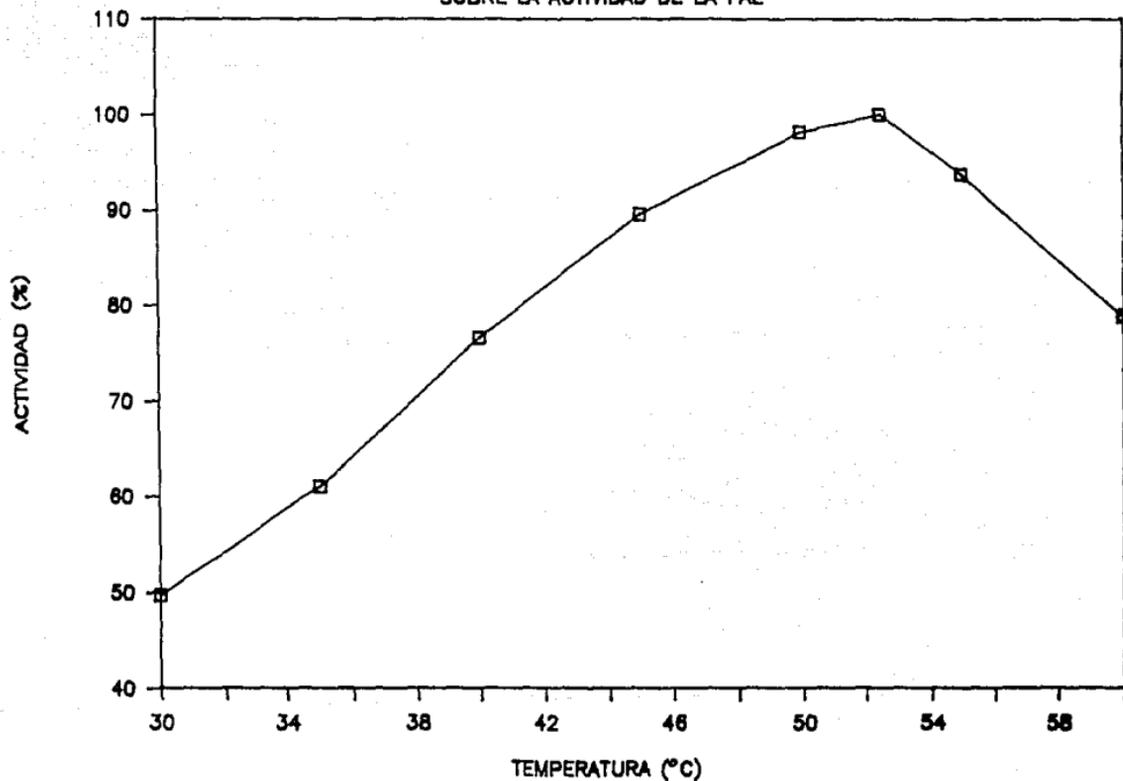
Wieder y colaboradores (1979) reportaron que la temperatura óptima de la FAL es de 49°C que es menor a la obtenida en nuestro caso probablemente debido a que se trabajó con células permeabilizadas que en su interior contienen la enzima y no con la FAL en forma libre. El hecho de que la enzima esté contenida dentro de las células puede modificar su respuesta al variar la temperatura del ensayo de actividad posiblemente debido a que intracelularmente la enzima es más estable por la protección del medio ambiente.

Del resultado de la temperatura óptima determinada en este experimento se puede suponer que la máxima actividad lograda en las fermentaciones descritas anteriormente es menos del 50% de la real ya que fue determinada a temperatura ambiente y no a la óptima.

#### 5.4.2.2.1 Energía de activación ( $E_a$ )

Se aplicó la ecuación de Arrhenius para determinar la energía de activación de la reacción de desaminación de L-fenilalanina en presencia de la FAL, considerando únicamente los datos en los que al aumentar la temperatura, se incrementó la velocidad de la

# EFFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA FAL



137

FIGURA 22

reacción, es decir, hasta el dato correspondiente a la temperatura óptima (52.5°C).

A continuación se presenta la ecuación de Arrhenius después de aplicar logaritmos naturales:

$$\ln k = - \frac{E_a}{R} \frac{1}{T} + \ln A$$

donde:

k = Constante de rapidez ( $\mu\text{mol/l min}$ ), en este caso, velocidad inicial de reacción

$E_a$  = Energía de activación (cal/mol)

R = Constante de los gases = 1.987 cal/mol °K

T = Temperatura en grados Kelvin (°K)

A = Factor de frecuencia ( $\mu\text{mol/l min}$ )

Se consideró que la constante de rapidez (k) es igual a la velocidad de reacción y ésta se expresó como  $\mu\text{moles}$  de ácido trans-cinámico formadas por min por litro.

Al graficar  $\ln k$  vs  $1/T$  (Figura 23) se obtuvo una recta cuya pendiente corresponde a  $- E_a / R$  y cuya ordenada al origen corresponde a  $\ln A$ .

Aplicando regresión lineal se obtuvieron los siguientes resultados:

Pendiente de la recta = - 3137.5049 =  $- E_a / R$

Ordenada al origen = 12.1275 =  $\ln A$

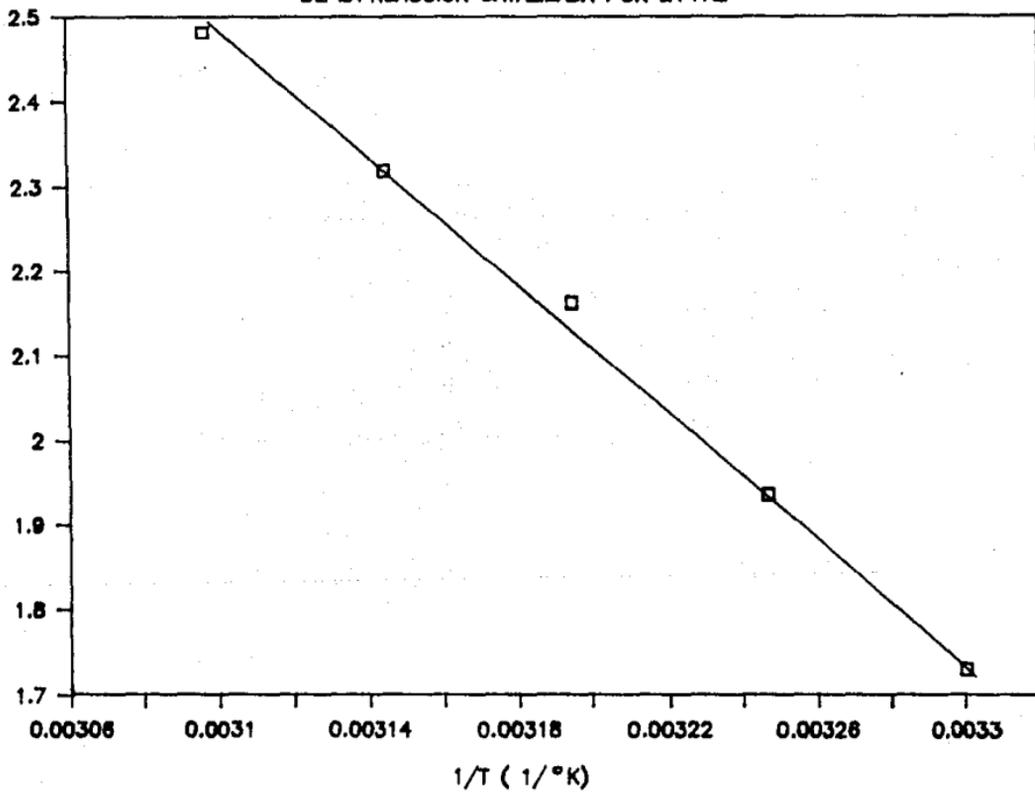
Coefficiente de correlación = 0.99068

La energía de activación resultó ser de 6234.22 cal/mol y el factor de frecuencia (A) de 184,886.98  $\mu\text{mol/l min}$ .

