

65
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**PRODUCCION DE FENILALANINA
AMONIO - LIASA POR
Sporidlobolus pararoseus**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

MARIA GUADALUPE HERNANDEZ VELASCO



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

CONTENIDO

CAPITULO	Página
I. INTRODUCCION	1
Objetivo	5
II. GENERALIDADES	
2.1. Fuentes de PAL	7
2.2. Producción de PAL	8
2.2.1. PAL de origen vegetal	8
2.2.2. PAL de origen microbiano	11
2.2.2.1. Microorganismos productores	11
2.2.2.2. Medios de cultivo	12
2.2.2.3. Condiciones de crecimiento	22
2.2.2.4. Estabilización de la enzima despues de la fermentación	24
2.3. Purificación de PAL	27
2.4. Propiedades de la enzima fenilalanina amonio-liasa	34
2.4.1. Peso molecular	34
2.4.2. pH y temperatura óptimos	34
2.4.3. Especificidad, inhibidores y estructura	35
2.4.4. Estequiometría de la reacción	42

2.4.5. Síntesis de la enzima	42
2.4.6. Producción de pigmentos carotenoides	43
2.4.7. Relación entre PAL y la síntesis del pigmento rojo	44
2.4.8. Intermediarios en el catabolismo de la L-fenilalanina	45
2.4.9. Propiedades cinéticas	45
2.5. Antecedentes de aplicaciones de fenilalanina amino-liasa a fenilcetonúricos	47
2.5.1. Tratamientos orales	48
2.5.2. Enzimas inmovilizadas para terapia extracorporal	55
2.5.3. Otras aplicaciones clínicas de la enzima	58
III. MATERIALES Y METODOS	
3.1. Organismos	62
3.2. Medios de cultivo	62
3.3. Preservación	63
3.4. Fermentaciones	64
3.5. Mutaciones	68
IV. RESULTADOS Y DISCUSION	
4.1. Selección del microorganismo	70
4.2. Caracterización de la fermentación para producción de biomasa	71
4.3. Fermentaciones para medir actividad enzimática con medio de cultivo A	74
4.4. Estabilidad de la enzima	79

4.5. pH Óptimo de la enzima	79
4.6. Fermentaciones para medir actividad enzimática con medio de cultivo D	81
4.7. Mutaciones	84
4.8. Optimización del medio de cultivo para producción de biomasa. Método de Box Wilson	89
4.9. Influencia de la aireación en el crecimiento de <u>Sporidiobolus pararoseus</u>	98
4.10. Fermentaciones para determinar las influencias nutricionales en la actividad enzimática con la cepa C	100
4.11. Optimización de la concentración de inductor	103
4.12. Escalamiento. Fermentación en fermentador Bio Flo	105
4.13. Caracterización de la enzima producida por la cepa mutante C	107
V. CONCLUSIONES	124
VI. BIBLIOGRAFIA	126

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO I

Figura	Página
1.1 Reacción de la enzima fenilalanina amonio-liasa con L-fenilalanina y L-tirosina.	6

CAPITULO II

2.1 Comparación de <u>Rhodotorula</u> spp durante la fermentación para producción de PAL	14
2.2 Efecto de la temperatura y el pH de crecimiento en la inducción de PAL en <u>Rhodotorula rubra</u>	23
2.3 Regulación de PAL en <u>Rhodotorula rubra</u>	26
2.4 Mecanismo de reacción postulado para la enzima producida a partir de tubérculos de papa	39
2.5 Intermediarios en el catabolismo de la L-fenilalanina en <u>Rhodotorula glutinis</u>	45

CAPITULO III

3.1 Técnica para el tratamiento mutagénico de <u>Sporidiobolus pararoseus</u>	69
---	----

CAPITULO IV

4.1	Caracterización de la fermentación para producción de biomasa en medio YM	72
4.2	Caracterización de la fermentación para producción de biomasa en medio de cultivo A	75
4.3	Fermentación para medir actividad enzimática en medio de cultivo A	77
4.4	pH óptimo de actividad enzimática. PAL de cepa original	80
4.5	Fermentación para medir actividad enzimática en medio de cultivo D	82
4.6	Fermentación en medio D de las tres sobrevivientes seleccionadas	86
4.7	Fermentación en medio A de las tres cepas seleccionadas	88
4.8	Optimización del medio de cultivo. Box Wilson. Tercera serie de experimentos	97
4.9	Influencia de la aireación en el crecimiento de <u>Sporidiobolus pararoseus</u>	99
4.10	Optimización de la concentración de inductor	104
4.11	Escalamiento. Fermentación en fermentador Bio Flo	106
4.12	pH óptimo de actividad enzimática. PAL de cepa C	109
4.13	Temperatura óptima de actividad enzimática. PAL de cepa C	109
4.14	Estabilidad a 50°C	110

4.15 Caracterización cinética. PAL con L-fenilalanina como sustrato a 24°C	114
4.16 Caracterización cinética a 24°C. PAL con L-fenilalanina como sustrato	115
4.17 Caracterización cinética. PAL con L-tirosina como sustrato a 24°C	116
4.18 Caracterización cinética a 24°C. PAL con L-tirosina como sustrato	117
4.19 Caracterización cinética. Segunda serie de experimentos	119
4.20 Estudio cinético a 40°C. Tercera serie de experimentos	121
4.21 Caracterización cinética a 40°C. Tercera serie de experimentos	123

LISTA DE TABLAS

CAPITULO II

Tabla	Página
2.1 Características de PAL de varias fuentes	9
2.2 Características de PAL de varias fuentes	10
2.3 Influencias nutricionales en la expresión de PAL	15
2.4 Efecto de la adición de L-fenilalanina en la actividad específica en <u>Streptomyces verticillatus</u>	16
2.5 Inducción de PAL por L-fenilalanina en <u>Rhodotorula glutinis</u>	17
2.6 Efecto de varios aminoácidos en la inducción de PAL de <u>Rhodotorula graminis</u>	19
2.7 Sustitución de L-fenilalanina como inductor	20
2.8 Medios de cultivo utilizados en la producción de PAL	21
2.9 Condiciones de crecimiento para la producción de PAL	24
2.10 Purificación de PAL de <u>Rhodotorula glutinis</u>	29
2.11 Purificación de PAL de <u>Rhodotorula glutinis</u>	29
2.12 Purificación de PAL de <u>Sporobolomyces roseus</u>	31
2.13 Purificación de PAL de <u>Streptomyces verticillatus</u>	32
2.14 Purificación de PAL de <u>Rhizoctonia solani</u>	33
2.15 Efecto del pH y temperatura en la actividad de PAL de diferentes fuentes	34
2.16 Especificidad de sustrato e inhibidores en PAL de	

Rhodotorula glutinis

37

- 2.17 Propiedades cinéticas de PAL de Rhodotorula glutinis 47
- 2.18 Efecto de PAL en los niveles de L-fenilalanina en el
jugo duodenal 54

CAPITULO III

- 3.1 Condiciones experimentales para el ensayo de actividad
enzimática 67

CAPITULO IV

- 4.1 Valores de actividad de la enzima fenilalanina amonio-
líasas en aislados naturales 73
- 4.2 Efecto de las condiciones de almacenamiento en la es-
tabilidad de PAL 81
- 4.3 Comparación entre las fermentaciones con los medios de
cultivo A y D 83
- 4.4 Mediciones de actividad de las cepas seleccionadas en
medio A 87
- 4.5 Comparación entre las cepas original y mutada C en
medio de cultivo A 89
- 4.6 Niveles de variación. Primera serie de experimentos 90
- 4.7 Experimentos realizados en la primera parte de la op-
timización del medio 91
- 4.8 Coeficientes de regresión. Primera serie de experimen-

tos.	92
4.9 Variación del pH y concentración de glucosa en función del aumento del extracto de malta	93
4.10 Niveles de variación. Segunda serie de experimentos	94
4.11 Segunda serie de experimentos	94
4.12 Coeficientes de regresión. Segunda serie de experimentos	95
4.13 Variación de la concentración del extracto de malta y de levadura en función del aumento en la concentración de glucosa de 1.0%	96
4.14 Tercera serie de experimentos	96
4.15 Experimentos realizados para conocer la influencia de la aireación en el crecimiento de <u>Sporidiobolus pararoseus</u>	98
4.16 Influencias nutricionales en la expresión de fenilalanina amonio- <i>liasa</i>	101
4.17 Comparación de los resultados de la evaluación de las influencias nutricionales en la actividad enzimática	102
4.18 Influencia del glicerol en la estabilidad de la enzima	111
4.19 Estabilidad de PAL en células liofilizadas	112
4.20 Caracterización cinética de PAL	113
4.21 Caracterización cinética de PAL. Segunda serie de experimentos	118
4.22 Caracterización cinética. Tercera serie de experimentos	122

CAPITULO I

INTRODUCCION:

La Biotecnología, y en particular la tecnología enzimática es un área de creciente desarrollo que ha impactado considerablemente la industria de alimentos. Existe la necesidad de formular alternativas para la producción y utilización de enzimas que contribuyan a la generación de tecnologías propias y que tiendan al aprovechamiento de nuestros recursos.

La elaboración del presente trabajo se emprendió en virtud de la necesidad de desarrollar y elaborar un producto para el tratamiento de la fenilcetonuria que sea accesible para los fenilcetonúricos, habiéndose propuesto la utilización de un proceso enzimático para su elaboración. (López, 1989 y Lara, 1989).

La fenilcetonuria es una enfermedad que se hereda en forma autosómica recesiva en la cual hay una alteración en el metabolismo de la fenilalanina: la deficiencia de la enzima fenilalanina hidroxilasa. Esto resulta en una acumulación de fenilalanina y otros metabolitos en los fluidos corporales cuando la ingesta del aminoácido excede los requerimientos nutricionales, lo que sucede con una alimentación normal, y el exceso no puede ser metabolizado.

A menos que la enfermedad sea detectada en los primeros dos o tres meses de vida y tratada, el desarrollo cerebral es afectado

y aparecen síntomas como retraso mental, alteraciones neurológicas, eczema (inflamación superficial de las capas dérmicas), y disminución de pigmentación en piel y cabello. Una vez que estos síntomas han aparecido, si el paciente comienza a ser tratado se ayuda a evitar un mayor daño cerebral, pero ningún tratamiento puede revertirlo.

La incidencia de esta enfermedad es relativamente baja: en Estados Unidos es de 1 en 11,500 y en Europa de 1 en 10,000. Sin embargo, se observan variaciones en las diferentes regiones del mundo. En México no se ha estudiado todavía un número de pacientes lo suficientemente grande como para tener estadísticas confiables.

A pesar de los esfuerzos que se han desarrollado para encontrar diferentes métodos para el tratamiento de la fenilcetonuria, sólomente se ha demostrado que son efectivas las dietas con bajo contenido de fenilalanina. Al inicio de la terapia se utiliza un producto sin el aminoácido para disminuir su concentración en el plasma hasta el nivel normal. Posteriormente se añade fenilalanina de otras fuentes, como leche o fórmulas infantiles para satisfacer los requerimientos mínimos para el crecimiento y desarrollo del paciente. Estos requerimientos van cambiando a medida que el infante crece, por lo que es necesario checar regularmente los niveles de fenilalanina en el plasma y hacer ajustes a la dieta para asegurar un desarrollo adecuado.

Los productos utilizados en estas dietas son fabricados por unas cuantas compañías farmacéuticas transnacionales. En México no se elaboran, por lo que se requiere su importación, lo que en ocasiones dificulta su disponibilidad.

Existen diferentes tipos de estos productos especiales:

1) Mezclas de L-aminoácidos, sin fenilalanina, enriquecidos con vitaminas, minerales y elementos traza. Estas formulaciones tienen la desventaja de que tienen un costo muy alto.

2) Hidrolizados enzimáticos de proteína, por ejemplo de caseína, que se procesan para separar la mayor cantidad posible de fenilalanina. Posteriormente se añade grasa, carbohidratos, vitaminas y minerales en cantidades apropiadas para cubrir los requerimientos nutricionales.

Actualmente existe un proyecto conjunto entre la Unidad de Genética de la Nutrición del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, el DIF y el Departamento de Alimentos de la Facultad de Química para producir en México un producto bajo en fenilalanina a un costo menor que el importado. El proceso desarrollado consiste en obtener un hidrolizado de caseína y separar posteriormente la fenilalanina del mismo por medios físicos, utilizando carbón activado. Este proceso tiene el inconveniente de que el carbón activado no solo adsorbe la fenilalanina, sino también otros aminoácidos aromáticos como

triptofano y tirosina, que tienen que ser restituidos en la reformulación, lo que aumenta el costo del producto, disminuyendo la eficiencia global del proceso.

Para eliminar este inconveniente se ha planteado una hipótesis de trabajo que consiste en utilizar una enzima como otra alternativa para la segunda etapa del proceso, con el fin de lograr una degradación específica de la fenilalanina.

La utilización de enzimas en la industria alimentaria presenta muchas ventajas: son muy específicas en su forma de acción, funcionan en condiciones moderadas de temperatura y pH, por lo que no se requieren condiciones drásticas que puedan alterar la naturaleza del alimento. Su velocidad de reacción puede ser controlada al ajustar el pH, la temperatura y la concentración de enzima y son fácilmente inactivadas después de haber alcanzado el cambio deseado. Las limitaciones para usarlas dependen de la enzima: suelen ser su alto costo y su disponibilidad a nivel industrial. Actualmente existe la tendencia a emplearlas en forma continua, de esta forma muchas reacciones se han vuelto atractivas para la industria, pues los costos bajan debido a la alta eficiencia en la recuperación de la enzima.

De las diversas alternativas analizadas por los antecedentes existentes en estudios sobre la producción enzimática de fenilalanina, se eligió utilizar la enzima fenilalanina

amonió-liasa (E.C. 4.3.1.5.) producida por Sporidiobolus pararoseus. Esta enzima cataliza la anti-eliminación del grupo amino del carbono 2 y el pro-S-hidrógeno del carbono 3 de la L-fenilalanina y la L-tirosina para dar el ácido trans-cinámico y el trans-p-cumárico, respectivamente. La reacción se ilustra en la figura 1.1.

Dentro de las diversas fuentes microbianas para la producción de la enzima se seleccionó Sporidiobolus pararoseus por ser una cepa poco estudiada hasta la fecha como fuente de enzima. Las enzimas más estudiadas son las producidas por Rhodotorula glutinis y otras especies del mismo género. Sin embargo, en ningún caso se ha llegado a procesos comerciales para la producción de la enzima.

OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es producir la enzima fenilalanina amonio-liasa de Sporidiobolus pararoseus por vía fermentativa y caracterizarla para su posterior aplicación en la producción de alimentos libres de fenilalanina.

Este objetivo comprende varias etapas:

1. Seleccionar al microorganismo productor de enzima.
2. Establecer las condiciones para obtener la mayor producción de biomasa y actividad enzimática.
3. Buscar la sobreproducción de la enzima por medio de la

aplicación de agentes mutágenos al microorganismo.

4. Escalar la producción de la enzima.

5. Caracterizar la enzima desde el punto de vista cinético y de estabilidad.

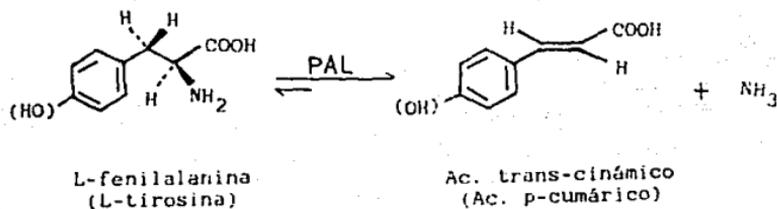


FIGURA 1.1. Reacción de la enzima fenilalanina amonio-liasas con L-fenilalanina y L-tirosina.

GENERALIDADES

2.1. FUENTES DE FENILALANINA AMONIO-LIASA

La enzima L-fenilalanina amonio-liasa (PAL; E.C. 4.3.1.5.) se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza. Se ha detectado en plantas, hongos y levaduras, pero no en bacterias o en células de mamíferos.

En plantas, esta enzima constituye el paso inicial de una ruta metabólica altamente ramificada del metabolismo secundario (Marusich et al. 1981). El ácido trans-cinámico producido por la acción enzimática sobre la fenilalanina es posteriormente transformado en ligninas y los polifenoles relacionados. En un gran número de plantas la enzima es inducida por iluminación (Yamada et al. 1981).

Aunque el papel de la fenilalanina amonio-liasa en sistemas microbianos está en ocasiones relacionado con el metabolismo secundario, como ocurre en plantas, su papel central en microorganismos parece ser catabólico, por ejemplo sirviendo como un paso degradativo inicial para generar energía utilizable (Marusich et al. 1981). En levaduras no es una enzima constitutiva, sino que es inducida por la adición de L-fenilalanina o algún análogo al medio de cultivo (Gilbert y

Tully, 1982).

En las tablas 2.1. y 2.2. se muestra una lista de las principales fuentes de fenilalanina amonio-liasa, elaborada a partir de una extensa revisión bibliográfica.

2.2. PRODUCCION DE FENILALANINA AMONIO-LIASA.

2.2.1. Fenilalanina amonio-liasa de origen vegetal.

Havir y Hanson (1968), reportan la extracción de la enzima a partir de rebanadas de papa. Las rebanadas recientemente cortadas no presentan actividad enzimática detectable. Cuando se exponen a la luz, se desarrolla la actividad de la enzima, alcanzando un máximo entre 20 y 30 horas. Las rebanadas que se dejan en oscuridad también llegan a desarrollar actividad, pero en mucho menor grado.

El método para producir y extraer la enzima se describe a continuación. Todas las operaciones se deben llevar a cabo en un rango de temperatura de 0 a 4°C.

A partir de papas peladas se cortan rebanadas de 1mm de espesor, se lavan con agua y se colocan en charolas blancas, se les añade una solución de sulfato de neomicina, y se tapan con cubiertas de plástico transparentes. Posteriormente se irradian con lámparas fluorescentes a 21 °C durante 22 hr. Una vez transcurrido este tiempo se lavan con agua destilada, se agitan en una

TABLA 2.1. Características de PAL de varias fuentes

Fuente	Peso Molecular	pH óptimo	T. de tra-bajo (°C)	Activ. Espec.*
A. PLANTAS				
<u>Hordeum vulgare</u> (cebada)	-	8.8 - 9.2	40	5.13 U/mg prot
Tubérculo de papa	330,000	8.7	30	0.79 U/mg prot
<u>Zea mays</u>	306,000	-	30	-
<u>Ipomaea batatas</u> (camote)	-	8.5 - 9.5	30	-
<u>Nicotiana tabacum</u>	-	8.0 - 8.6	30	-
B. MICROORGANISMOS				
<u>Streptomyces verticillatus</u>	226,000	9.0	25	0.2 U/g micelio
<u>Rhizoctonia solani</u> (hongo patógeno)	330,000	8.7 - 8.9	30	0.68 U/mg prot.
<u>Sporobolomyces pararoseus</u>	300,000	-	30	0.96 U/mg prot.
<u>Rhodotorula glutinis</u>	275,000	9.0	30	37 U/g cel 28 U/g cel 2 U/g cel
<u>Neurospora crassa</u>	-	-	30	2.08 X 10 ⁻³ U/mg prot.
<u>Rhodotorula texensis</u>	-	9.0	30	-
<u>Sporobolomyces roseus</u>	-	8.7	30	18.9 U/g cel
<u>Ustilago hordei</u>	-	8.8	30	-
<u>Sporidiobolus pararoseus</u>	-	-	30	31.4 U/g cel

TABLA 2.2. Características de PAL de varias fuentes

Fuente	Km (L-fen) (μ M)	Inhibidores	Especificidad
A. PLANTAS			
<u>Hordeum vulgare</u>	1700	Ac. t-cinámico, algunos metales, ácidos aromáticos y comp. que atacan grupos SH	Solo activa con L-fen. En preparaciones frescas también con L-tir y DL-m-tir
Tubérculo de papa	No sigue Michaelis-menten	Agentes que reaccionan con grupos carbonilos	Activa con L y D fenilalanina
<u>Zea mays</u>	270	D-fenilalanina	Activa con L-tirosina
<u>Ipomaea batatas</u>	101	Ac. t-cinámico, tir, p-Fl-fen, ac. cumárico, ac. caféico	-
<u>Nicotiana tabacum</u>	220	Ac. t-cinámico, o-cumárico, o-tir.	No activa con tirosina
B. MICROORGANISMOS			
<u>Streptomyces verticillatus</u>	160	Metales pesados, ac. t-cinámico, ag. que reaccionan con grupos SH y C=O	Activa con o-, m- y p-fluoro-, p-cloro y p-metil-fenilalanina. No activa con L-tir
<u>Rhizoctonia solani</u>	No sigue Michaelis-Menten	Ag. que reaccionan con grupos C=O, D-fen, ac. t-cinámico p-cumárico y cafeico	Activa con L-fen L-tir y analogos
<u>Sporobolomyces pararoseus</u>	300	Ag. que atacan grupos carbonilo, amino y sulfhidrilo	Activa con L-fen y con L-tir
<u>Rhodotorula glutinis</u>	250	Ac. t-cinámico, D-fen y analogos, ac. fenil-propiólico., Ag. que reaccionan con grupos SH y C=O	Activa con L-fen L-tir, DL-3-hidroxi-fenilalanina
<u>Neurospora crassa</u>	500	-	Activa con L-fen
<u>Rhodotorula texensis</u>	1500	Agentes que reaccionan con grupos SH, algunos metales	Activa con L-fen y L-tir
<u>Sporobolomyces roseus</u>	400	Ac. t-cinámico, ac. p-cumárico	Activa con L-fen y L-tir
<u>Ustilago hordei</u>	450	Ac. t-cinámico	No activa con L-tir
<u>Sporidiobolus pararoseus</u>	-	-	-

malla para eliminar el agua, se pesan en bolsas de plástico, y se congelan, o bien se procede a preparar la muestra para su purificación:

La muestra de rebanadas se lava con acetona fría y se homogeneiza en un mezclador especial. El polvo resultante se colecta por filtración y se transfiere a un segundo mezclador a -20 °C, y se vuelve a homogeneizar en acetona fría. Posteriormente se colecta otra vez, se lava con acetona fría y se seca al aire. Este polvo es el material con el que se inicia la purificación.

En el estudio de Koukol y E.C. (1961) se reporta la producción de enzima a partir de cebada (Hordeum vulgare). Todas las partes de la planta producen la enzima, en diferentes proporciones: Las plantas son iluminadas para inducir la producción de la enzima, y posteriormente los tallos (que es la parte en donde se detecta la mayor actividad enzimática) se tratan con acetona, se pulverizan y se secan.

2.2.2. Fenilalanina amonio-liasa de origen microbiano.

2.2.2.1. Microorganismos productores

A partir de la revisión bibliográfica efectuada fué posible constatar que la enzima es reportada sólo en hongos y levaduras, pero no por bacterias. Los principales microorganismos

productores son:

Rhodotorula glutinis (Marusich et al.1981)

Rhodotorula graminis (Orndorff et al.1988)

Sporobolomyces pararoseus (Parkhurst y Hodgins, 1971)

Sporobolomyces roseus (Camm y Towers, 1969)

Streptomyces verticillatus (Bezanson et al.1970)

Rhodotorula rubra, Rhodotorula texensis (Ogata et al,1967)

Rhizoctonia solani (Kalghatgi y Subba Rao, 1975)

Neurospora crassa (Sikora y Marzluf, 1982).

2.2.2.2. Medios de cultivo

2.2.2.2.1. Fuente de carbono

El medio de cultivo para el crecimiento de microorganismos productores de fenilalanina amonio-liasa debe contener fuentes asimilables de carbono, las más utilizadas son sacarosa, almidones y glucosa. En la mayor parte de los trabajos consultados se utiliza extracto de malta en un rango de concentraciones de 0.5 a 3.0%, sin incluir glucosa debido a que causa represión catabólica.

Yamada et al.(1981) presentan resultados con una cepa de Rh. glutinis. En su estudio se reporta que cuando se utiliza un medio con glucosa no se observa actividad enzimática, aún en presencia del inductor. Camm y Towers (1969), realizaron varias fermentaciones con Sporobolomyces roseus variando la concentración de glucosa en el medio de cultivo, obteniendo los mayores valores de

actividad enzimática con las menores concentraciones de glucosa. Evans et al. 1987 reportan haber observado el mismo fenómeno con varias cepas de Rhodotorula.

Sin embargo, en un estudio reciente (Orndorff et al., 1988) se reporta la inclusión de glucosa en el medio de cultivo en una concentración de 1.5%, haciendo adiciones durante la fermentación de 1.4% de glucosa y 1.5% de extracto de levadura, que se añadieron una vez que la glucosa inicial fué consumida. En la figura 2.1 se puede observar que la inclusión de glucosa en el medio permite una producción alta de biomasa; una vez que se consume toda la glucosa, se manifiesta la actividad de la enzima.

En otro estudio con Rh. glutinis (Wick y Willis, 1982) se hizo la suplementación del medio de cultivo con glucosa y no se observa ningún efecto en la inducción de la enzima.

Kane y Fiske (1985) y Marusich et al. (1981) utilizan fructosa como fuente de carbono y realizan experimentos para determinar la influencia de la concentración en la actividad de la enzima producida por Rhodotorula glutinis, observando que a medida que se disminuye la concentración del azúcar los niveles de actividad enzimática aumentan.

2.2.2.2.2. Inductor

Se utiliza L-fenilalanina o algún compuesto análogo en una

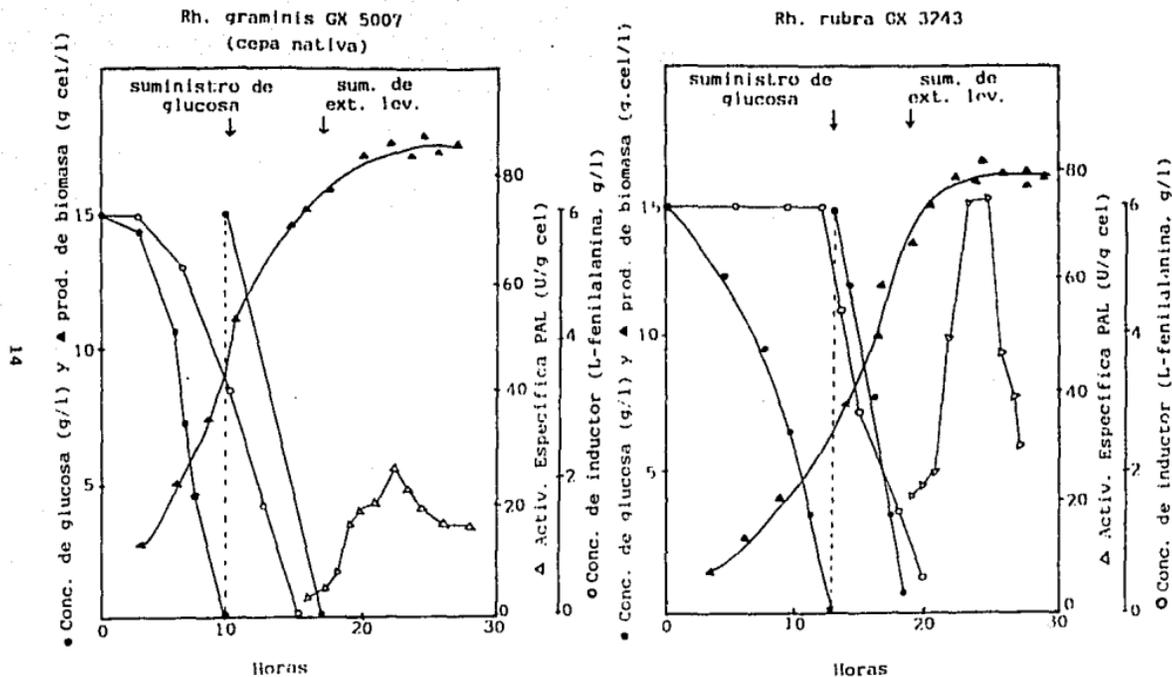


FIGURA 2.1.

Comparación de *Rhodotorula* spp durante la fermentación para producción de PAL. Las concentraciones para los suministros de glucosa y extracto de levadura fueron 14 g/l y 15 g/l, respectivamente (U_g mol prod./min).

concentración de 0.1-1.0%. Casi todos los microorganismos estudiados necesitan su inclusión en el medio para producir la enzima. En la tabla 2.3. se pueden observar valores de actividad enzimática muy bajos cuando no se incluye fenilalanina en el medio de cultivo (Marusich et al., 1981). En esta misma tabla se observa también el efecto represor de la fructosa y del sulfato de amonio.

Sin embargo, en Streptomyces verticillatus la enzima parece ser constitutiva, pues su producción se lleva a cabo sin la necesidad de incluir el inductor en el medio de cultivo (Bezanson et al. 1970). En este estudio se realizaron experimentos en donde se demuestra que la inclusión de L-fenilalanina en el medio de cultivo aumenta la actividad de la enzima, como se muestra en la tabla 2.4.

TABLA 2.3. Influencias nutricionales en la expresión de PAL

Medio básico	Fuente de carbono	Fuente de nitrógeno	Adición	Actividad* Específica
Complejo	Indefinido	Indefinido		< 0.5
Complejo	Indefinido	Indefinido	L-fenilalana	9.0
Mínimo	Fructosa (1%)	Sulfato de amonio(0.15%)		< 0.5
Mínimo	Fructosa (1%)	Sulfato de amonio(0.15%)	L-fenilalana	< 0.5
Mínimo	Fructosa (1%)	L-fenilalanina (15mM)		12.0
Mínimo	L-fenilalanina (15mM)	Sulfato de amonio(0.15%)		39.0
Mínimo	L-fenilalanina (15mM)	L-fenilalanina (15mM)		54.0

* La actividad específica se expresa en nanomoles de producto formado por minuto por miligramo de extracto de proteína.

TABLA 2.4. Efecto de la adición de L-fenilalanina en la actividad específica de Streptomyces verticillatus.

Medio de cultivo	Activ. específica* (U/g micelio)
medio definido	0.051
medio definido + L fenilalanina (0.5 g/l)	0.210

* La actividad específica se expresa como micromoles de producto formado por minuto a 30°C.

En otro estudio (Orndorff et al., 1988) se realizan experimentos con Rhodotorula graminis para determinar el efecto de la concentración de fenilalanina en la inducción de la enzima y se observa que las actividades obtenidas se incrementan al aumentar la concentración de inductor hasta 9 g/l y que a concentraciones mayores se obtienen aumentos insignificantes.

En muchos de los trabajos se reporta la ejecución de experimentos para determinar la influencia del tiempo de adición del inductor durante la fermentación en la actividad de la enzima, encontrándose en todos los casos que:

- La expresión de la actividad enzimática es independiente del tiempo de adición del inductor.
- La inducción de la enzima ocurre en la última mitad de la fase logarítmica sin importar el tiempo en que el inductor es añadido.
- Cuando la fenilalanina se agrega al final de la fase loga-

rítmica no se lleva a cabo la inducción de la enzima.

Casi todas las cepas evaluadas tienen la capacidad de utilizar la L-fenilalanina como única fuente de carbono y nitrógeno. Todos los trabajos coinciden en que cuando el microorganismo productor de enzima utiliza la fenilalanina como fuente de carbono y nitrógeno, se obtienen mayores valores de actividad específica como se muestra en la tabla 2.5 (Kane y Fiske, 1985). Sin embargo, la falta de otros nutrimentos da como resultado un crecimiento muy lento y una baja producción de biomasa en comparación con medios suplementados con otras fuentes.

TABLA 2.5. Inducción de fenilalanina amonio-liasa por L-fenilalanina en Rhodotorula glutinis

Fuente de Carbono (%)	Fuente de Nitrógeno (%)	Actividad específica *
Fructosa (0.2)	Sulfato de amonio (0.5)	3.0
Fructosa (0.2)	L-fenilalanina (0.2)	31.0
L-fenilalanina (0.2)	Sulfato de amonio	70.0
L-fenilalanina (0.2)	L-fenilalanina (0.2)	90.0

* La actividad específica esta expresada como nanomoles de ácido trans-cinámico formado por minuto por miligramo de proteína.

Algunos autores reportan que se puede aumentar la actividad de la enzima suplementando el medio de cultivo con otros aminoácidos además de la fenilalanina. Camm y Towers (1969),

aseguran que la adición de L-tirosina al medio (0.1%) incrementa la producción de la enzima producida por Sporobolomyces roseus. La estimulación de la producción de enzima resulta menor a mayores concentraciones de tirosina, es posible que a niveles altos de concentración la tirosina actúe como una fuente de carbono adicional causando represión catabólica, en forma similar a lo que sucede con la glucosa.

Orndorff et al. (1988), realizan la evaluación del efecto de varios aminoácidos en la inducción enzimática en una cepa de Rhodotorula graminis y demuestran que algunos aminoácidos, en particular los hidrofóbicos, inducen niveles de enzima iguales o mayores a los observados con fenilalanina (isoleucina, leucina, metionina y valina). Posteriormente efectúan la combinación de L-fenilalanina con algunos aminoácidos y observan que la combinación de L-fenilalanina con L-leucina aumenta el valor de actividad a niveles mayores que los observados con los aminoácidos evaluados de manera individual, como se muestra en la tabla 2.6.