# ENERGIA DE ACTIVACION DE LA REACCION CATALIZADA POR LA FAL

139

$\ln k$



**FIGURA 23**

#### 5.4.2.2.2 Estabilidad de la FAL a diferentes temperaturas

Se incubó la enzima suspendida en buffer de fosfatos (pH=7.4) a tres temperaturas diferentes y se tomaron muestras para medir la actividad remanente a diversos tiempos.

En la Figura 24 se compara la estabilidad de la FAL incubándola a 30, 45 y 55°C. Se puede observar que la enzima resultó ser muy estable a 30°C y a 45°C ya que aún después de 7 horas de incubación conservó más del 90% de actividad respecto a la inicial, mientras que a 55°C, a las 3 horas de incubación la actividad disminuyó al 69.5% y a las 6 horas presentó únicamente el 10.72% de la actividad. A 30°C el tiempo de vida media fue de 99 horas.

La inducción de la FAL se realiza incubando a 30°C y con este ensayo de estabilidad se comprobó que se mantiene prácticamente el 100% de su actividad durante el tiempo de fermentación en el cual se produce, por lo que la desactivación posterior a la producción no puede deberse a una baja estabilidad térmica de la enzima.

# ESTABILIDAD DE LA FAL

A DIFERENTES TEMPERATURAS

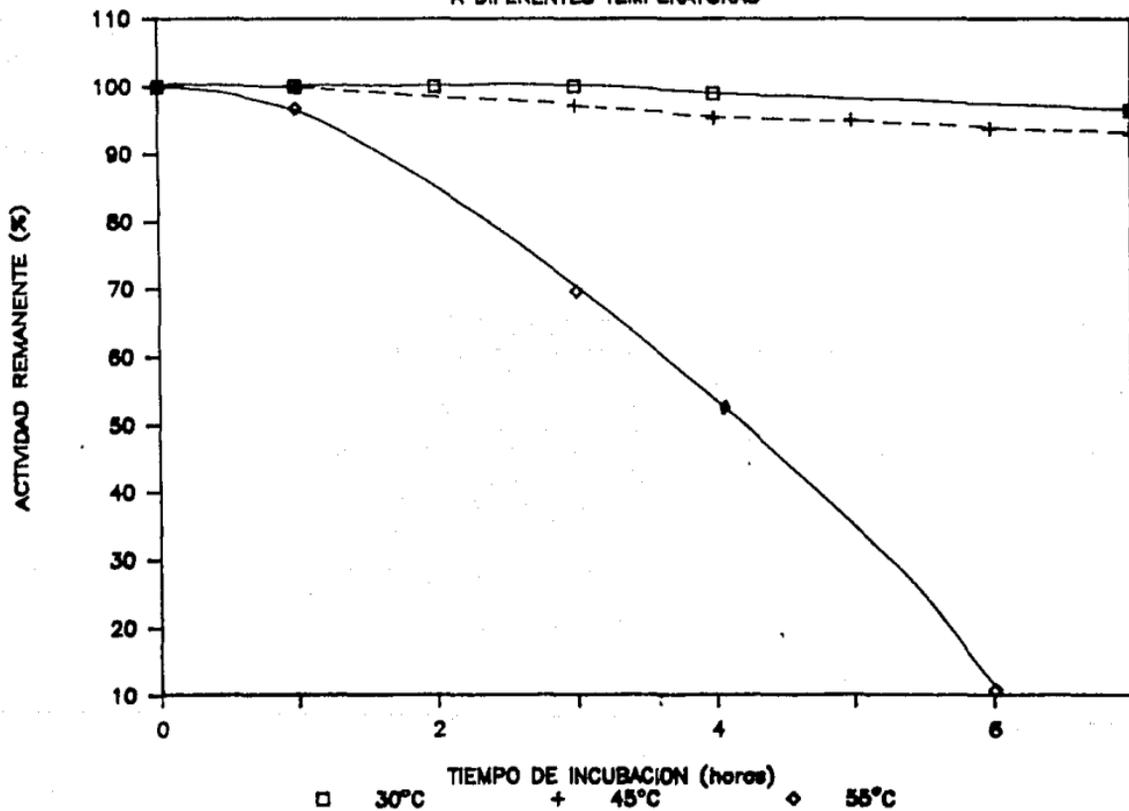


FIGURA 24

#### 5.4.2.3 Influencia de la concentración de sustrato sobre la velocidad de reacción

Se realizaron experimentos variando la concentración de sustrato en el ensayo de actividad de la FAL. Se trabajó con dos sustratos: L-fenilalanina y L-tirosina utilizando dos concentraciones de enzima: 0.1 ml y 0.05 ml de suspensión de células.

Para calcular la velocidad correspondiente a cada concentración de sustrato, se aplicó la siguiente ecuación:

$$\text{Velocidad} = \frac{\text{Pendiente}}{A} \times \frac{1}{B} \times \frac{10^6 \mu\text{mol}}{\text{mol}} \times \frac{1}{C} \times \frac{1}{D}$$

A = Velocidad de la reacción =  $\mu\text{mol} / \text{litro min}$

B = Pendiente obtenida en el ensayo de actividad (1/min)

C = Coeficiente de extinción molar del ácido trans-cinámico a una longitud de onda de 290 nm o del ácido para-cumárico a 315 nm. Se consideró la longitud de la celda igual a 1 cm.

D = Factor de conversión de micromoles a moles

En las Tablas 41, 42 y 43 se muestran los resultados obtenidos. En los casos en que se utilizó L-fenilalanina al aumentar la concentración de sustrato, aumentó la velocidad de la reacción hasta alcanzar un máximo ( $V_{\text{max}}$ ); mientras que cuando se trabajó con L-tirosina con concentraciones superiores a 3300  $\mu\text{M}$  la velocidad disminuyó, es decir, se presentó inhibición por exceso de sustrato. Sin embargo, por falta de datos, no se determinó la constante de inhibición correspondiente.

Las reacciones se efectuaron a dos temperaturas: 22°C y 40°C. Tanto en el caso de L-fenilalanina y de L-tirosina la velocidad inicial fue mayor a 40°C que a 22°C.