Se determina también el efecto de varias combinaciones isoméricas de fenilalanina y leucina en la actividad de la enzima, siendo la combinación L-leucina + DL-fenilalanina la que resulta en el mayor valor de actividad según se puede observar en la misma tabla.

TABLA 2.6. Efecto de varios aminoácidos en la inducción de PAL en Rhodotorula graminis.

Inductor	Actividad* específica (U/g cel)	Combinación de inductor	Actividad* específica (U/g cel)
Fenilalanina	15.8	L-Leu + DL-Fen	74.5
Isoleucina	31.6	L-Leu + L-Fen	63.1
Leucina	26.7	L-Leu + D-Fen	63.1
Metionina	19.4	DL-Leu + DL-Fen	60.2
Tirosina	10.9	DL-Leu + L-Fen	57.3
Triptofano	1.2	DL-Leu + D-Fen	47.3
Valina	23.1	DL-Fen	42.6
Fenilalanina		L-Fen	25.8
+ Leucina	34.0	D-Fen	17.2
+ Isoleucina	21.9	DL-Leu	25.8
+ Valina	13.4	L-Leu	24.4

* La actividad específica se expresa en micromoles de producto formado por minuto a 30°C.

Finkelman y Yang (1986), proponen la sustitución de la L-fenilalanina como inductor por hidrolizado de caseína, que es de menor costo, en fermentaciones con Rhodotorula rubra. En la tabla 2.7 se muestran los resultados que indican que no existe mucha diferencia en los valores de actividad y de producción de biomasa entre los dos inductores, demostrando así la viabilidad del cambio de inductor.

TABLA 2.7. Sustitución de L-fenilalanina como inductor.

Medio de fermentación		En el pico de actividad	
Agua de co- cimiento de maíz		Producción de biomasa (g/l)	Actividad PAL (U/g) *
	Caseína Hidrolizada (g/l)		
0	15	8.8	49
2	15	8.8	56
4	15	9.5	52
10	15	9.2	57
	L fenilalanina (g/l)		
0	1.5	7.0	49
2	1.5	7.2	65
4	1.5	7.0	46
10	1.5	7.9	53

* Unidades: micromoles de producto por minuto a 30°C.

En la tabla 2.8 se muestran algunos de los medios de cultivo utilizados para la producción de la enzima. En los trabajos en los que se menciona más de un medio de cultivo se hizo la selección del que dió mejores resultados en cuanto a la producción de la enzima.

2.2.2.2.3. Fuente de Nitrógeno

Las fuentes de nitrógeno más utilizadas son sales de amonio, peptona, hidrolizados de proteína y extractos de levadura. En la mayor parte de los trabajos se reporta la utilización de extracto de levadura (0.1-1.0%) y de peptona (0.5-1.0%).

TABLA 2.8. Medios de cultivo utilizados en la producción de PAL

Microorga- nismo	L-fen (%)	Ext. glucosa malta (%)	Ext. glucosa (%)	Ext. lev. (%)	Sulfato de amonio (%)	Ref.
<u>Rhodotorula glutinis</u>	0.1	1.0	-	1.0	-	Wick y Willis, 1982
<u>Rhodotorula graminis</u>	0.6	-	1.5	0.5	0.2	Orndorff et al.1988
<u>Sporobolomyces pararoseus</u>	0.1	0.7	-	0.1	-	Parkhurst y Hodgins 1971
<u>Sporobolomyces roseus</u>	0.1	3.0	-	0.1	-	Moore et al. 1968
<u>Streptomyces verticillatus</u>	-	1.0	2.0	0.5	-	Bezanson et al.1969

Marusich et al., 1981 reportan que la utilización de sulfato de amonio como fuente de nitrógeno en fermentaciones con Rhodotorula glutinis da como resultado menores valores de actividad. Otros autores (Evans et al., 1987) reportan el mismo fenómeno y sugieren que los iones amonio son tomados preferencialmente a la L-fenilalanina, impidiéndose el efecto inductor. Así, para asegurar una máxima síntesis de la enzima es necesaria una adecuada selección de las fuentes de carbono y de nitrógeno y de las concentraciones utilizadas.

Orndorff et al. (1988) observaron que el tiempo de adición del extracto de levadura durante la fermentación no tiene un efecto importante en la actividad enzimática en Rhodotorula graminis. La omisión de este nutrimento incrementa de una a dos horas

el tiempo requerido para obtener el pico de actividad.

2.2.2.2.4. Otros nutrimentos

Existen otros micronutrientes que deben incluirse en el medio, tales como vitaminas, minerales y otros factores de crecimiento. Estos pueden incluirse por separado o ir junto con las fuentes de carbono y nitrógeno complejas (extractos de levadura y de malta). Estos componentes pueden variar dependiendo del microorganismo empleado. Típicamente, los minerales traza como zinc, manganeso, fierro, cobalto y calcio pueden suplirse como sales inorgánicas.

2.2.2.3. Condiciones de crecimiento

Los microorganismos utilizados se cultivan en condiciones aerobias, propicias para la mayor producción de biomasa posible. En el estudio de Finkelman y Yang (1986), se reporta que el pH óptimo para la inducción de la enzima está en el rango de 5.5 a 7.5. En casi todos los trabajos consultados se ajusta el pH del medio a 6.0 al inicio del cultivo. En el reporte de Evans et al. (1987), se ajusta a 5.5 (investigaron varias especies de Rhodotorula) y en el de Wick y Willis (1982), en el que trabajaron con Rhodotorula glutinis se ajusta a 6.8.

En todos los estudios la producción de la enzima se lleva a cabo a una temperatura de 28-30°C, con excepción del reportado

por Marusich et al. (1981), en donde se reporta una temperatura de 25 °C para la producción de fenilalanina aronio-liasa de Rhodotorula glutinis.

Evans et al. (1987), reportan que se obtienen actividades enzimáticas mayores a valores de pH y temperatura que no son los óptimos para el crecimiento de Rhodotorula rubra, como se muestra en la figura 2.2. Es posible que las condiciones adversas causen stress en las células y que induzcan reacciones propias del metabolismo secundario.

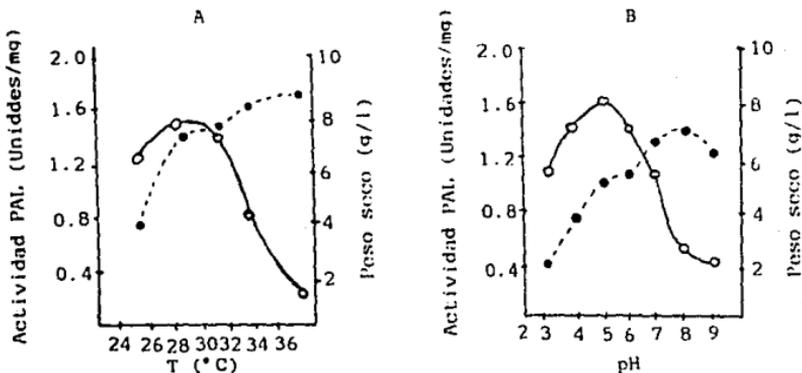


FIGURA 2.2. Efecto de la temperatura y el pH de crecimiento en la inducción de PAL en Rhodotorula rubra.

El microorganismo fué cultivado en medio de inducción de la enzima y las muestras fueron tomadas a las 24 h de fermentación. La actividad está expresada como micromoles de fenilalanina por miligramo de peso seco por hora.

(A) Temperatura de crecimiento

(B) pH de crecimiento

● Actividad PAL; ○ Producción de biomasa

En todos los trabajos se reporta que el valor máximo de actividad enzimática se presenta al final de la fase logarítmica o al inicio de la estacionaria. De igual forma todos los trabajos coinciden en que para que se exprese la actividad enzimática es necesario romper o permeabilizar las células, excepto en el estudio de Yamada et al. (1981), en donde se obtuvieron los mismos valores de actividad en células de Rhodotorula glutinis intactas y tratadas.

En la tabla 2.9 se muestran las condiciones de crecimiento utilizadas en la producción de la enzima por algunos microorganismos.

TABLA 2.9. Condiciones de crecimiento para la producción de PAL

Microorganismo	T (°C)	pH	tiempo de ferm de max. activ (h)	[cel g/l	Act. esp. U/gcél	Ref.
<u>Rhodotorula glutinis</u>	28	6.8	16	1.46	28	Wick y Willis 1982
<u>Rhodotorula graminis</u>	30	6.0	21	17.3	26	Orndorff et al. 1988
<u>Sporobolomyces pararoseus</u>	30	6.0	29	-	0.96 U/mgprot	Parkhurst y Hodgins 1972
<u>Rhodotorula rubra</u>	30	6.0	40	1.16	18	Ogata et al. 1967

2.2.2.4. Estabilización de la enzima después de la fermentación.

En todos los estudios examinados, el perfil clásico de inducción de la enzima muestra una síntesis rápida con la

presencia del inductor y posteriormente un pico de máxima actividad, seguido por una rápida inactivación de la enzima. En el estudio de Finkelman y Yang (1986), se sugiere que para minimizar este problema es necesario cambiar las condiciones de la fermentación una vez que el microorganismo ha crecido hasta el nivel deseado y que se ha llevado a cabo la inducción de la enzima. Se debe detener entonces la agitación y la aereación del medio, bajar la temperatura y burbujear un gas inerte, por ejemplo nitrógeno, ya que se ha visto que la degradación de la enzima se minimiza con la ausencia de oxígeno, a bajas temperaturas y en condiciones estáticas.

Evans et al.(1987), después de experimentos con varias levaduras encontraron que la disminución de temperatura de 30 a 10°C, el burbujeo de nitrógeno en el medio de cultivo para crear condiciones anaerobias y la adición de isoleucina (2.5 g/l) y fenilalanina (5 g/l) en el momento de máxima actividad prevenía la inactivación de la enzima.

Yamada et al.(1981), observaron que la adición de L-isoleucina en la fermentación estabiliza la actividad de la enzima de Rhodotorula glutinis. En el estudio de Evans et al.(1987), se evalúa el efecto del burbujeo de algunos gases en el medio de cultivo durante la fermentación en la estabilidad de la enzima y se observa que el oxígeno contribuye a una pérdida rápida de actividad enzimática, que el CO₂ no tiene efecto alguno y que el nitrógeno contribuye a dar una gran estabilidad a la enzima. Ex-

perimentos subsecuentes revelaron que el glicerol, sorbitol, glutaraldehído y polietilén glicol contribuyen a la estabilidad de la enzima en las bioconversiones, una vez que las células han sido cosechadas.

Se sugiere que la inactivación de la enzima se debe a una enzima proteolítica intracelular. En la figura 2.3 se ilustra en un resumen la forma en que diversos factores contribuyen a estabilizar o desestabilizar a la enzima antes y después de su producción.

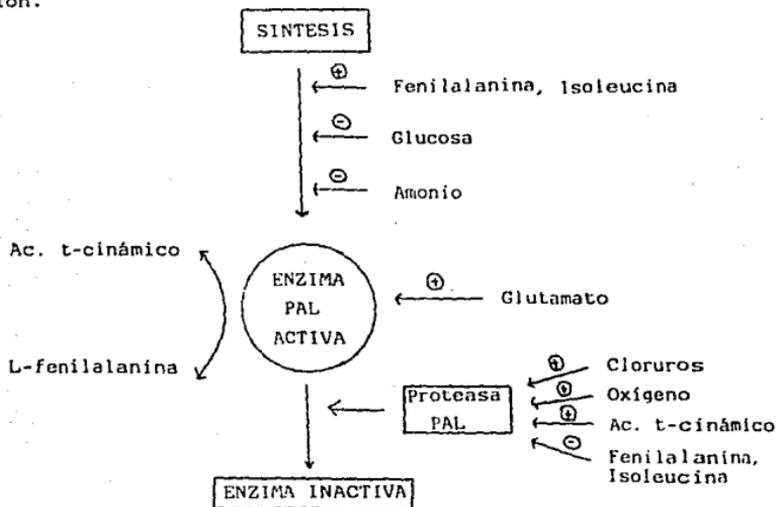


FIGURA 2.3. Regulación de PAL en Rhodotorula rubra.

2.3. PURIFICACION DE FENILALANINA AMONIO-LIASA

2.3.1. PAL de vegetales.

En la bibliografía se reporta la purificación de la enzima de rebanadas de papa expuestas a la luz (Havir y Hanson, 1968) y de Hordeum vulgare (Koukol y C.E., 1961).

La purificación de la enzima de papa se lleva a cabo en seis etapas: una extracción inicial, un tratamiento con protamina, dos fraccionamientos con sulfato de amonio y dos cromatografías, lográndose una purificación de 216 veces y un 20% de recuperación de la actividad enzimática.

Koukol y C.E., reportan para la enzima de cebada un paso menos que para la enzima de papa, pero un grado de purificación mucho menor (28 veces), con una recuperación del 19% de la actividad inicial.

2.3.2. PAL de microorganismos.

En la revisión bibliográfica se encontraron los procesos de purificación de PAL de cinco microorganismos: Rhodotorula glutinis, Sporobolomyces pararoseus, Sporobolomyces roseus, Streptomyces verticillatus y Rhizoctonia solani.

La enzima de todos estos microorganismos es intracelular y por ello se requiere comenzar el proceso de purificación con la ruptura de las células para producir un extracto libre de células. Esto se logra en todos los casos con la exposición de las células a frecuencias ultrasónicas.

Hodgins (1971), reporta una purificación para la enzima de Rhodotorula glutinis de 8 pasos: la ruptura inicial de las células, un tratamiento con protamina, que es una proteína con una gran carga neta positiva y que, por lo tanto sirve para precipitar ácidos nucleicos, que tienen una carga neta negativa. Posteriormente se aplica una serie de precipitaciones con sulfato de amonio, citrato de sodio y fosfato de potasio, que son sales que disminuyen la solubilidad de las proteínas. Finalmente se realiza una cromatografía en columna de permeación en gel (Sephadex G-200). En este trabajo, a pesar de que el proceso lleva muchos pasos se reporta una purificación muy baja (48 veces), un 23% de recuperación de la actividad enzimática inicial como se muestra en la tabla 2.10.

En el estudio de Fritz et al. (1976), se reporta una purificación en 8 pasos. Se elimina el tratamiento con protamina, logrando una purificación de 250 veces, con un 23% de recuperación de la actividad de la enzima. Los resultados de este trabajo se muestran en la tabla 2.11.

TABLA 2.10. Purificación de PAL de Rhodotorula glutinis.

Paso	Proteína (mg)	Enzima (unidades) *	Actividad Especifica (U/mg)
1.Extracto sónico	40,000	904	0.022
2.Tratamiento con protamina	18,000	805	0.048
3.Concentración con sulfato de amonio	16,000	810	0.050
4.Primerá precipitación con sulfato de amonio	5,100	425	0.083
5.Citrato de sodio	2,040	580	0.280
6.Fosfato de potasio	802	175	0.210
7.Columna Sephadex G-200	321	287	0.890
8.Segunda precipitación con sulfato de amonio	148	158	1.070

* Las unidades se expresan como micromoles de producto formadas por minuto a 30°C.

TABLA 2.11. Purificación de PAL de Rhodotorula glutinis.

Paso	Proteína (mg)	Enzima (unidades) *	Actividad Especifica (U/mg)	Enzima inicial (%)
1.Extracto sónico	200,000	2,000	0.01	100
2.Precipitación con sulfato de amonio	30,000	1,800	0.06	90
3. Precipitación con citrato de sodio	4,250	1,530	0.36	76
4.Diálisis	4,250	1,530	0.36	76
5.Cromatografía DEAE celulosa	765	765	1.00	38
6.Cromatografía Sephadex G-200	220	575	2.60	28
7.Diálisis	220	545	2.50	26
8.Esterilización por filtración en millipore	195	460	2.50	23

* La actividad se expresa en micromoles de ácido trans-cinámico producido por minuto a 30°C.

La enzima de Sporobolomyces pararoseus fué purificada en 7 pasos (Parkhurst y Hodgins, 1971) que incluyen ruptura inicial por sonicación, tratamiento con sulfato de protamina, tres precipitaciones con sulfato de amonio, una con citrato de sodio y una cromatografía de intercambio iónico. En la tabla 2.12 se puede observar que se logró un grado de purificación muy alto (436 veces) y una recuperación de la actividad enzimática igualmente alta (46%).