En las Figuras 25 y 26 se muestran las gráficas del inverso de la velocidad contra el inverso de la concentración de sustrato correspondientes a la ecuación de Lineweaver-Burk:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{m\acute{a}x}} \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}}$$

donde:  $1/V$  = Inverso de la velocidad = litro min/ $\mu$ mol  
 $K_m$  = Constante de Michaelis-Menten =  $\mu$ mol/litro  
 $V_{m\acute{a}x}$  = Velocidad máxima =  $\mu$ mol/litro min  
 $1/S$  = Inverso de la concentración de sustrato = litro/ $\mu$ mol

La ecuación a la que se hizo referencia corresponde a una línea recta cuya pendiente es  $K_m / V_{m\acute{a}x}$  y cuya ordenada al origen es  $1/V_{m\acute{a}x}$ .

Se observa que la enzima FAL obedece la cinética de Michaelis-Menten con L-fenilalanina como sustrato y también con L-tirosina.

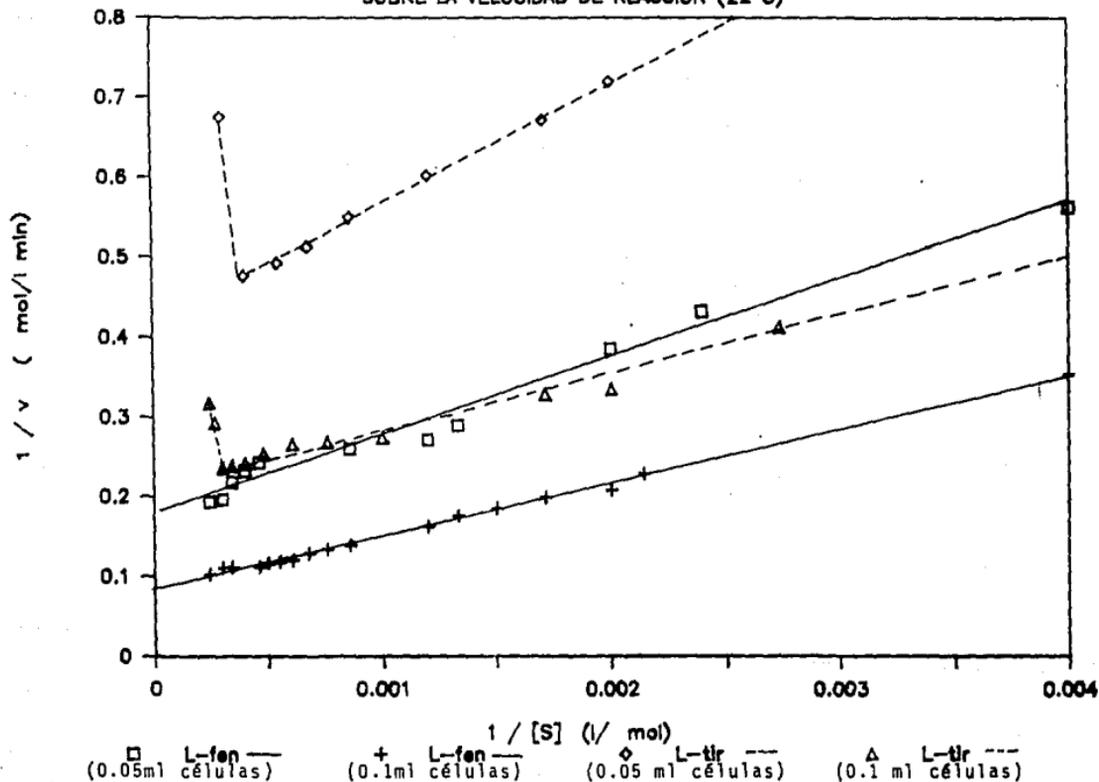
Aplicando la ecuación mencionada se determinó la constante de Michaelis-Menten y la velocidad máxima correspondientes a cada sustrato realizando el ensayo a 22°C y a 40°C. En la Tabla 44 se presentan los resultados obtenidos. Se observa que tanto a 22°C como a 40°C la  $K_m$  para L-fenilalanina fue mayor que para L-tirosina lo cual indica que la enzima FAL tiene mayor afinidad hacia el segundo sustrato; sin embargo, la velocidad máxima es considerablemente mayor con L-fenilalanina como sustrato. Se aprecia que al reducir el volumen de suspensión de células (fuente de enzima) a la mitad, se obtuvo prácticamente la misma  $K_m$ , y la velocidad máxima fue aproximadamente el 50% de la que se

determinó con el doble de concentración de enzima, lo cual resulta lógico.

Cuando se utilizó L-fenilalanina como sustrato, con 0.1 ml de suspensión de células (fuente de enzima) a 22°C, se obtuvo una Km de 572.81  $\mu\text{mol/ litro}$  que es muy similar a la reportada por Gilbert y Tully (1985) de 600  $\mu\text{mol/ litro}$ . En ambos casos se realizó el ensayo con la enzima contenida dentro de las células permeabilizadas con acetona. Por otra parte, Hodgins y colaboradores (1971) reportaron una Km de 250  $\mu\text{mol/ litro}$  para la FAL pero la utilizaron en forma libre obteniéndola después de sonicar las células y eliminar los residuos centrifugando.

Por otra parte, se obtuvo una Km para tirosina, de 330  $\mu\text{M}$  que es el doble de la reportada por Hodgins y colaboradores (1971), para la enzima libre.

# EFECTO DE LA CONCENTRACION DE SUSTRATO SOBRE LA VELOCIDAD DE REACCION (22°C)



**FIGURA 25**

# EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE SUSTRATO SOBRE LA VELOCIDAD DE REACCION (40°C)

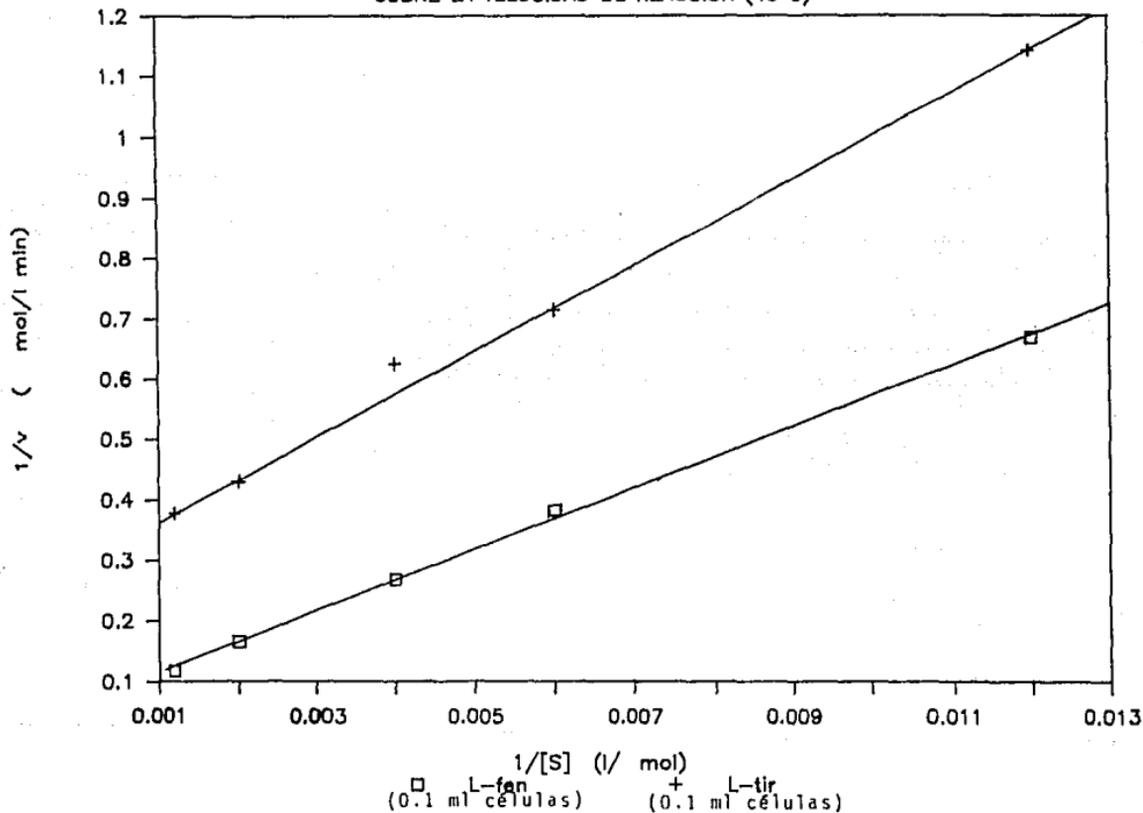


FIGURA 26

**TABLA 41**  
**INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE SUSTRATO**  
**SOBRE LA VELOCIDAD DE REACCION**  
**SUSTRATO = L-FENILALANINA**

[L-fenilalanina] $\mu\text{mol} / \text{l}$	Velocidad inicial <sup>a</sup> $\mu\text{mol} / \text{l min}$ A	Velocidad inicial <sup>a</sup> $\mu\text{mol} / \text{l min}$ B
250.00	1.78	3.45
416.66	2.32	----
466.66	----	4.37
500.00	2.60	4.81
583.33	----	5.02
666.69	----	5.40
750.00	3.46	5.69
833.33	3.69	6.14
1166.20	3.85	7.21
1332.80	----	7.46
1499.40	----	7.74
1666.60	----	8.30
1832.60	----	8.45
1999.20	----	8.59
2165.80	4.12	8.89
2499.00	4.31	----
2915.50	4.59	8.95
3332.00	5.09	8.99
4165.00	5.17	9.74
6247.50	5.61	10.19
8830.00	----	10.62

\* : Volumen de suspensión de células = 0.05 ml  
 $6.7810 \times 10^{-4}$  g / ensayo,  $9.2 \times 10^{-3}$  U FAL / ensayo

\*\* : Volumen de suspensión de células = 0,10 ml  
 $1.3562 \times 10^{-3}$  g / ensayo,  $1.84 \times 10^{-3}$  U FAL / ensayo

a : Volumen del ensayo 3.0 ml., T = 22°C, pH = 8.5

**TABLA 42**  
**INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE SUSTRATO**  
**SOBRE LA VELOCIDAD DE REACCION**  
**SUSTRATO = L-TIROSINA**

[L-tirosina] μmol / l	Velocidad inicial <sup>a</sup> μmol / l min A	Velocidad inicial <sup>a</sup> μmol / .1 min B
250.00	1.00	----
333.33	----	2.43
500.00	1.39	2.99
583.33	1.49	3.05
833.33	1.66	----
999.60	----	3.65
1666.60	1.82	----
1332.80	----	3.72
1499.40	1.95	----
1666.60	----	3.76
1832.60	2.03	----
2082.50	----	3.95
2499.00	2.10	4.15
2915.50	----	4.20
3332.00	1.48	4.24
3748.50	----	3.42
4165.00	1.18	3.15
6247.70	----	3.12
8830.00	----	3.07

<sup>a</sup> : Volumen de suspensión de células = 0.05 ml  
 $6.7810 \times 10^{-4}$  g / ensayo,  $9.2 \times 10^{-3}$  U FAL / ensayo

<sup>aa</sup> : Volumen de suspensión de células = 0,10 ml  
 $1.3562 \times 10^{-3}$  g / ensayo,  $1.84 \times 10^{-3}$  U FAL / ensayo

<sup>a</sup> : Volumen del ensayo 3.0 ml, T = 22°C, pH = 8.5

Se determinó la desviación estandar de los datos de velocidad obteniéndose un valor de 0.18 ( $\sigma$  n-1).

Todos los ensayos a 22°C se realizaron con enzima cuya actividad era de 13.57 U/g células, con un peso seco de 1.3562 g células/litro de cultivo. Cuando se controló la temperatura a 40°C, se utilizó FAL con una actividad de 9.40 Unidades g células y con un peso seco de 1.6374 g células/litro de cultivo.

**TABLA 43**  
**INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE SUSTRATO**  
**SOBRE LA VELOCIDAD DE REACCION**  
**TEMPERATURA = 40°C**

[Sustrato] ( $\mu\text{mol} / \text{l}$ )	Velocidad inicial <sup>a</sup> ( $\mu\text{mol} / \text{l min}$ )	Velocidad inicial <sup>a</sup> ( $\mu\text{mol} / \text{l min}$ )
	Sustrato=L-fenilalanina	Sustrato=L-tirosina
83.33	1.50	0.87
166.60	2.77	1.40
250.00	3.72	1.78
500.00	5.37	2.32
833.33	6.23	2.65
1249.00	10.13	2.97

a: Volumen de suspensión de células = 0.10 ml

$1.6374 \times 10^{-3}$  g células / ensayo

$1.54 \times 10^{-2}$  U FAL / ensayo

Volumen / ensayo = 3.0 ml

Temperatura = 40°C, pH = 8.5

TABLA 44

 $K_m$  Y  $V_{max}$  DE LA ENZIMA FAL

Sustrato	T (°C)	Vol. suspensión de células (ml)	$K_m$ ( $\mu M$ )	$V_{max}$ ( $\mu M/min$ )
L-fenilalanina	22	0.05	573.37	5.76
L-fenilalanina	22	0.10	572.81	10.66
L-fenilalanina	40	0.10	619.30	12.72
L-tirosina	22	0.05	330.03	2.34
L-tirosina	2	0.10	300.70	4.57
L-tirosina	40	0.10	253.58	3.54

#### 5.4.2.4 Conversión de L-fenilalanina en ácido trans-cinámico y de L-tirosina en ácido para-cumárico

Se estudió la cinética de formación de productos en presencia de la enzima FAL utilizando L-fenilalanina como sustrato en un ensayo y L-tirosina en otro. Cuando se trabajó con el primer sustrato se midió el aumento de la absorbancia a 290 nm debido a la formación del ácido trans-cinámico y cuando se empleó L-tirosina se detectó el incremento de la absorbancia a 315 nm debido a la acumulación de ácido para-cumárico. Las reacciones se realizaron a 40°C con el objeto de que procedieran con mayor velocidad ya que como se observa en la Figura 22, la reacción es más rápida a dicha temperatura que a la ambiental.

En las Tablas 45 y 46 se presentan los resultados obtenidos. Se observa que en el caso que se trabajó con L-fenilalanina como

sustrato, se logró el 95% de conversión de L-fenilalanina a ácido trans-cinámico en un tiempo de 2 horas con 10 minutos; mientras que con L-tirosina el 99.88% del sustrato se transformó a ácido para-cumárico en 2 horas con 25 minutos.