Durante la purificación son monitoreadas las actividades de fenilalanina amonio-liasa (PAL) y de tirosina amonio-liasa (TAL). Se observa que conforme avanza el proceso de purificación, los valores de actividad totales de ambas enzimas disminuyen y que la relación PAL/TAL varía muy poco. La electroforésis en gel de poliácrilamida dió una sola banda de proteína y otras de impurezas en concentraciones muy pequeñas. Estos resultados indicaron que la cepa de Sporidiobolus pararoseus utilizada en este estudio producía una sola enzima con actividad en los dos sustratos.

En el trabajo de Camm y Towers (1969), se realiza una purificación parcial de la enzima producida por Sporobolomyces roseus y se mide actividad PAL y TAL en cada etapa de la purificación. En contraste con lo observado por Parkhurst y Hodgins (1971) con Sporobolomyces pararoseus, se observa que conforme avanza la purificación, los valores de las actividades totales disminuyen en diferentes proporciones haciendo variar el valor de la relación PAL/TAL.

TABLA 2.12. Purificación de PAL de Sporobolomyces pararoseus.

Paso de purificación	Purif. (veces)	Proteína Total (mg)	Enzima Total (U)*	Actividad Específica (U/mg prot)
1.Extracto crudo	1.0	46,700	126	0.003
2.Tratamiento con sulfato de protamina	4.3	17,450	227	0.013
3.Fraccionamiento con sulfato de amonio	15.3	2,923	134	0.046
4.Fraccionamiento con citrato de sodio	34.3	892	92	0.103
5.Segunda precipitación con sulfato de amonio	80.0	328	70	0.213
6.Cromatografía con Sephadex G-200	193.0	61	72	1.180
7.Tercera precipitación con sulfato de amonio	436.0	45	59	1.310

*Las unidades estan expresadas en micromoles de producto formado por minuto a 30°C.

Esto resulta ser una evidencia indirecta de que el microorganismo estudiado produce dos enzimas diferentes y no una enzima con actividad en los dos sustratos.

Emes y Vining (1970), purifican la enzima de Streptomyces verticillatus en 7 pasos que incluyen un tratamiento con calor después de la ruptura de las células para termocoagular la proteína, un tratamiento con protamina, dos precipitaciones con sulfato de amonio, una diálisis y una cromatografía en columna de intercambio aniónico. En la tabla 2.13 se puede observar que se logra una purificación baja (53 veces), con un 16% de recuperación de la actividad.

TABLA 2.13. Purificación de PAL de Streptomyces verticillatus.

Paso	Activ. Tot. (U)	Recuperac. de la activ. (%)	Prot. Tot. (mg)	Recup. de la prot. (%)	Activ. Esp. *	Purificación
1. Enzima cruda	3.29	100	6,580	100	0.50	1.0
2. Tratamiento con calor	2.86	87	2,405	37	1.19	2.4
3. Tratamiento con protamina	2.58	79	1,890	29	1.37	2.7
4. Precipitación sulfato de amonio	1.74	53	371	6	4.68	9.4
5. Diálisis	1.47	45	390	6	3.77	7.5
6. DEAE-celulosa	0.51	16	47	0.7	10.90	22.0
7. Precipitación sulfato de amonio	0.51	16	19	0.3	26.6	53.0

*La actividad específica está expresada como U/mg proteína, en donde las unidades son las micromoles de producto formado por minuto a 25°C.

La electroforesis de la enzima purificada en geles de poliacrilamida presenta 12 distintas zonas de proteína, indicando que la muestra es heterogénea (una mezcla de proteínas). Las mejores preparaciones fueron menos activas por un orden de magnitud que las muestras purificadas de papa, Ustilago hordei o Rhodotorula glutinis.

El proceso de purificación de la enzima de Rhizoctonia solani (Kalghatgi y Subba Rao, 1975) tiene la ventaja de que se lleva a cabo en 5 pasos. Este proceso incluye una precipitación selectiva con acetona, un tratamiento con protamina, una precipitación con sulfato de amonio y una cromatografía en columna de intercambio aniónico. En la tabla 2.14 es posible observar que se obtiene una purificación de 227 veces, con un 18%

de recuperación de la actividad enzimática.

TABLA 2.14. Purificación de PAL de Rhizoctonia solani.

Paso	Proteína Total (mg)	Activ. Total (mU)	Activ. Espec. (mU/mg)	Recup. (%)	Purif. (veces)	PAL/TAL
1.Extracto crudo	3,022	9,096	3.0	100	1.0	6.3
2.Precipitación con sulfato de protamina	180	7,134	39.6	78.4	13.2	5.9
3.Precipitación con sulfato de amonio (0-55%)	120	6,170	51.4	68.3	17.1	6.4
4.Precipitación con acetona	62	5,921	94.9	65.1	31.6	6.0
5.Cromatografía DEAE-celulosa	2	1,632	680.0	17.9	227.0	6.5

* Una unidad de enzima es la cantidad de enzima que cataliza la formación de una micromol de producto por minuto.

La preparación final generó una sola banda en la electroforesis en gel de poliacrilamida. Las actividades PAL y TAL no pudieron ser separadas en el proceso de purificación. La preparación final presenta el mismo pH óptimo y temperatura óptima para ambas actividades. Además, la relación PAL/TAL permanece casi constante durante todo el proceso. Se postula que Rhizoctonia solani produce una sola enzima con las dos actividades, por lo que se confirman los resultados de Parkhurst y Hodgins, 1971).

Se propone una modificación muy útil en el tratamiento con sulfato de protamina. Se asegura que en este trabajo es la primera vez que una enzima se precipita cuantitativamente con sulfato de protamina y se reextrae con una buena recuperación. Esto resulta en una purificación de 13 veces en un solo paso.

2.4 PROPIEDADES DE LA ENZIMA FENILALANINA AMONIO-LIASA

2.4.1. Peso molecular.

En la tabla 2.1 se muestran los valores de pesos moleculares de la enzima de varias fuentes, recopilados de la revisión bibliográfica.

2.4.2. pH y temperatura óptimos. En la tabla 2.15 se compara el del pH y de la temperatura de PAL de diversas fuentes.

TABLA 2.15. Efecto del pH y temperatura en la actividad de PAL de diferentes fuentes.

Fuente	pH ópt.	T ópt. (°C)	Estabilidad a diferentes pH	Estabilidad Térmica	Referencia
Papa	8.75	-	-	-	Havir y Han- son, 1968
<u>Hordeum vulgare</u>	8.8-9.2	-	-	-	Koukol y C.E. 1961
<u>Rhodotorula glutinis</u>	8.75	-	-	No pérdida de activ. a 50°C por 10 min.	Abell y Shen
"	8.8	-	-	-	Yamada et al. 1981*
"	8.5	49	-	-	Wieder et al. 1979
"	9.0	-	Mayor estab. a pH 7.0	Estable hasta 50°C. Arriba de 60°C se destruye	Ogata et al. 1967
<u>Streptomy- ces verti- cillatus</u>	9.1	-	Muy estable a pH 6.5 a 8.5	No pierde activ. a 70°C por 15min. A 80°C se inac- tiva.	Emés y Vining 1970
<u>Rhizoctonia solani</u>	8.8	44-46	-	Retiene toda su actividad a 60°C durante 1 hora	Kalghatgi y S. Rao 1975

* Se reporta también que el pH óptimo para la reacción inversa (producción de fenilalanina) es 10.0.

2.4.3. Especificidad, inhibidores y estructura.

En el estudio de Havir y Hanson (1968), con PAL de papa se observó que los agentes que reaccionan con grupos sulfhidrilo no causan inhibición en la enzima, pero sí los agentes que reaccionan con grupos carbonilo y que la inhibición por borohidruro de sodio es contrarrestada por L-fenilalanina y cinamato. Además, se descartó la presencia de un grupo prostético que absorbiera la luz, como piridoxal fosfato.

De acuerdo con los resultados anteriores se considera que un grupo carbonilo toma parte en el proceso catalítico y se propone el mecanismo siguiente: Se forma un intermediario carbonil-amina que produce un intermediario carbonil-amonio y cinamato. La hidrólisis del grupo carbonil-amonio produce amonio libre. Experimentos realizados aportan evidencia de la formación del intermediario enzima-amonio, como se muestra en la figura 2.4.

En los experimentos realizados se encuentra que no es necesaria la participación de cofactores ni de iones metálicos en la reacción enzimática. Ninguno de los metales y agentes quelantes evaluados tienen un efecto significativo en la actividad de la enzima.

Koukol y C.E. (1961), evalúan la capacidad de la enzima fenilalanina deaminasa extraída de Hordeum vulgare de actuar en otros sustratos (D-fenilalanina, DL-acido aspártico, L-histidina,

L-alanina, glicina, 3,4-dihidroxifenil-DL-alanina, L y D tirosina, DL-tirosina, DL-leucina, L-cisteina y L-triptofano). La enzima resulta ser específica para L-fenilalanina.

También evalúan el efecto de diversos metales en la actividad de la enzima. Sus resultados revelan que ninguno de los metales probados estimula la actividad enzimática y que algunos de ellos la inhiben (Cu, Zn, Ca, Cd, Hg).

Todos los agentes que reaccionan con grupos sulfhidrilos causan inhibición de la enzima, lo que resulta ser una clara evidencia de que la enzima tiene un grupo sulfhidrilo en el sitio activo.

Existen diferencias en cuanto a la especificidad de sustrato y los compuestos que causan inhibición en la enzima de diferentes cepas del mismo microorganismo. En la tabla 2.16 se muestran los resultados obtenidos con diferentes cepas de Rhodotorula glutinis.

En el estudio efectuado por Hodgins (1971), se realizan experimentos con Rhodotorula glutinis que muestran la inhibición de la enzima por agentes que reaccionan con grupos carbonilos (borohidruro y cianuro). Al tratar la enzima con cianuro de sodio radiactivo y después de hacer la hidrólisis enzimática, se observa que la radiactividad es recuperada principalmente como ^{14}C -Ac. aspártico y que el grupo 4-carboxilo de este aspartato es

radiactivo.

TABLA 2.16. Especificidad de sustrato e inhibidores en PAL de Rhodotorula glutinis.

Especificidad	Inhibidores	Referencia
Activa con L-fen y L-tir	Ac. t-cinámico p-cumárico y D-fen	Abell y Shen
Activa con L-fen y L-tir	Ag. que reaccionan con gpos. -SH, Fe, Cu, Ca, Co, Ni, Zn, Hg.	Ogata et al. 1967
Activa con L-fen, L-tir, DL-3-hidroxi-fenilalanina y D-fen.	Ac. t-cinámico Ac. fenil propiólico Ag. que reaccionan con grupos carbonilos	Hodgins 1971

Por otro lado, la hidrólisis de la enzima inactivada con borohidruro de sodio marcado da alanina radiactiva. Esta evidencia indica que una dehidroalanina se encuentra en o cerca del sitio activo de la enzima. El papel exacto de este grupo no se conoce, se piensa que puede funcionar como un centro electrofílico. El beta-carbono puede ser atacado por el grupo amino del sustrato.

Otros estudios (Gilbert y Jack, 1981) revelan la presencia de una región hidrofóbica en la superficie de la enzima de Rh. glutinis y que esta podría ser la región que se une al anillo aromático de la fenilalanina.

Se sugieren dos posibles estructuras para la enzima: una,

en la que la enzima existe como dos unidades principales unidas por una pequeña región que no tiene una importante estructura terciaria, y que es por lo tanto mas susceptible a las proteasas. La otra alternativa propuesta es que la enzima esta compuesta por una estructura grande, principal (PM de 65,000), y otra región de estructura menos ordenada.

Se hicieron numerosas modificaciones a la enzima y todas fueron inefectivas para protegerla contra la inactivación proteolítica.

En el trabajo de Parkhurst y Hodgins (1972), se constató que la enzima de Sporobolomyces pararoseus solo es activa con L-fenilalanina y L-tirosina. Experimentos realizados muestran que la enzima es inactivada por compuestos que reaccionan con grupos carbonil-amino y sulfhidrilo y por algunos análogos al sustrato.

Se observa que la inactivación con cianuro radiactivo resulta en la formación, después de una hidrólisis ácida, de ácido aspártico radiactivo, lo que indica la existencia de una dehidroalanina con una función esencial en el proceso de catálisis.

El ácido trans-cinámico y la DL-2-hidroxfenilalanina protegen a la enzima contra la inactivación con cianuro, indicando que la dehidroalanina se localiza en el sitio activo.

Otros experimentos indican que la dehidroalanina se une con

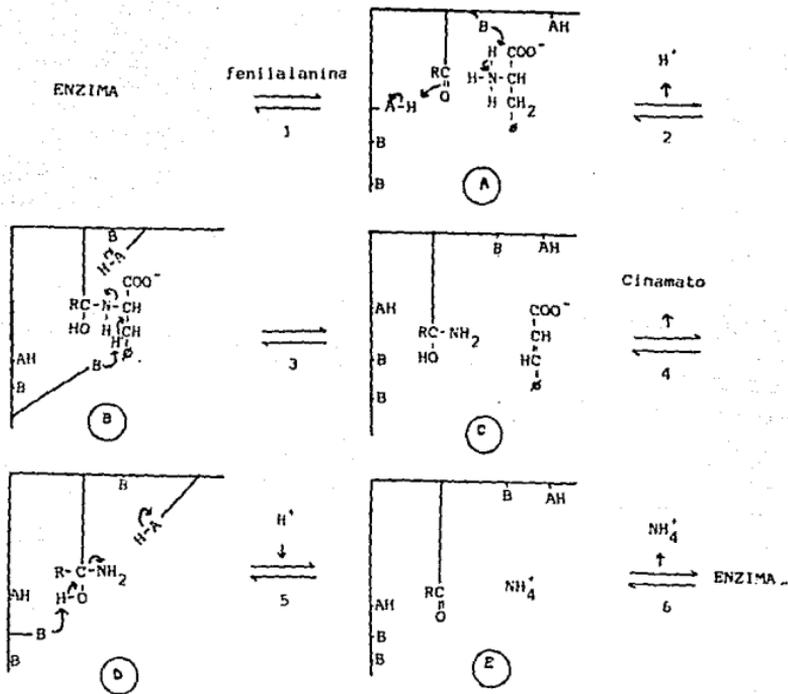


FIGURA 2.4. Mecanismo de reacción postulado para la enzima producida a partir de tubérculos de papa. Los estados de ionización que se muestran son los obtenidos a pH 8.7 (óptimo de la enzima). Se asume que los procesos de ionización son muy rápidos y por lo tanto la ganancia y pérdida de iones hidronio (H^+) por los grupos básicos (B) y ácidos (A) en la reacción no se muestran como pasos separados.

la porción alifática del sustrato (amónio) y que de esta unión se forma un intermediario enzima-amónio. Los resultados de inhibición indican también la presencia de grupos sulfhidrilo en el sitio activo, cuyo papel en el proceso catalítico no ha sido esclarecido. Se sugiere que ayudan a separar protones de la molécula de sustrato.

Se propone un mecanismo en el que el beta carbono de la dehidroalanina se une al grupo amino del sustrato. Después se separa el cinamato, formándose el intermediario enzima-amónio que puede dar amónio libre o formar fenilalanina, si se le adiciona ácido cinámico (hay que recordar que la reacción es reversible).

Emes y Vining (1970), observan que la enzima de Streptomyces verticillatus es activa con orto-, meta-, y p-fluoro-, p-cloro-, y p-metil-fenilalanina. No actúa con D-fenilalanina ni con L-tirosina.

Con excepción del manganeso, las sales de metales pesados inhiben la enzima. La actividad enzimática también se inhibe con algunos análogos al sustrato y al producto. La enzima no exhibe requerimientos metálicos y los agentes quelantes tienen un efecto muy pequeño en la reacción. El efecto de compuestos que reaccionan con grupos sulfhidrilo de diferente origen parece ser variable.

La marcada inhibición de la enzima por compuestos que

reaccionan con grupos carboxilo (borohidruro, bisulfito, cianuro) sugieren un mecanismo similar al propuesto para la enzima de papa (Havir y Hanson, 1968).

Kalghatgi y Subba Rao (1975), trabajaron con fenilalanina amonio-liasa de Rhizoctonia solani. Sus experimentos demuestran que la enzima desamina otros sustratos además de la L-fenilalanina (L-tir, m-tir, 3,4,-dihidroxifenilalanina, p-fluorofenilalanina).

También observan que la enzima se inhibe en forma irreversible por agentes que reaccionan con grupos carboxilo y también por algunos compuestos aromáticos. Los estudios con inhibidores muestran que solo una molécula de inhibidor es capaz de unirse a una molécula de enzima.