En las Figuras 27 y 28 se muestra la variación experimental de la conversión de sustrato en función del tiempo de reacción con L-fenilalanina y con L-tirosina respectivamente. En la misma figura se incluyen dos modelos teóricos: la ecuación integrada de Michaelis-Menten y la ecuación de inhibición competitiva. En la Tabla 47 se muestran los datos teóricos correspondientes al modelo de Michaelis-Menten y al de inhibición competitiva calculados mediante el programa "ISISM" (Interactive Simulator) para los dos sustratos mencionados.

En ambos casos los datos experimentales fueron similares a los obtenidos con la ecuación de Michaelis-Menten. Las pequeñas desviaciones probablemente se deben a errores experimentales.

Es conveniente señalar que tanto el ácido trans-cinámico como el para-cumárico, que son los productos formados con L-fenilalanina y con L-tirosina como sustrato respectivamente, han sido reportados como inhibidores competitivos de la FAL. A pesar de que el ácido trans-cinámico es un inhibidor potente con una  $K_i$  de 0.026 mM, aparentemente no interfiere en la evolución de la reacción en las condiciones estudiadas.

Los datos obtenidos experimentalmente con los dos sustratos difieren de manera considerable de los que predice el modelo de

inhibición competitiva, en especial en el caso de la L-fenilalanina por lo que se descartó dicho modelo. De acuerdo con los resultados obtenidos se concluyó que la enzima FAL obedece la cinética de Michaelis-Menten.

TABLA 45  
CONVERSION DE L-FENILALANINA EN ACIDO TRANS-CINAMICO

Tiempo de reacción (min)	Acido trans-cinámico] ( $\mu\text{M}$ )	Conversión (%)
17	674	26.97
26	908	36.33
40	1162	46.49
50	1324	52.98
60	1436	57.46
70	1566	62.66
80	1774	70.98
90	1880	75.23
100	1986	79.47
110	2164	86.59
121	2372	94.91
130	2388	95.55
171	2392	95.72

$S_0$  = Concentración inicial de L-fenilalanina = 2499  $\mu\text{M}$

ENSAYO:  $4.0936 \times 10^{-2}$  g células / ensayo

0.2960 U de FAL / ensayo:

Volumen total = 10.0 ml

Temperatura del ensayo = 40°C, pH= 8.5

**TABLA 46**  
**CONVERSION DE L-TIROSINA EN ACIDO PARA-CUMARICO**

Tiempo de reacción (min)	[Acido para-cumárico] ( $\mu\text{M}$ )	Conversión (%)
2	90	2.71
15	622	18.71
25	912	27.44
35	1212	36.46
45	1594	47.96
55	1788	53.79
65	2054	61.79
75	2340	70.40
85	2594	78.04
97	2828	85.08
117	3194	96.09
135	3314	99.71
145	3320	99.88
185	3320	99.88

$S_0$  = Concentración inicial de L-tirosina = 3323.67  $\mu\text{M}$

Volumen de suspensión de células = 6.0 ml

ENSAYO:  $1 \times 10^{-1}$  g de células / ensayo

1.4023 U de FAL / ensayo

Volumen total / ensayo = 10.0 ml

Temperatura del ensayo = 40°C, pH = 8.5

TABLA 47

REACCION CATALIZADA POR LA FAL  
 DATOS TEORICOS OBTENIDOS CON EL MODELO DE MICHAELIS-MENTEN  
 Y CON EL DE INHIBICION COMPETITIVA

TIEMPO (min)	CONVERSION (%)			
	L-fenilalanina		L-tirosina	
	Michaelis- Menten	Inhibición Competitiva	Michaelis- Menten	Inhibición Competitiva
10	9.39	5.94	10.80	10.50
20	18.59	9.56	21.60	20.10
30	27.55	12.37	32.20	29.00
40	36.23	14.73	42.70	36.90
50	44.59	16.79	52.90	44.20
60	52.58	18.63	62.80	50.80
70	60.13	20.31	72.30	56.70
80	67.16	21.85	81.10	62.00
90	73.60	23.28	88.80	66.70
100	79.35	24.63	94.80	70.90
110	84.34	25.88	98.20	74.60
120	88.51	27.08	99.50	77.90
130	91.85	28.22	99.90	80.70
140	94.40	29.30	99.90	83.30
150	96.26	30.33	99.90	85.50
160	97.55	31.32	99.90	87.40
170	98.43	32.27	99.90	89.10
180	99.00	33.18	99.90	90.50
190	99.37	34.06	99.90	91.80
200	99.60	34.91	99.90	92.90
210	99.75	35.74	99.90	93.90
220	99.85	36.53	99.90	94.70
230	99.90	77.31	99.90	95.50