Otros inhibidores son D-fenilalanina, ac. cinámico, ac. caféico, ac. p-cumárico, ac. dihidro caféico, ac. fenilpirúvico, y algunos metales (Zn, Fe, Hg, Co).

La electroforésis de la enzima desnaturalizada genera dos bandas distintas (alfa y beta). Los valores de pesos moleculares obtenidos para las subunidades son para alfa de 70,000 y para beta de 89,000. En vista de que el peso molecular calculado para la enzima es de 330,000, se propone la existencia de dos subunidades alfa y dos beta.

2.4.4. Estequiometría de la reacción

Los resultados de los experimentos de Kouckí y C.E. (1961) con la enzima de Hordeum vulgare muestran que la conversión de 0.70 micromoles de L-fenilalanina producen 0.69 micromoles de ácido trans-cinámico y 0.66 micromoles de amonio.

Ogata et al. (1967) también efectúan estudios sobre la estequiometría de la reacción de la fenilalanina amonio-liasa de Rhodotorula glutinis. La enzima cataliza la formación de cantidades equimolares a la fenilalanina consumida.

2.4.5. Síntesis de la enzima.

Toda la literatura consultada coincide en que la síntesis de la enzima es "de novo", es decir, que no proviene de un precursor inactivo, sino que se sintetiza en respuesta a un estímulo externo, que es causado por el inductor.

Wick y Willis (1982), presentan experimentos en los que durante el crecimiento de Rhodotorula glutinis, en la producción de la enzima, se añade leucina marcada y se observa que es incorporada a la proteína de la levadura, que había sido precipitada con suero anti PAL y analizada por medio de electroforésis, observándose que la proteína marcada tiene un peso molecular de 83,000, que es idéntico al reportado para una de las subunidades de la enzima. Con ésto se demuestra que la enzima es sintetizada

"de novo", en respuesta al inductor. En ausencia del inductor no hay incorporación de leucina marcada en la subunidad de la enzima.

2.4.6. Producción de pigmentos carotenoides.

Se sabe que las levaduras del género Rhodotorula producen pigmentos carotenoides; en el trabajo reportado por Costa et al. (1987) se describe la producción de β -caroteno por Rh. glutinis en la fase estacionaria de crecimiento. Los resultados muestran que una vez que se alcanza esta fase, la producción de pigmento se mantiene casi constante al continuar la fermentación; sin embargo, si las células se transfieren a agua destilada y se agitan por 24 horas, la concentración del pigmento aumenta de 4.2 a 4.8 veces.

Otros autores reportan que cuando las células se mantienen a 5°C, se bloquea la producción de pigmentos carotenoides rosas (toruleno y torularodeno) y se incrementa la producción de beta-caroteno (pigmento amarillo), quedando las células de un color naranja-rojizo. Se sugiere entonces que cuando las células están sintetizando carotenoides en agua destilada, con la carencia de sustratos, la hidrogenación de gamma-caroteno a toruleno se bloquea y se produce beta-caroteno.

Por otra parte, se ha encontrado una aplicación de lo anterior al utilizar a las levaduras como alimento para salmones, ya que se ha visto que en las costas de Noruega y Escocia, los

salmones tienen la carne blanca, debido a que no tienen acceso a la alimentación que normalmente hace que la coloración de su carne sea rosa. Para corregir esta deficiencia, se agregan pigmentos sintéticos a la dieta del salmón.

Otros investigadores hicieron pruebas alimentando a los salmones con levaduras productoras de carotenos y observaron que el pez absorbe el pigmento natural mas fácilmente que el sintético; debido a esto muchas compañías han mostrado interés en la utilización de las levaduras para colorear camarón, además de salmón.

2.4.7. Relación entre PAL y la síntesis de pigmento rojo

En el trabajo reportado por Gilbert y Tully (1982), se hicieron mutaciones de una cepa de Rhodospiridium toruloides y se obtuvieron dos cepas mutantes incapaces de utilizar L-fenilalanina como fuente de carbono o como fuente de nitrógeno. Una de ellas con niveles de actividad equivalentes al 2% de la cepa original, y la otra sin actividad enzimática.

Ambas cepas siguieron produciendo el pigmento rojo, indicando que la enzima no está involucrada en la biosíntesis del pigmento. Esto contradice a Ogata et al. (1967), que sugieren la participación de la enzima en la síntesis, pero sin mostrar ningún experimento que confirme esa suposición. También contradice a Hodgins (1971), en donde se asegura que la producción de la

enzima va acompañada del cambio de coloración de las células de amarillo a rojo y que una vez que esta transición se ha completado, se debe llevar a cabo la cosecha de células, ya que es el punto de mayor actividad enzimática.

2.4.8. Intermediarios en el catabolismo de la L-fenilalanina.

Marusich et al. (1981), realizaron fermentaciones con L-fenilalanina doblemente marcada (tritiada en el carbono 4 del anillo aromático y marcada uniformemente con ^{14}C) como única fuente de carbono, y cosecharon las células en la fase logarítmica para analizarlas por cromatografía con el objeto de conocer la secuencia catabólica de la L-fenilalanina en *Rh. glutinis*. La secuencia que propusieron se muestra en la figura 2.5.

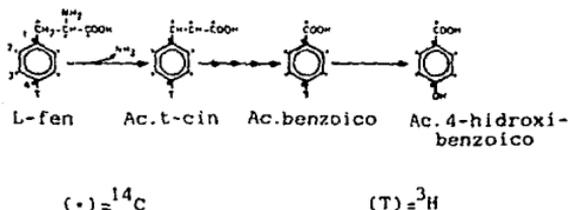


FIGURA 2.5. Intermediarios en el catabolismo de la L-fenilalanina en *Rh. glutinis*

2.4.9. Propiedades cinéticas.

En el estudio de Havir y Hanson (1968), se observa que el comportamiento cinético de la enzima de tubérculos de papa no obedece a la cinética establecida por Michaelis-Menten: a medida

que la concentración de sustrato aumenta, la K_m aparente aumenta de 0.038 a 0.26 mM, y la V_{max} aparente duplica su valor.

Se reporta que la D-fenilalanina, que es un sustrato muy pobre para la enzima, actúa como un inhibidor competitivo. En presencia de este compuesto sí se observa la cinética de Michaelis-Menten. Esto se atribuye más bien a interacciones alostéricas que a la presencia de una serie de isoenzimas.

En el estudio de Koukol y E.C.(1961), se realizan estudios sobre la fenilalanina deaminasa de Hordeum vulgare. En experimentos preliminares se había encontrado que el ácido trans-cinámico inhibe la enzima. Así, se escogieron las condiciones de ensayo de tal forma que el producto formado nunca alcanzara concentraciones inhibitorias. Los resultados muestran que la velocidad de formación de producto es proporcional a la cantidad de enzima añadida, en un rango de 6 a 85 unidades de enzima, y que la formación de producto catalizada por 60 unidades de enzima es lineal por un período de 2 horas. En otros experimentos se evalúa el efecto de la concentración de sustrato. Los resultados se grafican de acuerdo con Lineweaver y Burk y se encuentra un valor de K_m de $1.7 \times 10^{-3}M$.

Ogata et al. (1967) estudian la enzima producida por Rhodotorula glutinis y reportan que la actividad enzimática es directamente proporcional a la concentración de enzima en un rango de 0 a 600 microgramos. En la tabla 2.17 se muestra una

comparación de las propiedades cinéticas de la enzima de diferentes cepas de Rh. glutinis. En esta tabla se observa que los datos reportados son del mismo orden, excepto el de Ogata et al. (1967), que es mucho mayor.

TABLA 2.17. Propiedades cinéticas de PAL de Rh. glutinis.

L-fenilalanina		L-Tirosina		Ref.
Km (μ M)	Vmax	Km (μ M)	Vmax	
2100	-	-	-	Ogata et al 1967
250	1.4 mol/min/mg	150	0.7 mol/min/mg	Abell y Shen
250	1.4 mol/min/U	150	0.67 mol/min/U	Hodgins 1971*
500	1.4 mol/min/g	-	-	Wieder et al 1979
570	-	-	-	Marusich et al 1981

* U= mol cinamato/ min a 30°C.

Los experimentos realizados por Kalghatgi y Subba Rao (1975) con PAL de Rhizoctonia solani muestran desviaciones significativas de la cinética de Michaelis-Menten. En las gráficas de Lineweaver y Burk se obtiene una curva cóncava hacia abajo. El valor de Km aparente aumenta de 0.18 mM a 5 mM cuando se incrementa la concentración de sustrato. Se reporta un comportamiento similar con L-tirosina.

2.5 ANTECEDENTES DE APLICACIONES DE FENILALANINA AMONIO-LIASA A FENILCETONURICOS.

Hasta el momento se ha demostrado que el único tratamiento efectivo contra la fenilcetonuria son las dietas con bajo

contenido de fenilalanina. Estas dietas son difíciles de seguir y no evitan la elevación de fenilalanina en la sangre en episodios de fiebre e infección.

Existen además pacientes fenilcetonúricos atípicos, con defectos en la biosíntesis de los cofactores de la enzima fenilalanina hidroxilasa, que no responden al tratamiento con dieta. Otra alternativa a este tratamiento es la utilización de una terapia con enzimas. Sin embargo, existen problemas con el aislamiento y purificación de la enzima fenilalanina hidroxilasa de tejidos de mamíferos. Además, esta enzima requiere de cofactores. En cambio, la enzima fenilalanina amonio-liasa no requiere de cofactores y puede ser obtenida con mayor facilidad de plantas o microorganismos (Bourget y Chang, 1986). El hígado convierte el producto (ac. t-cinámico) en ac. benzoico, y este es luego excretado por la orina principalmente como ácido hipúrico (Snapper et al., 1940), por lo que el tratamiento con PAL elimina la fenilalanina sin riesgos de toxicidad de los productos.

A continuación se describen algunas formas de aplicación terapéutica de la enzima fenilalanina amonio-liasa en pacientes con fenilcetonuria reportados en la literatura.

2.5.1. Tratamientos orales

2.5.1.1. PAL inmovilizada en cápsulas de gelatina

Hoskins et al. (1980), proponen la administración de fenil-

alanina amonio-líasa parcialmente purificada en forma oral, dentro de cápsulas de gelatina para remover en forma selectiva la fenilalanina de las proteínas de una dieta normal antes de ser absorbidas.

Se efectúan experimentos administrando 200 U (no reportan cómo expresan las unidades de actividad) después de cada alimento, por un período de 12 días, encontrándose una disminución de los niveles de fenilalanina en sangre a una cuarta parte del valor inicial en algunos pacientes.

Se observa que el nivel de fenilalanina en sangre en pacientes fenilcetonúricos varía mucho, lo que hace difícil la interpretación de las pruebas. Igualmente existe mucha variabilidad al medir la disminución de fenilalanina en sangre en un mismo paciente y una variabilidad mucho mayor entre pacientes diferentes.

La enzima se obtiene de una cepa de Rh. glutinis, que no es tóxica, de esta manera no existen efectos adversos por la ingestión de la enzima; además, no se presentan problemas inmunológicos, como en el caso de enzimas inyectadas.

El tratamiento oral con la enzima es equivalente a la ingestión diaria de 3 g de ácido trans-cinámico. Este ácido se encuentra en pequeñas cantidades en todas las plantas y también como aditivo y constituyente de algunos cosméticos. Tiene muy baja to-

xicidad (DL 50 en promedio de 3.4 g/Kg para ratas) y no es embriotóxico. Es metabolizado rápidamente en mamíferos y excretado principalmente como ácido hipúrico.

La gran variabilidad de los resultados obtenidos hace difícil la aplicación de este método, ya que no se asegura su eficacia en todos los pacientes.

Para que la enzima ejerza su acción en una forma adecuada, es necesario que una vez que el material alimenticio digerido salga del estómago, sea neutralizado en el duodeno, que sea en ésta parte donde se disuelvan las cápsulas para que se libere la enzima, y que la acción peristáltica sea suficientemente fuerte para asegurar un mezclado adecuado de la enzima con el contenido duodenal. Es claro que no en todos los individuos se dan estas condiciones, por lo tanto este método tiene una aplicación muy limitada.

2.5.1.2. PAL microencapsulada.

En el estudio de Bouget y Chang (1986), se efectúa la microencapsulación de la enzima y se administró oralmente a ratas con fenilcetonuria.

Se hicieron varios experimentos en donde se aplica el tratamiento con microcápsulas que contienen diferentes cantidades de enzima. La administración de 5 unidades de enzima inmovilizada

dentro de las células artificiales diariamente disminuye la concentración de fenilalanina en plasma hasta los niveles normales en 6 días. Las ratas fenilcetonúricas que recibieron el tratamiento no mostraron signos de comportamiento anormal o pérdida de peso en comparación con las ratas fenilcetonúricas no tratadas.

La inmovilización de la enzima en células artificiales ofrece varias ventajas, ya que queda protegida de otras enzimas proteolíticas y cambios en el pH del tracto gastrointestinal. Las células artificiales pueden actuar sobre la fenilalanina de los alimentos ingeridos, así como en la fenilalanina que se difunde de la sangre al tracto gastrointestinal. Otros experimentos demostraron también que la enzima mantiene un 30% de su actividad a los valores fisiológicos de pH.

2.5.1.3. Utilización de células permeabilizadas de Rhodospiridium toruloides.

Gilbert y Tully (1985) proponen la administración oral de células permeabilizadas de Rhodospiridium toruloides para disminuir la concentración de fenilalanina en el intestino delgado, bajando así los niveles del aminoácido en el plasma.

En trabajos anteriores ya se ha reportado la susceptibilidad de la enzima libre a otras enzimas proteolíticas, y los intentos inútiles que se han hecho de modificarla químicamente para darle protección.

En cambio, las células permeabilizadas protegen a la enzima de la acción de las enzimas del tracto digestivo (tripsina y quimiotripsina), pero permiten la difusión de sustratos y productos.

Los experimentos realizados indican que la enzima dentro de las células es mucho más estable al ataque proteolítico en comparación a los extractos de enzima libre. La tripsina resulta ser más activa que la quimiotripsina contra la enzima protegida y lo contrario sucede con la enzima libre.

La cinética de la degradación de la enzima protegida muestra dos fases: al inicio hay una degradación muy lenta y se llega a un punto en donde súbitamente comienza a degradarse con mucha rapidez. Esto sugiere que durante la inactivación inicial lenta, la pared celular de la levadura es degradada y cuando se llega al punto entre las dos fases, la célula se rompe, liberando la enzima que es degradada a la misma velocidad que la enzima libre.

Las propiedades protectivas de las células permeabilizadas fueron similares sin importar las condiciones de fermentación del microorganismo. Algunas células fueron liofilizadas. Una vez que fueron rehidratadas se vió que mantenían la propiedad de proteger la enzima.

Se efectúa la comparación de las propiedades cinéticas de la enzima libre y la contenida en las células permeabilizadas. El va-

lor de Km para la fenilalanina (600 micromolar) es idéntico para ambas, y se compara con el dato establecido para la enzima purificada.

El efecto de ambas enzimas en los niveles de fenilalanina en el jugo duodenal se muestra en la tabla 2.18, en donde se ve muy claramente que las células permeabilizadas protegen a la enzima y permiten su funcionamiento.

Para que sea efectiva esta protección "in vivo", es necesario elevar los niveles de actividad enzimática en Rh.toruloides. Esto puede lograrse con ingeniería genética, teniendo así una buena alternativa para el tratamiento oral de la fenilcetonuria con enzimas.

2.5.1.4. Atrapamiento de PAL en fibra de seda para protegerla del ataque proteolítico.

Inoue et al. (1986) atraparon la enzima en una proteína de uso oral, fibra de seda, para protegerla del ataque proteolítico de otras enzimas.

Se hicieron experimentos comparando algunas propiedades de la enzima libre y de la enzima atrapada. Se demostró que la estabilidad en almacenamiento es mayor en la enzima atrapada, y que ambas tienen valores muy similares de Km y de pH óptimo. La enzima atrapada en fibra de seda muestra una resistencia mayor

"in vitro" al ataque de varias proteasas (tripsina y quimotripsina) en comparación con la enzima libre.

Para evaluar la actividad de las enzimas "in vivo", se midió la concentración del producto, ácido trans-cinámico en el plasma.

TABLA 2.18. Efecto de PAL en los niveles de L-fenilalanina en el jugo duodenal.