# REACCION DE CONVERSION

S = L-FENILALANINA

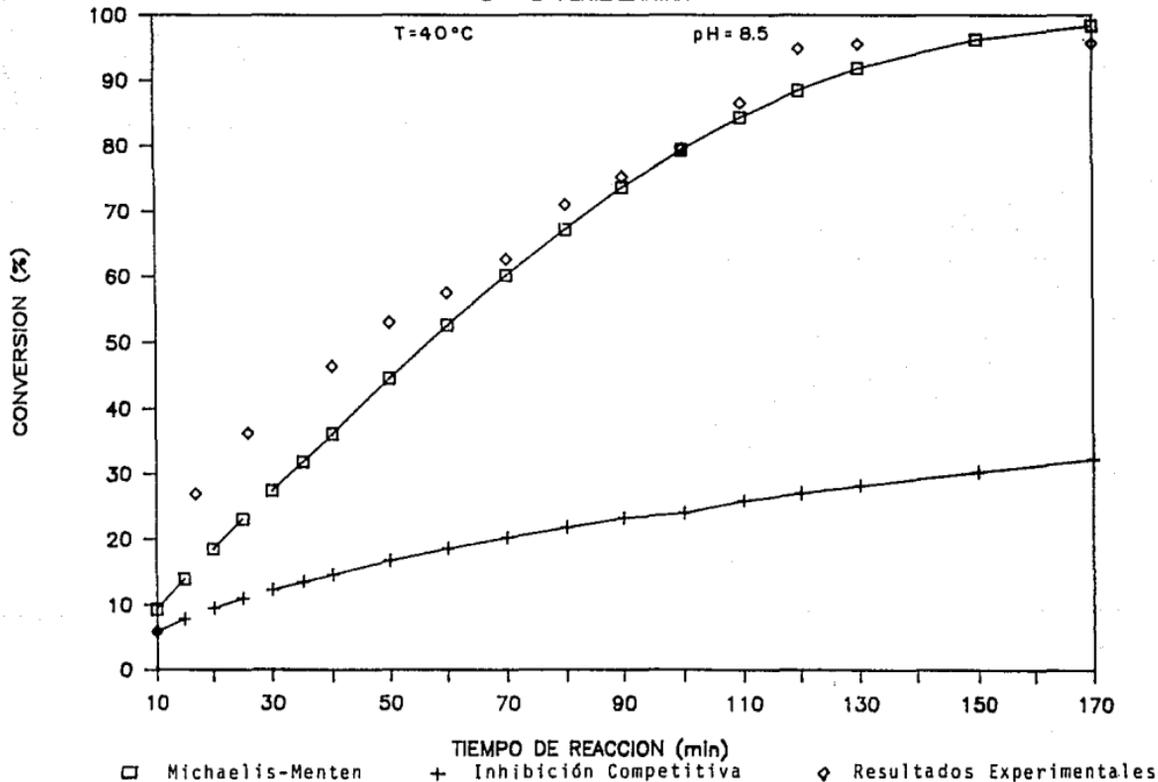


FIGURA 27

# REACCION DE CONVERSION

S = L-TIROSINA

T = 40 °C  
pH = 8.5

156

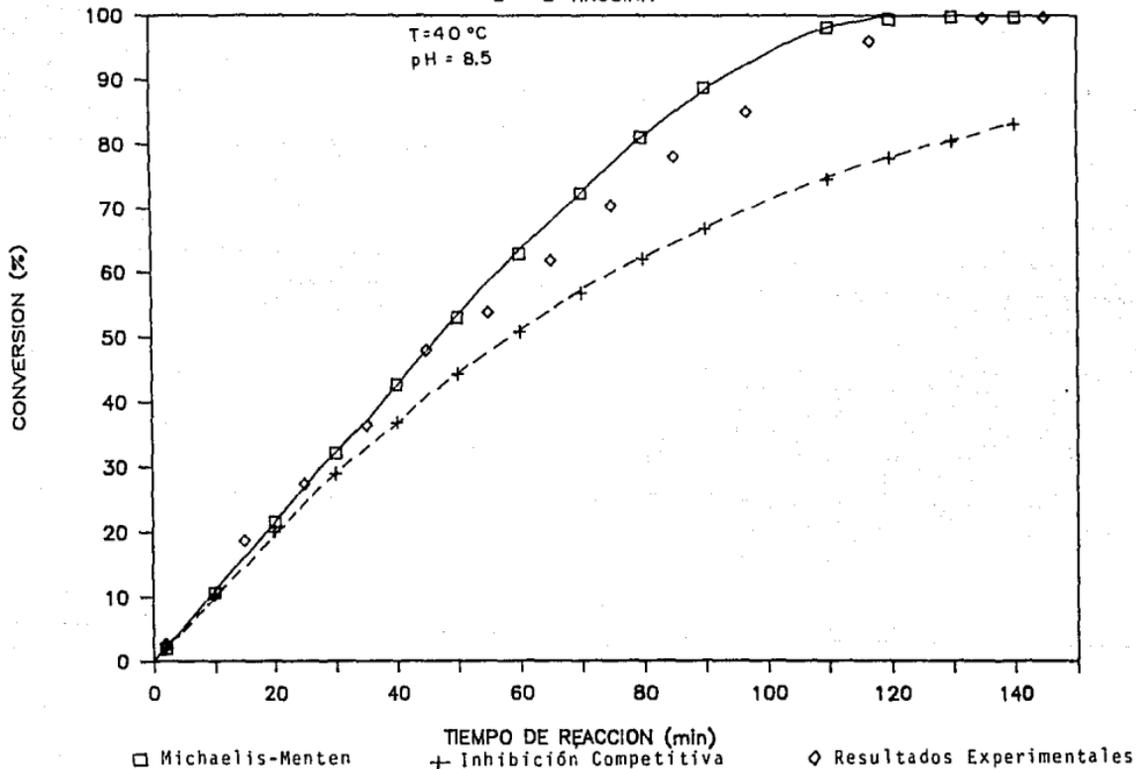


FIGURA 28

## 6. CONCLUSIONES

1. Se efectuó una amplia revisión bibliográfica sobre la producción de la enzima fenilalanina amonio-liasas de diversas fuentes y en especial de *Rhodotorula glutinis*.

2. Se determinó que el medio óptimo para la producción de la enzima FAL es el reportado por Hodgins y colaboradores (1971) y se definieron las condiciones de fermentación óptimas en el Bio-Flo: Temperatura = 30°C, agitación = 600 rpm, aireación = 1 vvm y pH = 6.0 controlado con solución de hidróxido de sodio (0.1 N). Bajo las condiciones mencionadas se logró una productividad de 1.63 Unidades de FAL/g hr.

3. Se diseñó un medio de cultivo óptimo para el crecimiento de *Rhodospiridium toruloides* que no resultó ser adecuado para producir la enzima FAL, pero que se puede utilizar para la preparación de inóculos.

4. Se observó que cuando se produce la enzima FAL en el medio para inducción la actividad máxima coincide con el cambio de color del cultivo: de amarillo a un color entre amarillo y anaranjado y también coincide con un aumento considerable en el pH.

5. Para realizar el ensayo de actividad de la FAL es necesario permeabilizar las células.

6. Se obtuvo poca biomasa en comparación con los resultados reportados por diferentes autores. Al incluir glucosa en el medio de cultivo se logró obtener mayor cantidad de células/l de cultivo pero la productividad fue mucho menor que en el medio para inducción (0.37 Unidades de FAL/g hr). A partir de esto se concluyó que el carbohidrato mencionado afecta la producción de la enzima.

7. Las condiciones óptimas para conservar la FAL durante el almacenamiento para su utilización posterior es suspendida en buffer de fosfato de potasio 0.05M, pH = 7.4 con 0.85% de cloruro de sodio y 30% de glicerol, en atmósfera de nitrógeno a 4°C. Otra alternativa es conservarla en forma liofilizada almacenándola a 4°C.

8. Se caracterizó la enzima FAL contenida dentro de las células permeabilizadas se *Rhodospiridium toruloides* determinando el pH óptimo, la temperatura óptima, la estabilidad a diferentes temperaturas. Por otra parte, se determinaron la  $K_m$  y la  $V_{max}$  correspondientes a dos sustratos: L-fenilalanina y L-tirosina.

9. La enzima FAL obedece la cinética de Michaelis-Menten tanto con L-fenilalanina como con L-tirosina. La  $V_{max}$  con el primer

sustrato es aproximadamente tres veces mayor que con el segundo.

10.. En el objetivo de este trabajo se planteó la aplicación potencial de la enzima FAL en la elaboración de productos con bajo contenido de L-fenilalanina para el tratamiento de la fenilcetonuria. Para poder poner en práctica dicho proyecto es necesario disponer de un hidrolizado de proteína, preferentemente de caseína con el fin de aportar un patrón de aminoácidos lo más parecido posible al de la leche. Lo anterior se ha efectuado en el Departamento de Alimentos de la Facultad de Química de la UNAM. Con base en en el trabajo desarrollado se concluye que es posible utilizar la enzima FAL contenida dentro de las células del microorganismo empleado para desaminar la L-fenilalanina presente en un hidrolizado de proteína formándose dos compuestos: ácido trans-cinámico que no es tóxico para el hombre ya que es metabolizado hasta ácido hipúrico que es eliminado a través de la orina (Snapper, 1940) y amoníaco que tampoco es tóxico. El microorganismo utilizado no es patógeno e incluso Gilbert y Tully (1985) proponen emplear las células de *Rhodospiridium toruloides* como vehículo para administrar oralmente otras enzimas que son atacadas por las proteasas del tracto gastrointestinal.