Reacción	Concentración del aminoácido (mM) a intervalos de tiempo (min)				
	0	10	30	60	120
jugo duodenal	0.52	0.71	0.90	1.12	1.35
jugo duodenal + enzima libre	0.48	0.72	0.86	1.02	1.25
jugo duodenal + cél. permeab.	0.57	0.46	0.24	0.13	0.10

Se hicieron experimentos previos en donde se administró ac. cinámico en forma oral a ratas, y se observó que es absorbido a la circulación sanguínea en donde alcanza un máximo nivel a los 5 - 10 minutos, y luego desaparece rápidamente del plasma. Asimismo, la vida media en plasma de ac. cinámico inyectado resulta ser de 10 a 15 minutos. Estos resultados sugieren que es posible estimar la actividad de la enzima en el tracto intestinal midiendo frecuentemente el nivel de producto en el plasma.

Se inyectaron varias enzimas y L-fenilalanina en el duodeno de las ratas, observándose que cuando se utiliza la enzima inmo-

vilizada, el cinamato en plasma tiene una vida de 45 minutos.

Estas determinaciones revelan que la enzima atrapada, pero no su forma libre, degrada la fenilalanina presente en el tracto intestinal, en ratas normales. No se hicieron estudios en ratas con fenilcetonuria, sin embargo, este estudio provee un buen prospecto de terapia oral para la fenilcetonuria.

2.5.2. Enzimas inmovilizadas para terapia extracorporal

En la inmovilización extracorporal, la sangre del paciente circula por un reactor y luego es regresada en un proceso que requiere anticoagulación con heparina.

Las ventajas de la utilización de este método son que la enzima no esta sujeta a inactivación metabólica, y que no es procesada por el sistema inmunológico. Además, por lo general las enzimas se vuelven más estables con la inmovilización, y se pueden utilizar varias veces. Esto hace que su utilización sea segura y económica.

2.5.2.1. Reactores con PAL inmovilizada en fibras huecas.

Ambrus et al. (1982), proponen el uso de reactores con fenilalanina amonio-liasa inmovilizada para disminuir "in vivo" la concentración de fenilalanina en sangre. Las fibras empleadas son impermeables a las moléculas de enzima, pero permiten la di-

fusión de fenilalanina de la sangre.

En este estudio se realizan experimentos para evaluar su seguridad para uso clínico utilizando perros y chingos con hiperfenilalaninemia inducida. Los animales fueron anestesiados y heparinizados antes de la incorporación del reactor a la arteria y vena femoral.

En los experimentos realizados se observa que la enzima desamina rápidamente la fenilalanina al inicio: en 30 minutos la concentración de fenilalanina disminuye un 84% del valor inicial, manteniéndose constante a partir de este momento y hasta los 120 minutos, cuando se desmontó el reactor. La concentración de L-tirosina no sufrió cambios significativos durante el experimento. El nivel de glóbulos blancos, glóbulos rojos y plaquetas no cambió durante 2 horas de tratamiento.

No se observan reacciones fisiológicas o inmunológicas desfavorables al repetir la aplicación de los reactores al mismo animal. El producto de la reacción, ac. t-cinámico, es regresado a la circulación, metabolizado y excretado como ácido hipúrico.

Estos reactores no ofrecen ninguna ventaja a individuos que han seguido una dieta baja en fenilalanina y que tienen la enfermedad controlada. Sin embargo, cuando la concentración de fenilalanina aumenta debido a fiebre o infecciones, la aplicación de estos reactores es muy útil para disminuir rápidamente los

niveles del aminoácido.

Quizás la más importante aplicación de este tratamiento es en mujeres fenilcetonúricas embarazadas (que por su estado tienen un nivel alto de fenilalanina) para prevenir daños al feto, sin riesgos para ninguno de los dos.

2.5.2.2. Reactores enzimáticos multitubulares.

Con otro reporte del mismo grupo, Ambrus et al. (1978) describen la utilización de reactores enzimáticos con fenilalanina amonio-liasa inmovilizada evaluados "in vitro" e "in vivo" para la disminución de concentración de fenilalanina en la sangre.

Se comparan varios tipos de reactores preparados con tubos de nylon, con diferente cantidad de enzima, a diferentes velocidades de flujo y a diferentes tiempos. Las mejores corridas disminuyen un 84% de la concentración de fenilalanina inicial en experimentos "in vitro", aunque la información de este artículo es bastante limitada.

Se observa que la velocidad de flujo y el volumen circulado tienen un efecto pequeño en la capacidad de los reactores de disminuir la concentración de fenilalanina.

Después se efectúan pruebas "in vivo" con perros heparinizados con fenilcetonuria experimental (administrando previamente

vía oral altas cantidades de fenilalanina y p-clorofenilalanina, un inhibidor de la enzima fenilalanina hidroxilasa). A los 15 minutos de tratamiento se presenta una disminución del 82% de la concentración inicial de fenilalanina, después de 30 minutos de tratamiento la concentración se eleva lentamente, pero se mantiene un 40% del valor inicial. A las dos horas se suspende el tratamiento, y la concentración aumenta muy ligeramente, alcanzando en 5 días una concentración del 50% del valor inicial.

La elevación de fenilalanina que sigue al brusco descenso de la concentración inicial se debe probablemente a la liberación del aminoácido de los eritrocitos y tejidos, para reestablecer el equilibrio entre la fenilalanina circulante y la almacenada. La última elevación lenta del aminoácido se debe a la administración continua de L-fenilalanina y de p-clorofenilalanina.

La utilización de estos reactores representa una buena alternativa como tratamiento para la disminución rápida de fenilalanina en sangre en pacientes fenilcetonúricos con estados de fiebre, infección y embarazo.

2.5.3. Otras aplicaciones clínicas de la enzima

2.5.3.1. Utilización de fenilalanina amonio-liasa para el tratamiento de tumores.

Abell et al. (1973), evaluaron la efectividad de la enzima contra tumores en ratones. La enzima administrada en concentra-

ciones de 300 unidades/Kg de peso disminuye rápidamente los niveles de L-fenilalanina y L-tirosina en sangre, inhibiendo el crecimiento de los tumores, y produciendo curas en el 40% de los ratones.

Las preparaciones de enzima parcialmente purificada administradas junto con dietas que contienen bajos niveles de fenilalanina resultan ser los tratamientos más efectivos. Los mejores resultados se obtienen cuando la enzima se administra cada 8 horas durante 5 días.

Los ratones presentan una pequeña pero significativa disminución de peso corporal a los 6 días de tratamiento, debida quizás a la falta de fenilalanina. Sin embargo se sabe que los mamíferos tienen la capacidad de utilizar fenilpiruvato, un análogo de la fenilalanina, como un sustituto del aminoácido esencial. Consecuentemente, si se manipulan cuidadosamente los niveles de fenilalanina en plasma a través del tratamiento con fenilalanina amonio-liasas y con una dieta baja en el aminoácido y se suplementa con fenilpiruvato, es posible inhibir el crecimiento celular de neoplasmas sin afectar adversamente al huésped.

En el trabajo efectuado por Fritz et al. (1976), se efectúan experimentos con algunas especies de mamíferos (ratones, chongos y ratas), algunos sanos y otros con tumores.

Se aplican inyecciones de fenilalanina amonio-liasa a los animales y se detecta la disminución en la concentración de fenilalanina y tirosina en plasma a diferentes tiempos después de la aplicación de la inyección. También es evaluada la vida media biológica de la enzima, resultando ser de aproximadamente 21 horas después de la aplicación de una sola inyección. Se observa que este valor de vida media es el mismo para los animales sanos y para los que tienen tumores.

Sin embargo, después de varias inyecciones, se observa que la vida media biológica de la enzima disminuye considerablemente (2 horas), especialmente en los animales con tumores, debido a la formación de anticuerpos.

La importancia de este estudio radica en que la efectividad del tratamiento depende significativamente del tiempo de vida media de la enzima. Se propone hacer un estudio en el que se hagan modificaciones a la enzima para disminuir la respuesta inmunógena de los animales aumentando así la vida media biológica enzimática.

Para resolver este problema, Wieder et al., (1979) unen covalentemente la enzima con polietilen glicol. Comparan las propiedades entre la enzima nativa y la modificada y concluyen que hay diferencias en el pH y temperatura óptimos. Además, la enzima modificada parece tener menor actividad y un valor de Km mayor debido quizás a que el sustrato requiere un tiempo mayor para difundirse en la cubierta de polietilen glicol, y llevar a cabo la

reacción.

Sin embargo, la utilización de la enzima modificada resulta muy ventajosa, ya que tiene una vida biológica en la sangre mucho mayor que la enzima nativa, después de una o varias aplicaciones. Tiene una resistencia mucho mayor a enzimas proteolíticas, y reduce sustancialmente los problemas inmunológicos.

2.3.5.2. Utilización de PAL para la determinación simultánea en plasma de fenilalanina y tirosina.

El estudio efectuado por Shen y Abell (1977), demuestra que la enzima fenilalanina amonio-líasa, puede ser utilizada para la determinación cuantitativa en plasma o suero de fenilalanina y tirosina en pacientes fenilcetonúricos.

La determinación se hace midiendo espectrofotométricamente los productos de la reacción de la enzima con los dos sustratos, a una longitud de onda de 290 nm para el ácido trans-cinámico y de 315 nm. para el ácido p-cumárico.

El método es sensible hasta concentraciones micromolares de los dos compuestos y sólo se requieren 20 microlitros de plasma o suero para determinar simultáneamente los dos aminoácidos. Este método puede ser utilizado en la detección de fenilcetonuria o para monitorear la evolución y el control de la enfermedad, ya que es rápido, sensible y requiere muy pequeñas cantidades de sangre.

CAPITULO III

MATERIALES Y METODOS

3.1. ORGANISMOS

Se utilizó una cepa de Sporidiobolus pararoseus NRRL Y-5484.

3.2. MEDIOS DE CULTIVO

Los siguientes medios de cultivo son utilizados en este trabajo:

3.2.1. Medio YM (Yeast Medium)

Este medio contiene extracto de levadura, 0.3%; extracto de malta, 0.3%; peptona, 0.5%; glucosa, 1.0% y agar, 2.0%. No se ajusta el pH, el medio debe ser ligeramente ácido.

3.2.2. Medio A

La composición de este medio es la reportada por Abell y Shen. Contiene extracto de levadura, 0.1%; extracto de malta, 1.0%; L-fenilalanina, 0.1%.

3.2.3. Medio B

Contiene glucosa, 1.5%; extracto de levadura, 0.35% y extracto de malta, 1.4%. Es el medio que resultó óptimo de acuerdo con los resultados del método de Box Wilson.

3.2.4. Medio C

Este medio es el seleccionado finalmente para la producción de la enzima, considerando todos los resultados. Contiene extracto de levadura, 0.35%; extracto de malta, 1.4%; L-fenilalanina, 0.5%.

3.2.5. Medio D

Contiene L-fenilalanina, 1.5%; solución stock de sales (0.001g/ml de NaCl, 0.001112g/ml de $MnSO_4 \cdot H_2O$ y 0.001828g/ml de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$), 1.0%. Utilizado en las mutaciones.

3.2.6. Medio E

Contiene L-fenilalanina, 0.1%, solución stock de sales, 1.0%, y agar, 2.0%. Utilizado en las mutaciones.

3.3. PRESERVACION

3.3.1. Preservación del microorganismo

La cepa es mantenida en medio sólido YM. Se incuba a 30 °C durante una semana, y posteriormente se almacena a 4°C.

3.3.2. Preservación de la enzima

Una vez que fué realizada la permeabilización de las células, se almacenaron a 4°C en dos formas:

- a) Resuspendidas en buffer de fosfatos 0.05M, pH 7.4, con 0.85% de NaCl, con glicerol al 25%.
- b) Liofilizadas (se utilizó una liofilizadora LABONCO (Freeze-Dry-3)).

3.4. FERMENTACIONES

3.4.1. Preparación de inóculos

Los inóculos para experimentos a nivel matraz son preparados en matraces erlenmeyer de 250 ml, conteniendo 100 ml. de medio, que se incuban durante 24 horas a 30°C, con una agitación de 180 rpm en una G 24 Environmental Incubator Shaker (New Brunswick Scientific Co, Inc.)

Por otro lado, se preparan tubos con un mililitro de solución de glicerol al 30% y se esterilizan. Una vez transcurrido el tiempo de fermentación, se agrega un mililitro de inóculo a cada tubo y posteriormente se congelan. Estos inóculos se utilizan en experimentos con varios matraces, donde es necesario poner aproximadamente la misma cantidad de células en cada matraz.

Todos los experimentos a nivel matraz (excepto el de la influencia de la aireación en el crecimiento del microorganismo, punto 3.4.4.) se llevan a cabo en matraces de 250 ml. con 100 ml. de medio, a 30°C y 180 rpm.

Para los estudios en fermentador el inóculo se prepara en matraces erlenmeyer de 250 ml. conteniendo 50 ml. de medio que se incuban a 30°C y 180 rpm, por 24 horas. En este caso el inóculo corresponde al 10% del volumen del fermentador.

3.4.2. Fermentación para producción de biomasa

Las fermentaciones se llevan a cabo en matraces erlenmeyer,

en las condiciones ya descritas. Para su análisis se efectúan las siguientes determinaciones:

3.4.2.1. Producción de biomasa

El crecimiento microbiano se determina midiendo la densidad óptica del medio a 650nm, utilizando un espectrofotómetro PERKIN-ELMER (Lambda 3A UV/VIS).

3.4.2.2. pH. Utilizando un potenciómetro Beckman 41.

3.4.2.3. Cuenta de células

Se realiza utilizando una cámara de Neubauer, que es un portaobjetos especial cuadrulado en su parte central. Se colocan unas gotas del medio de cultivo en la cámara, se coloca encima el cubreobjetos, y se cuentan las células por lo menos en 10 cuadros. Se sabe que cada uno de los 25 cuadros centrales tiene un volumen de 0.004 mm³; con este dato se obtiene el número de células por mililitro de medio de cultivo.

3.4.3. Optimización del medio de cultivo para producción de biomasa. Método de Box Wilson.

En el punto 4.8. están detallados los pasos que se siguieron y los experimentos que se realizaron.

3.4.4. Influencia de la aireación en el crecimiento del microorganismo.

Los experimentos realizados se describen en el punto 4.9.

3.4.5. Fermentación para inducción de la enzima

Para el análisis de esta fermentación se realizan las determinaciones siguientes:

3.4.5.1. Crecimiento microbiano

3.4.5.2. pH

3.4.5.3. Determinación de actividad enzimática.

Para hacer esta determinación es necesario permeabilizar las células. Los pasos a seguir se muestran a continuación. Se hicieron algunas modificaciones a la técnica reportada por Gilbert y Tully (1985) para hacer más rápido el proceso.

1. Centrifugar 10 ml. de medio de cultivo 10 minutos a 10,000 rpm, a una temperatura de 4°C.
2. Permeabilizar agregando 1 ml. de acetona.
3. Reposar 15 minutos con agitación ocasional.
4. Recuperar por centrifugación (10,000 rpm, 10 minutos).
5. Lavar al menos dos veces por centrifugación con buffer de fosfatos 0.05M, pH 7.4 con 0.85% de NaCl a 4°C.
6. Conservar a -20°C como pasta seca, o bien,
7. Determinar actividad. Resuspender la pastilla en 1 ml. de buffer de fosfatos (punto 5).

Método de ensayo: Abell y Shen.

La reacción se inicia por la adición de enzima a 0,833mM de L-fenilalanina en buffer Tris-HCl 0.1M, pH 8.5. La reacción es seguida a 290 nm. con un espectrofotómetro PERKIN-ELMER (Lambda 3A UV/VIS). La actividad se determina a partir del cambio de

absorbancia en un período de 10 minutos, utilizando un valor de 9,000 Abs l/mol como el coeficiente de extinción molar para el ácido trans-cinámico.

Una unidad de enzima se define como la cantidad de proteína que cataliza la aparición de 1 μ mol de ácido trans-cinámico por minuto a 25°C. La actividad específica se expresa como unidades/g de biomasa.

La actividad de la enzima utilizando L-tirosina como sustrato también puede ser determinada espectrofotométricamente a 315 nm. Se calcula utilizando un valor de 10,000 Abs l/mol como el coeficiente de extinción molar para el ácido p-cumárico. En este caso se utiliza la misma concentración de sustrato y el mismo buffer.

El volumen de ensayo es de 3.0 ml. La reacción se lleva a cabo directamente en las celdas del espectrofotómetro. Las cantidades a utilizar se muestran en la tabla 3.1.

TABLA 3.1. Condiciones experimentales para el ensayo de actividad enzimática

	Blanco	Muestra
Buffer Tris-HCl 0.1M pH 8.5	2.9 ml.	2.8 ml.
L-fenilalanina 24.99 mM	-	0.1 ml.
Enzima (cél. permeabilizadas)	0.1 ml.	0.1 ml.

3.4.6. Fermentación en fermentador Bio Flo con control de agitación y temperatura.

Para el análisis de esta fermentación se realizan las determinaciones que se mencionan en el punto 3.4.5.

3.5. MUTACIONES

El agente mutante que se utiliza es la nitrosoguanidina (N-metil, N-nitro, N-nitrosoguanidina). Se utilizan los medios de cultivo D y E. Es muy importante poner especial atención a las precauciones recomendadas para manipular la nitrosoguanidina. Todo el material utilizado debe marcarse para evitar que se confunda con material no contaminado y debe mantenerse por 24 horas en una solución de HCl 0.1N, que transforma la nitrosoguanidina en ácido nitroso. La técnica se muestra en la figura 3.1. Se hace una prueba control (tiempo cero), y tiempos de contacto del agente mutágeno con las células de 10, 20, 30, 40 y 50 minutos. Todas las cajas se hacen por duplicado.

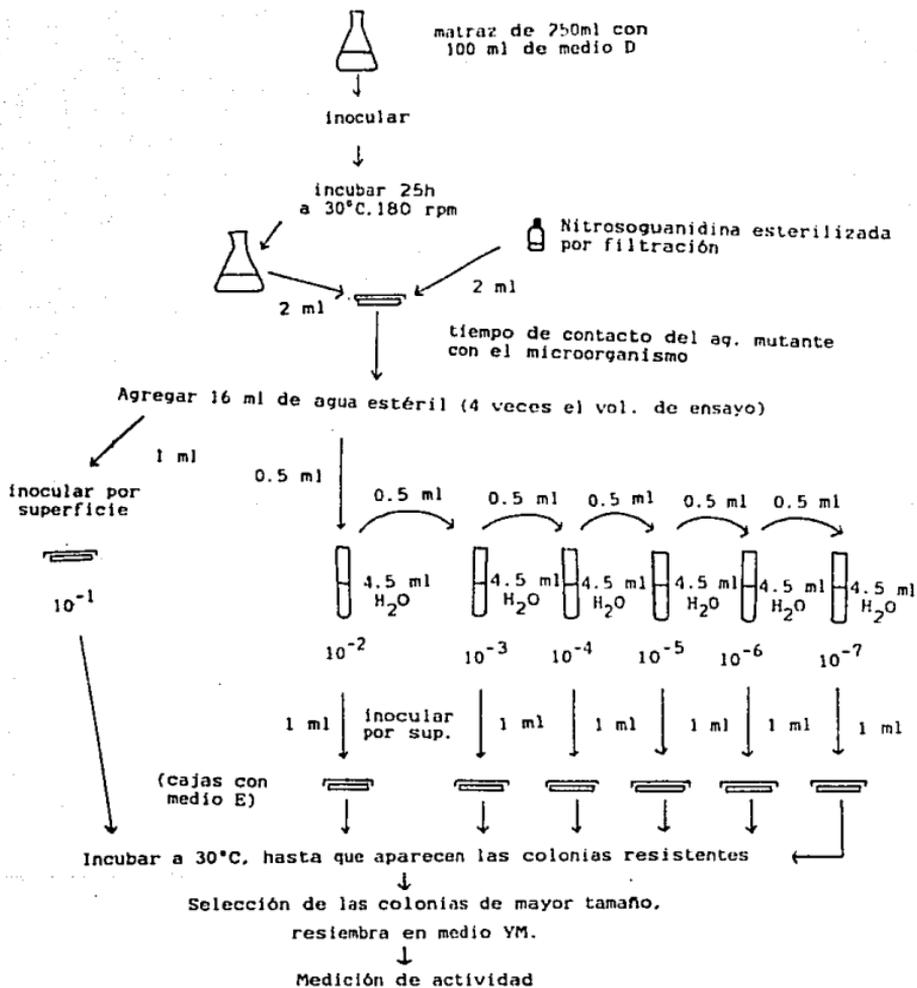


FIGURA 3.1. Tratamiento mutagénico de *Sporidiobolus parosaeus*

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. SELECCION DEL MICROORGANISMO

La selección del microorganismo productor de fenilalanina amonio-liasa se hizo en base a la literatura consultada, en donde se reporta la producción de la enzima por plantas, hongos y levaduras, siendo este último grupo el que presenta un mayor número de especies para elegir.

Se pensó que sería interesante trabajar con una cepa poco estudiada en la producción de la enzima, teniendo como base el que su utilización presentara alguna ventaja, y se decidió elegir una cepa de Sporidiobolus pararoseus.

La única información que existe en la literatura consultada sobre ésta levadura es la reportada por Evans et al. (1987), en donde se hace la comparación de las actividades de las enzimas producidas por una gran variedad de levaduras, como se muestra en la tabla 4.1. En esta tabla se puede ver que los mayores valores de actividad reportados corresponden a cepas de Rhodotorula glutinis y Rhodotorula rubra, sobre las que hay mucha información en cuanto a la producción de enzima. Les siguen en orden decreciente las cepas de Sporidiobolus pararoseus con valores más altos que el promedio del resto de las cepas.

Este microorganismo pertenece a la familia de las levaduras teliospóricas, que a su vez pertenece al género de las levaduras basidiosporógenas. El número de cepas que han sido aisladas es pequeño, y se asocian generalmente a hojas de plantas. Pertenecen al grupo de levaduras tolerantes al frío (que pueden crecer a 5 °C), y sintetizan pigmentos carotenoides (Skinner et al., 1980).

4.2. CARACTERIZACION DE LA FERMENTACION PARA PRODUCCION DE BIOMASA

Esta fermentación se hizo para conocer la curva de crecimiento del microorganismo, y la producción de biomasa con dos medios de cultivo diferentes: medio YM y medio A.

4.2.1. Fermentación con medio YM

Se utilizaron cuatro matraces inoculados con la misma cantidad de células (aprox. 35×10^7 cel.) que se inocularon a diferentes tiempos para cubrir todas las horas de fermentación (de 0 a 50 h). Los resultados se muestran en la figura 4.1, en donde se puede ver la duración aproximada de cada fase de la curva de crecimiento: Fase lag o de adaptación (de cero a seis horas), Fase logarítmica (de las 10 a las 14 horas) y Fase estacionaria (de las 40 a las 46 horas).

En el transcurso de la fermentación hay un ligero descenso del pH. Esto se debe a la degradación aerobia de la glucosa que posteriormente son utilizados en la síntesis de aminoácidos y en

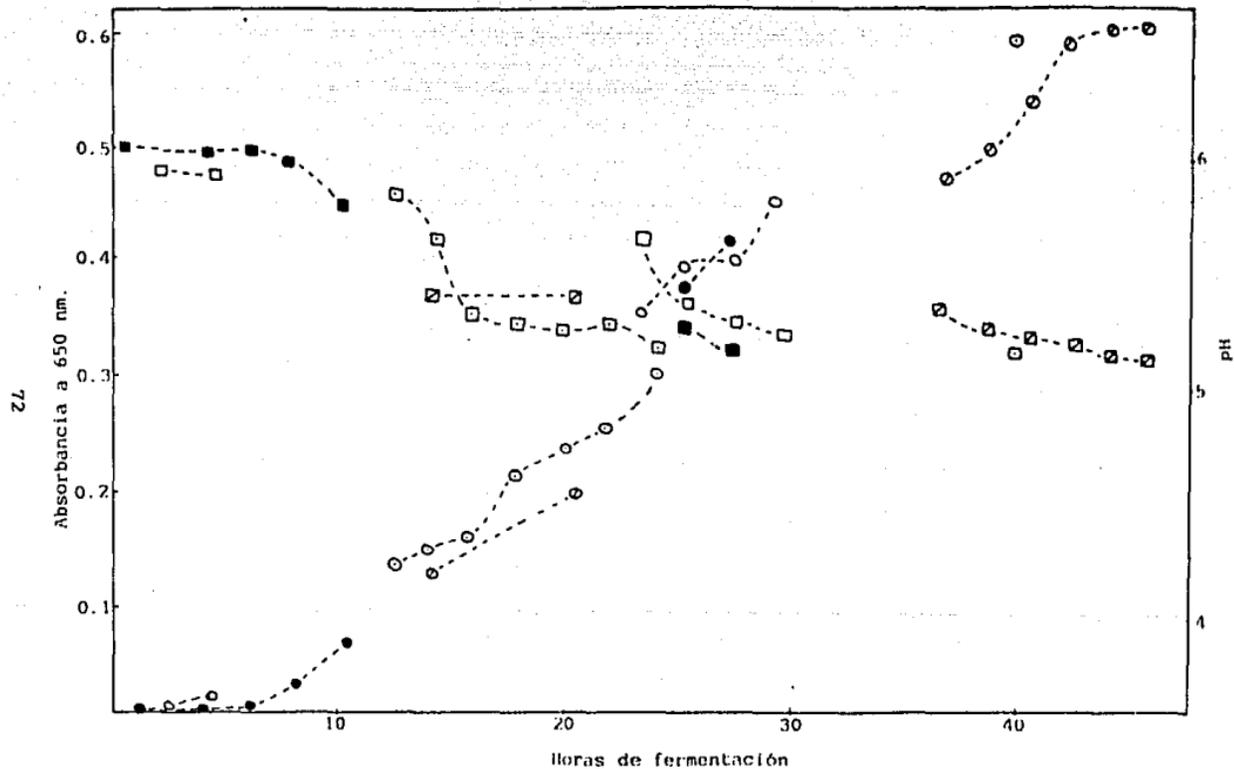


FIGURA 4.1.

Caracterización de la fermentación para producción de biomasa en medio YM. Absorbancia a 650 nm: ●matraz 1, ○matraz 2, ⊙matraz 3, ⊚matraz 4. pH: ■matraz 1, □matraz 2, ⊞matraz 3, ⊠matraz 4.

TABLA 4.1. Valores de actividad de la enzima fenilalanina amonio-liasa en aislados naturales.

Aislado	Identificación taxonómica	Activ. Especifica (U/g cel)*
SPA 1	Rhodotorula rubra	37.16
SPA 2	Sporidiobolus pararoseus	29.56
SPA 3	Rhodotorula glutinis	30.10
SPA 4	Steptomycete sp.	4.51
SPA 5	Rhodotorula rubra	32.53
SPA 6	Rhodotorula rubra	33.40
SPA 7	Rhodosporidium torulooides	32.36
SPA 8	Rhodotorula glutinis	4.16
SPA 9	Rhodotorula glutinis	7.70
SPA 10	Streptomycete sp.	5.03
SPA 11	Rhodotorula infirmo-miniatum	29.83
SPA 12	Rhodotorula rubra	34.90
SPA 13	Rhodotorula malvinellum	18.00
SPA 14	Rhodotorula rubra	6.53
SPA 15	Rhodotorula graminis	6.76
SPA 16	Rhodotorula rubra	21.20
SPA 17	Sporidiobolus roseus	18.98
SPA 18	Rhodotorula rubra	3.25
SPA 19	Rhodotorula minuta	30.91
ATCC 0559	Rhodotorula glutinis	28.41
ATCC 2047	Sporidiobolus pararoseus	31.40

* La actividad esta expresada en μ moles de ac. trans-cinámico producido por gramo de células (peso seco) por minuto a 30°C.

la construcción de múltiples macromoléculas constituyentes de la célula.

En la fase estacionaria se alcanzó una densidad óptica de 0.592, que equivale a 3.90 g de células/ l de medio de cultivo (dato obtenido a partir de una curva de peso seco, D.O. a 650nm vs g cel/ml de medio).

4.2.2. Fermentación con medio A

Se hizo de la misma forma que la fermentación con medio YM. Los resultados están representados en la figura 4.2. En esta fermentación se observan algunas diferencias con respecto a la del punto anterior: el medio utilizado no contiene glucosa, pero sí L-fenilalanina, que es el inductor de la enzima. En las horas iniciales de la fermentación el pH desciende debido a que el microorganismo está metabolizando aeróbicamente el extracto de malta; posteriormente el valor de pH comienza a aumentar, lo que indica que la levadura ya está produciendo la enzima, y que ésta ya está actuando sobre la fenilalanina del medio, dejando amonio libre, que es el responsable de que el valor de pH aumente.

La velocidad de producción es ligeramente mayor en comparación con la fermentación anterior (la fase estacionaria se alcanza a las 35 horas), pero la productividad es mucho menor (2.37 g cel/ l de medio) debido a la falta de glucosa en el medio. Es muy importante considerar estos factores, ya que tienen que ver con la economía del proceso de producción.

4.3. FERMENTACION PARA MEDIR ACTIVIDAD ENZIMATICA CON MEDIO DE CULTIVO A.

En la literatura consultada se encuentra reportado que la mayor actividad enzimática se produce al final de la fase logarítmica o al inicio de la fase estacionaria. Con base en estos datos y en la información obtenida sobre la curva de crecimiento del microorganismo se procedió a efectuar otra serie de fermentaciones en las que se midió actividad desde las 18

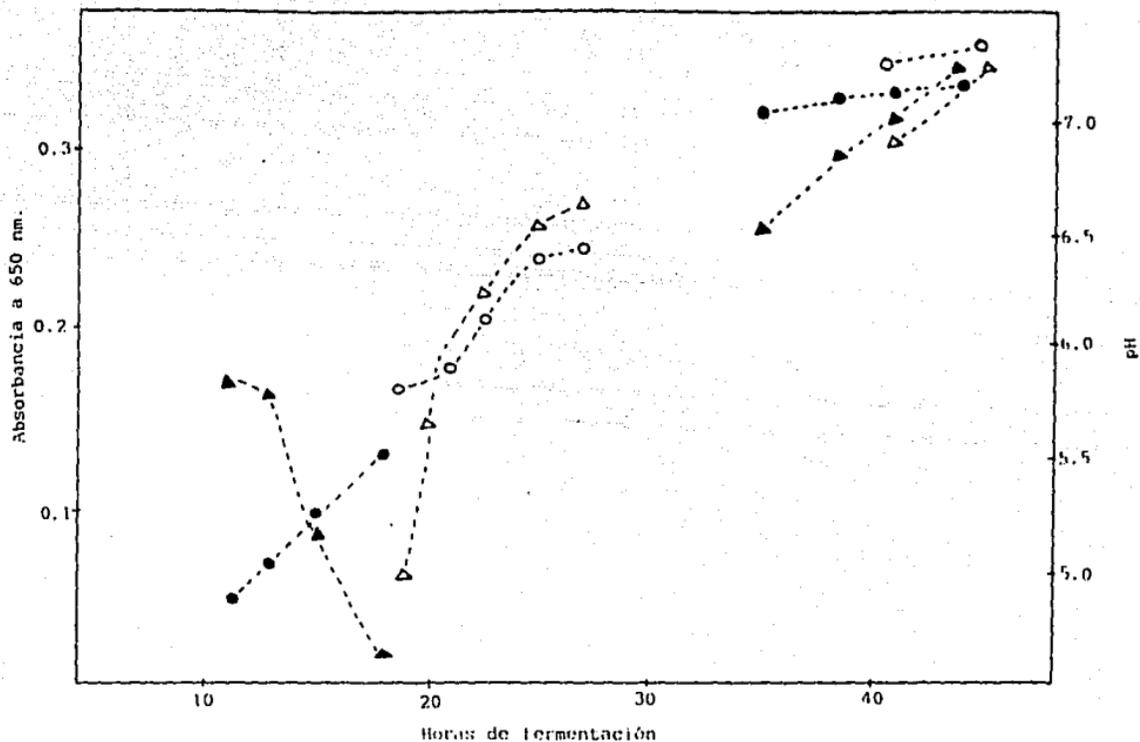


FIGURA 4.2. Caracterización de la fermentación para producción de biomasa en medio de cultivo A. Absorbancia: ●matraz 1, ○matraz 2. pH: ▲matraz 1, △matraz 2.

hasta las 35 horas de fermentación.

En varias ocasiones se tomaron muestras que se dividían: en una mitad se hacia la permeabilización de las células, y en la otra no. La actividad de la enzima solo se manifestó en células permeabilizadas. Esto sugiere que existe una barrera en las células intactas que no permite ni que el sustrato entre, ni que la enzima salga. Al permeabilizar se facilita la entrada del sustrato a la célula y posteriormente la salida del producto.

La velocidad de crecimiento y la formación de fenilalanina amonio-liasas en este medio se muestra en la figura 4.3. Alrededor de las 25-26 horas de fermentación se alcanzó el valor de máxima actividad, que luego disminuyó al comenzar la fase estacionaria.

La actividad enzimática se manifestó al final de la fase logarítmica, esto nos sugiere que el catabolismo de la fenilalanina es requerido solo bajo condiciones de limitación de carbono o nitrógeno; es decir, una vez que el microorganismo se ha terminado la (o las) fuente de carbono o nitrógeno de mayor facilidad de asimilación ocurre la inducción de la enzima.