11. Existen aún limitantes en cuanto a la aplicación de la FAL en el proyecto propuesto:

a) La actividad obtenida no es lo suficientemente alta pues el proceso de producción, a pesar de haber sido optimizado, resulta

en cantidades pobres de enzima.

En el caso de la leche la concentración de la L-fenilalanina es de 32 mM por lo que para poder realizar la reacción de desaminación en un tiempo razonable bajo las condiciones ensayadas se requeriría de una cantidad de enzima 15 veces mayor a la empleada en los ensayos mencionados para lograr efectuarla en un tiempo aproximado de dos horas.

Por lo tanto es forzoso buscar mutantes para incrementar la productividad.

b) Dada la naturaleza del sustrato (hidrolizado de proteína) existe la posibilidad de que se contamine durante el proceso. Esto último se puede controlar si se efectúa la reacción a temperaturas de 50°C o superiores ya que bajo esta condición se reducirían considerablemente los problemas de contaminación. En este trabajo se determinó que la enzima es bastante estable a la temperatura mencionada además de que presenta la actividad mayor a 52.5°C.

c) Bajo las condiciones ensayadas la reacción de desaminación de L-fenilalanina sería muy lenta. Par acelerarla se tienen las siguientes opciones:

-Aumentar la concentración de enzima (suspensión de células) con actividad de FAL en la mezcla de reacción.

-Trabajar a 52.5°C que corresponde a la temperatura óptima de la enzima.

-De ser posible, trabajar a un pH de 9.0 que es el óptimo de la FAL.

d) Debido a que la FAL desamina tanto a la L-fenilalanina como a la L-tirosina, la concentración de esta última en el hidrolizado protéico disminuirá también, aunque en menor grado que la de la primera ya que la enzima actúa con mayor velocidad sobre la L-fenilalanina. Es necesario suplementar el hidrolizado que se obtenga después del tratamiento enzimático con L-tirosina.

12. En comparación con el método que se emplea actualmente para separar la L-fenilalanina de hidrolizados de caseína, el propuesto ofrece la ventaja de que es más selectivo pues únicamente se transforman dos aminoácidos (L-fenilalanina y L-tirosina), mientras que en el caso de método por adsorción en carbón activada se adsorben, además de L-fenilalanina, otros aminoácidos (histidina, triptofano, metionina y tirosina principalmente) que se deben suplementar al producto final.

13. Queda para estudios posteriores el realizar pruebas aplicando la FAL a hidrolizados de proteína y establecer las condiciones óptimas de reacción para poder determinar la eficiencia del método enzimático propuesto y establecer si compete con el método físico tradicional para la elaboración de los alimentos utilizados en el tratamiento de la fenilcetonuria, desde el punto de vista económico y también en cuanto a su eficiencia.

14. Una alternativa que resulta de gran interés es la de inmovilizar las células con actividad de fenilalanina amonio-liasa con el objeto de poder reutilizar la enzima.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- Abell C.W., Hodgins D.S., Stith W.J. "An *in vivo* evaluation of the chemotherapeutic potency of phenylalanine ammonia-lyase." *Cancer Research* 33:2529 (1973).
- Abell C.W., Rong-Sen Shen. "Phenylalanine ammonia-lyase from the yeast *Rhodotorula glutinis*." *Methods in Enzymology* 142:242 (1987).
- Alton Meister. *Biochemistry of the aminoacids*. Academic Press, U.S.A., 1965. Segunda edición.
- Ambrus C.M., Ambrus J.L., Horvath C., Pedersen H., Sharma S., Kant C., Mirand E. "Phenylalanine depletion for the management of phenylketonuria: Use of enzyme reactors with immobilized enzymes." *Science* 210:837 (1978).
- Ambrus C.M., Sharma S.D., Horvath C., Kalghatgi K., Antone S., Ambrus J.L., Cooley C., Mirand E.A. "In vivo safety of hollow fiber enzyme-reactors with immobilized phenylalanine ammonia-lyase." *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 224 (3): 598 (1983).
- Bandoni R.J., Moore K., Subba Rao P.V., Towers G.H.N. "Phenylalanine and tyrosine ammonia-lyase activity in some *Basidiomycetes*." *Phytochemistry* 7:205 (1968).
- Bezanson G.S., Desaty D., Emes A.V., Vining L.C. "Biosynthesis of cinnamide and detection of phenylalanine ammonia-lyase in *Streptomyces verticillatus*." *Canadian Journal of Microbiology* 16: 147 (1970).
- Bickel H. "Phenylketonuria: Past, Present, Future." *J. Inher. Metab. Dis.* 3: 123 (1980).
- Bohinski R. *Bioquímica*. Fondo Educativo Interamericano. México, 1985.
- Bourges, Velázquez. "Fenilcetonuria." *Cuadernos de Nutrición* 10 (3):18. Publicaciones del Instituto Nacional de la Nutrición, Conasupo y sus empresas industriales (1987).
- Bourget L., Chang T.M.S. "Phenylalanine ammonia-lyase immobilized in microcapsules for the depletion of phenylalanine in plasma in phenylketonuric rat model." *Biochimica et Biophysica Acta* 883: 432 (1986).

Camm E.L., Towers G.H.N. "Phenylalanine and tyrosine ammonia-lyase activity in *Sporobolomyces roseus*." *Phytochemistry* 8: 1407 (1969).

Camm E.L., Towers G.H.N. "Review article. Phenylalanine ammonia-lyase." *Phytochemistry* 12: 961 (1973).

Cederbaum S.D. "Phenylketonuria." Academic Press, Inc., 1984.

Emes A.V., Vining L.C. "Partial purification and properties of L-phenylalanine ammonia-lyase from *Streptomyces verticillatus*." *Canadian Journal of Biochemistry* 48: 613 (1977).

Evans C.T., Conrad D., Hanna K., Peterson W., Choma C., Misaun M. "Novel stabilization of phenylalanine ammonia-lyase catalyst during bioconversion of trans-cinnamic acid to L-phenylalanine." *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25: 399 (1987).

Evans C.T., Hanna K., Conrad D., Peterson W., Misawa M. "Production of phenylalanine ammonia-lyase (PAL): isolation and evaluation of yeast strains suitable for commercial production of L-phenylalanine." *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25: 406 (1987).

Fairhall L.T., *Industrial Toxicology*. The Williams & Wilkins Company, U.S.A., 1957. Segunda edición.

Finkelman et.al. "Method for the production of phenylalanine ammonia-lyase by fermentation." United States Patent No. 4,584,273 (1986).

Fiske M.J., Kane J.F. "Regulation of phenylalanine biosynthesis in *Rhodotorula glutinis*." *Journal of Bacteriology* 160 (2):676 (1984).

Fritz R.R., Hodgins D.S., Abell C.W. "Phenylalanine ammonia-lyase induction and purification from yeast and clearance in mammals." *The Journal of Biological Chemistry* 251 (15): 4646 (1976).

Gilbert H.J., Jack G.W. "The effects of proteinases on phenylalanine ammonia-lyase from the yeast *Rhodotorula glutinis*." *Biochem. J.* 199: 715 (1981).

Gilbert H.J., Tully M. "Synthesis and degradation of phenylalanine ammonia-lyase of *Rhodospiridium toruloides*." *Journal of Bacteriology* 150 (2): 498 (1982).

Gilbert H.J., Tully M. "Protection of phenylalanine ammonia-lyase from proteolytic attack" *Biochemical and Biophysical Research Communications* 131 (2): 557 (1985).

Hamilton B.K., Hsiao H.Y., Swann W.E., Anderson D.M., Delente J.J. "Manufacture of L-amino acids with bioreactors." *Trends in*

Biotechnology 3 (3): 64 (1985).

Havir E.A., Hanson K.R. "L-phenylalanine ammonia-lyase. I. Purification and molecular size of the enzyme from potato tubers." *Biochemistry* 7 (5): 1896 (1968).

Havir E.A., Hanson K.R. "L-phenylalanine ammonia-lyase. II. Mechanism and kinetic properties of the enzyme from potato tubers." *Biochemistry* 7 (5): 1904 (1968).

Higgins I.J., Best D.J., Jones J. *Biotechnology Principles and Applications*. Blackwell Scientific Publications, Great Britain, 1985.

Hodgins D.S. "Yeast phenylalanine ammonia-lyase. Purification, properties, and identification of catalytically essential dehydroalanine." *The Journal of Biological Chemistry* 246 (9): 2977 (1971).

Hoskins J.A., Jack G., Peiris R.J.D., Starr D.J.T., Wade H.E., Wright E.C., Stern J. "Enzymatic control of phenylalanine intake in phenylketonuria." *Lancet* 1: 392 (1980).

Inoue S., Matsunaga Y., Iwane H., Sotomura M., Nose T. "Entrapment of phenylalanine ammonia-lyase in silk fibroin for protection from proteolytic attack." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 141 (1): 165 (1986).

Kalghatgi K.K., Subba Rao P.V. "Microbial phenylalanine ammonia-lyase. Purification, subunit structure and kinetic properties of the enzyme form *Rhizoctonia solani*." *Biochem. J.* 149:65 (1975).

Kane J.f., Fiske M.J. "Regulation of phenylalanine ammonia-lyase in *Rhodotorula glutinis*." *Journal of Bacteriology* 161 (3): 953 (1985).

Klein M.D., Langer R. "Immobilized enzymes in clinical medicine: an emerging approach to new drug therapies." Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam (1986).

Kreger-van Rij. *The Yeasts. A Taxonomic Study*. Elsevier Science Publishers B.V. Third edition. Amsterdam, 1984.

Lehninger. *Bioquímica*. Editorial Omega, España, 1978.

Marusich W.C., Jensen R.A., Zamir L.O. "Induction of L-phenylalanine ammonia-lyase during utilization of phenylalanine as a carbon or nitrogen source in *Rhodotorula glutinis*." *Journal of Bacteriology* 146 (3): 1013 (1981).

Merck Index. 10a. Edición. The Merck & Co., Inc., U.S.A., 1985.

Milupa. Milupa PKU 1 y PKU 2: Protein substitutes for dietary treatment of phenylketonuria and hyperphenylalaninemia. Milupa AG. D-6382 Friedrichsdorf, 1980.

Moore K., Subba Rao P.V., Towers G.H.N. "Degradation of phenylalanine and tyrosine by *Sporobolomyces roseus*." *Biochem J.* 106: 507 (1968).

Ogata K., Uchiyama K., Yamada H. "Metabolism of aromatic amino acids in microorganisms. Part I. Formation of cinnamic acid from phenylalanine." *Agr. Biol. Chem.* 31 (2): 200 (1967).

Ogata K., Uchiyama K., Yamada H., Tochikura T. "Metabolism of aromatic aminoacids in microorganisms. Part II. Properties of phenylalanine ammonia-lyase of *Rhodotorula*." *Agr. Biol. Chem.* 31 (5): 600 (1967).

Onishi N., Yokozeki K., Hirose Y., Kubora K. "Enzymatic production of L-phenylalanine from trans-cinnamic acid by *Endomyces lindneri*." *Agric. Biol. Chem.* 51(1): 291 (1987).

Orndorff A., Costantino N., Stewart D., Durham D.R. "Strain improvement of *Rhodotorula graminis* for production of a novel L-phenylalanine ammonia-lyase." *Applied and Environmental Microbiology* 54 (4): 996 (1988).

Parkhurst J.R., Hodgins D.S. "Phenylalanine and tyrosine ammonia-lyase activity in *Sporobolomyces parvoseus*." *Phytochemistry* 10: 2997 (1971).

Parkhurst J.R., Hodgins D.S. "Yeast phenylalanine ammonia-lyase. Properties of the enzyme from *Sporobolomyces parvoseus*." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 152: 597 (1972).

Quintero Ramírez Rodolfo. Ingeniería Bioquímica. Teoría y Aplicaciones. Editorial Alhambra Mexicana, primera edición, México, 1981.

Rong-sen S., Abell C.W. "Phenylketonuria: a new method for the simultaneous determination of plasma phenylalanine and tyrosine." *Science* 197: 665 (1978).

Schmidt E., Hummel W., Wandrey C. "Continuous production of L-phenylalanine from acetamidocinnamic acid using the three-enzyme system acylase/L-phenylalanine dehydrogenase/FDH." 4<sup>th</sup> European Congress on Biotechnology 2: 189 (1987).

Sikora L.A., Marzluf G.A. "Regulation of L-phenylalanine ammonia-lyase by L-phenylalanine and nitrogen in *Neurospora crassa*." *Journal of Bacteriology* 150 (3): 1287 (1982).

Skinner F.A., Passmore S.M., Davenport R.R. *Biology and Activity of Yeasts*. Academic Press, Great Britain, 1980.

Snapper I., Yu T.F., Chiang Y.T. "Cinnamic acid metabolism in man." Proc. Soc. Exp. Biochem. Med. 44: 30 (1940).

Subsecretaría de Servicios de Salud y Coordinación de la investigación científica de la UNAM. "Guía para la prevención del retraso mental producido por hipotiroidismo congénito, toxoplasmosis congénita activa y fenilcetonuria." México, 1988.

Volimer et. al. "Method for stabilizing the enzymatic activity of phenylalanine ammonia-lyase during L-phenylalanine production." United States Patent No. 4,584,269 (1986).

Wang D.I., Cooney C.L., Demam A.L., Dunnill P., Humphrey A.E., Lilly M.D. Fermentation and Enzyme Technology. John Wiley & Sons, U.S.A., 1979.

Wick J.F., Willis J.E. "Phenylalanine-dependent de novo synthesis of phenylalanine ammonia-lyase from *Rhodotorula glutinis*." Archives of Biochemistry and Biophysics 216 (2): 385 (1982).

Wieder K.J., Palczuk N.C., Evans T., Davis F.F. "Some properties of polyethylene glycol: phenylalanine ammonia-lyase adducts." The Journal of Biological Chemistry 254 (24): 12579 (1979).

Yamada S., Nabe K., Izuo N., Nakamichi K., Chibata I. "Production of L-phenylalanine from trans-cinnamic acid with *Rhodotorula glutinis* containing L-phenylalanine ammonia-lyase activity." Applied and Environmental Microbiology 42 (5): 773 (1981).