El mayor valor de actividad obtenido fue de 5.42 U/g. Los cálculos efectuados para obtener este dato se muestran a continuación: para el matraz 2, muestra 3 (26 horas de fermentación, D.O.= 0.208). De los datos obtenidos en la determinación de actividad (D.O.vs tiempo) se obtiene la pendiente. Para esta muestra se obtuvo una pendiente de 0.0254.

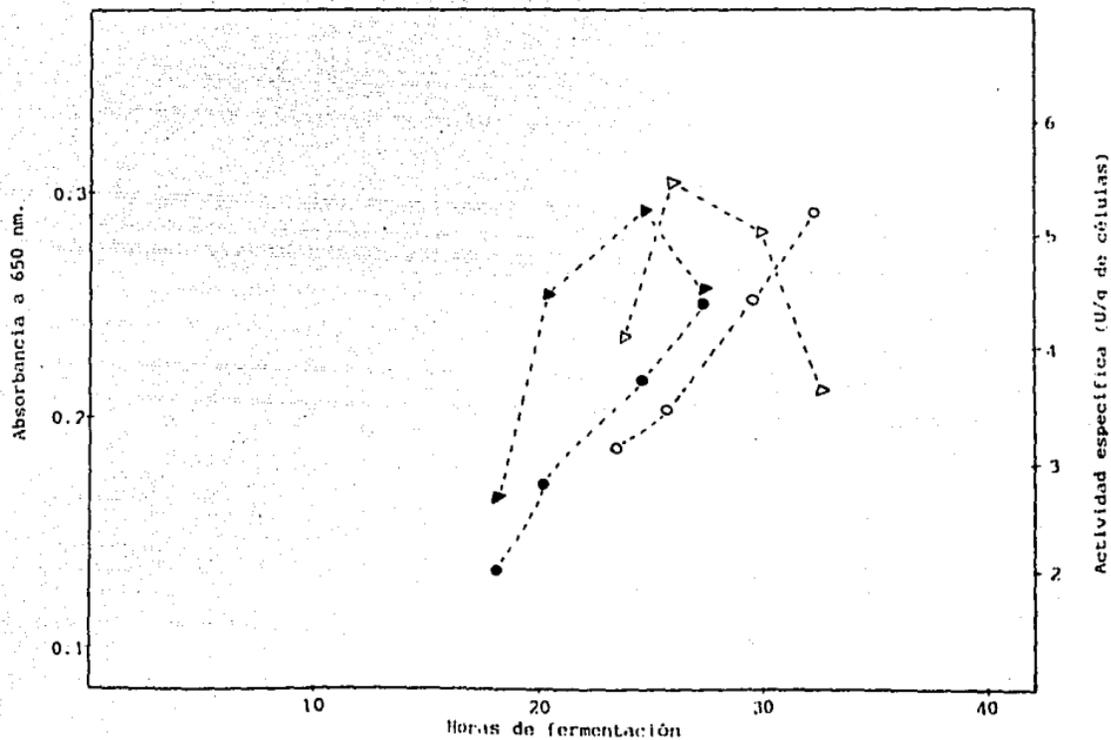


FIGURA 4.3. Fermentación para medir actividad enzimática en medio de cultivo A.
 Absorbancia: ● matraz 1. ○ matraz 2. Actividad Específica: ▲ matraz 1.
 △ matraz 2.

$$A = c C \quad \text{donde } c = 9,000 \text{ Abs/l mol}$$

$$C = \frac{A}{c} = \frac{0.0254 \text{ Abs/min}}{9000 \text{ Abs/l mol}} = 2.82 \times 10^{-6} \text{ mol/l min}$$

$$= 2.82 \times 10^{-3} \text{ } \mu\text{mol/ml min} \quad (\text{diluida } 1:30)$$

$$2.82 \times 10^{-3} \frac{\mu \text{ mol}}{\text{min.ml.susp. ensayo}} \times \frac{3\text{ml.susp.ensayo}}{0.1\text{ml.susp.cél.}} = 0.0846 \frac{\mu \text{ mol}}{\text{min.ml.susp. cél.}}$$

La densidad óptica de la muestra 3 (0.208) corresponde a 1.5×10^{-3} g células/ml de medio que se concentran 10 veces para el ensayo de actividad. Para obtener la actividad específica se dividen las unidades / ml entre el valor de peso seco:

$$\frac{0.0846 \mu\text{mol/min.ml.susp.cél.}}{0.0156 \text{ gcél/ml.susp.cél.}} = 5.42 \mu\text{mol/min gcél.} = 5.42 \text{ U/g}$$

$$5.42 \text{ U/g} \times 1.56 \text{ g cél/l de medio} = 8.45 \text{ U/l}$$

Este valor de máxima actividad resultó muy bajo comparado con los datos reportados en la literatura, por lo que se consideró la posibilidad de que la enzima se saliera de las células en la permeabilización y se estuviera perdiendo en los lavados. Se procedió entonces a medir actividad en el buffer de lavado de varias muestras, encontrándose en todos los casos que no había actividad y por lo tanto que la enzima no se sale de la célula.

4.4. ESTABILIDAD DE LA ENZIMA

En forma paralela se hicieron otros experimentos para conocer la estabilidad de la enzima (células permeabilizadas resuspendidas en buffer de fosfatos 0.05M con 0.85% de NaCl, pH 7.4. Se compararon 3 condiciones de almacenamiento:

1. A temperatura ambiente (24°C)
2. En refrigeración (4°C)
3. En refrigeración, y burbujeando nitrógeno en la suspensión de células después de cada medición de actividad, antes de almacenar.

En la tabla 4.2. se puede ver que el efecto de la temperatura de almacenamiento en la estabilidad de la enzima es muy importante. Hay que recordar que la enzima se encuentra todavía dentro de la célula junto con otras enzimas, las que a temperaturas mayores tienen mayor actividad, y pueden contribuir a la pérdida de actividad de la fenilalanina amonio-liasa. En contraste con lo anterior, no se observan efectos importantes en las células burbujeadas con nitrógeno.

4.5. pH OPTIMO DE LA ENZIMA

Se efectuaron una serie de experimentos en los que se varió el pH al medir actividad de 7.5 a 9.0 (a una temperatura de 24°C). Se encontró que el pH óptimo de la enzima es 8.7 (figura 4.4). A éste pH la enzima tiene la conformación más adecuada (dada por las estructuras terciaria y cuaternaria) para actuar sobre el

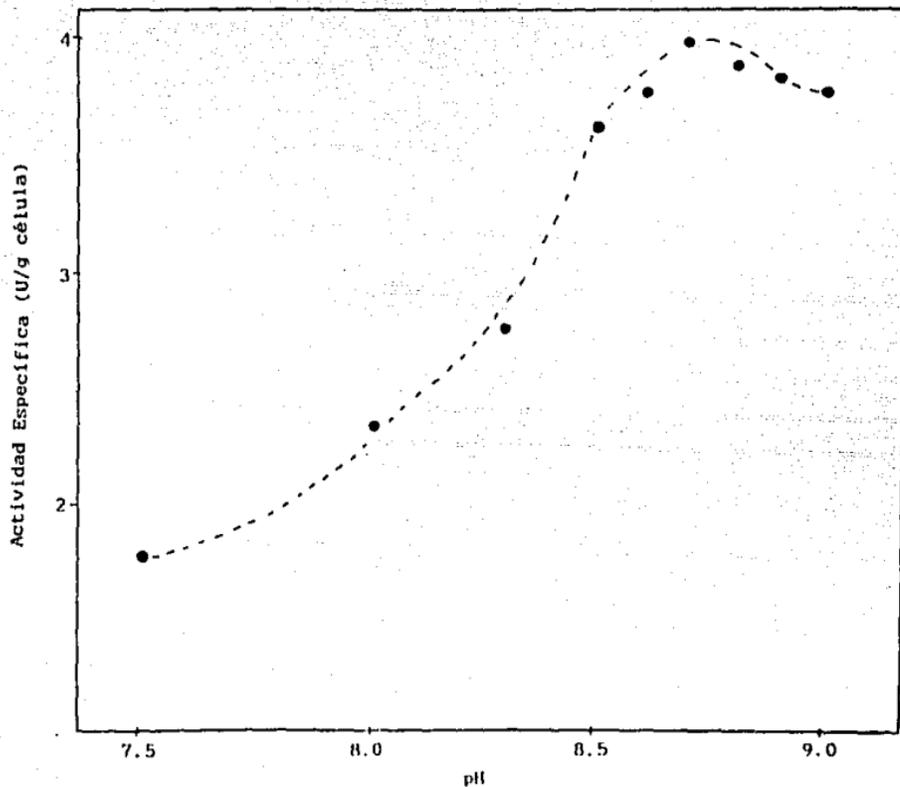


FIGURA 4.4. pH óptimo de la actividad enzimática. PAI, de la cepa original de Sporidiobolus parvoseus.

sustrato.

TABLA 4.2. Efecto de las condiciones de almacenamiento en la estabilidad de PAL

Tiempo de almacenamiento	Actividad residual (%)		
	T =24°C	T =4°C	T=4°C burbujeando con N ₂ antes de almacenar
15 días	21	86	89
30 días	0	57	60
60 días	0	37	39

4.6. FERMENTACION PARA MEDIR ACTIVIDAD ENZIMATICA CON MEDIO DE CULTIVO D.

Esta fermentación se llevó a cabo con el fin de saber si se podía obtener una mayor actividad enzimática al crecer el microorganismo en un medio que tuviera fenilalanina como única fuente de nitrógeno y de carbono, como se reporta en el estudio de Kane y Fiske (1985).

Para esta fermentación se hizo otra curva de peso seco. Se utilizaron 3 matraces inoculados con la misma cantidad de células, a diferentes tiempos. En la figura 4.5 se puede observar que las fases de la curva de crecimiento no están bien definidas. Como era de esperarse, en este medio el microorganismo crece muy poco. En la fase estacionaria se alcanzó una producción de 1.72

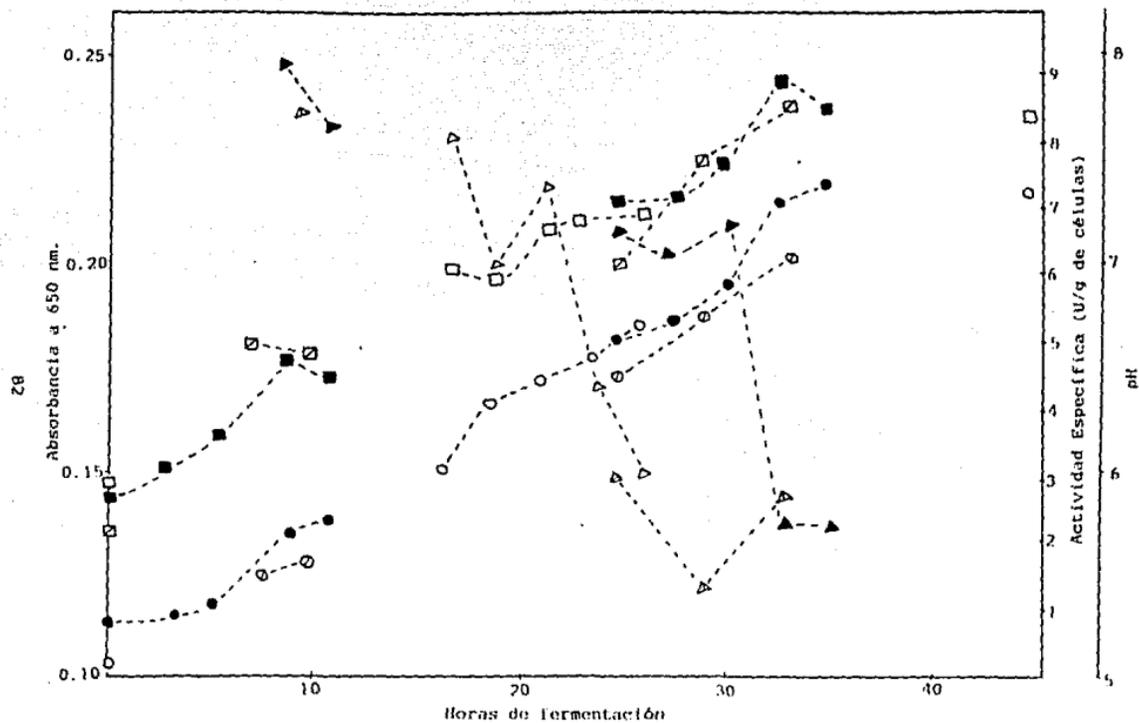


FIGURA 4.5. Fermentación para medir actividad enzimática en medio de cultivo D. Absorbancia: ● matraz 1, ○ matraz 2, ◐ matraz 3. Actividad Especifica: ▲ matraz 1, △ matraz 2, ▴ matraz 3. pH: ■ matraz 1, □ matraz 2, ▣ matraz 3.

g cél/l de medio.

En la tabla 4.3 se efectúa una comparación entre las fermentaciones con los medios de cultivo A y D. La fermentación con el medio D presenta la ventaja de que se obtiene una actividad bastante mayor, en un menor tiempo de fermentación, sin embargo, se obtiene muy escasa biomasa y por lo tanto menor actividad por litro de medio, lo que constituye una desventaja importante.

Desde el inicio de la fermentación el pH comienza a aumentar; es muy probable que la levadura produzca la enzima desde el principio, registrándose así valores altos de actividad en las primeras horas (que tienden a disminuir conforme la fermentación transcurre), ya que el medio tiene fenilalanina como única fuente de carbono y nitrógeno, aunque también es muy probable que se produzcan otras enzimas, ya que la levadura puede

TABLA 4..3 Comparación entre las fermentaciones con los medios de cultivo A y D.

Datos de la muestra de mayor actividad enzimática	medio A	medio D
máxima activ. (U/g)	5.42	9.13
tiempo de fermentación	26 h	8h 40 min.
g cél/l medio	1.56	0.80
U/l medio	8.45	7.30

utilizar otros mecanismos ajenos a PAL para metabolizar la fenilalanina (transaminación, desaminación).

4.7. MUTACIONES

En vista de que ninguno de los resultados obtenidos era suficientemente satisfactorio, se optó por buscar la sobreproducción de la enzima por medio de un tratamiento al microorganismo con nitrosoguanidina, un agente mutágeno. Es necesario definir al inicio las condiciones del tratamiento requeridas para tener un 0.01% de sobrevivientes.

El criterio utilizado para hacer la selección de las probables mutantes que tuvieran mayor actividad enzimática fué el siguiente: las células que sobrevivieron al tratamiento fueron inoculadas en medio E, que contiene fenilalanina como única fuente de carbono y nitrógeno; para que el microorganismo pudiera crecer en él tendría que producir fenilalanina amonio-liasa. Por lo tanto era de esperarse que las colonias más rápidamente producidas y de mayor tamaño tuvieran mayor actividad enzimática.

Para considerar este criterio completamente válido, habría que suponer que la levadura únicamente puede metabolizar la fenilalanina por medio de la enzima fenilalanina amonio-liasa, lo que no es cierto, ya que es un organismo que contiene una gran variedad de enzimas, y por lo tanto cuenta con varias vías para metabolizar un sustrato.

Se probó igualmente la posibilidad de incluir un indicador ácido-base en el medio sólido para detectar la alcalinización del medio producida por la acción de la enzima sobre el sustrato; de ésta manera, las colonias que tuvieran las zonas de cambio de color de mayor tamaño serían las mayores productoras de enzima. Estos experimentos no se tomaron en cuenta debido a la falta de reproducibilidad en los resultados.

Al no contar con un criterio más confiable, se seleccionaron las colonias más grandes de las sobrevivientes de los tiempos mayores de contacto con el agente mutágeno, se resebraron en medio YM, y se les midió actividad en medio D (figura 4.6). En los tres casos se observaron valores de actividad muy altos en comparación con los obtenidos con la cepa original en el mismo medio de cultivo.

Estos valores también tienden a disminuir conforme transcurre la fermentación, siendo muy drástico el descenso inicial del valor de actividad.

Existe también el inconveniente, al igual que con la cepa original, de que la producción de biomasa es muy baja. La muestra de mayor actividad (cepa B, muestra de las 12h 35 min. de fermentación) tiene una D.O.= 0.096, que equivale a 0.379 g/l y un valor de actividad de 6.97 U/l, que resulta muy bajo en comparación con los resultados que se obtuvieron para la cepa original en los dos medios usados. Es muy probable que se hubieran encontrado valores todavía mayores de actividad en las

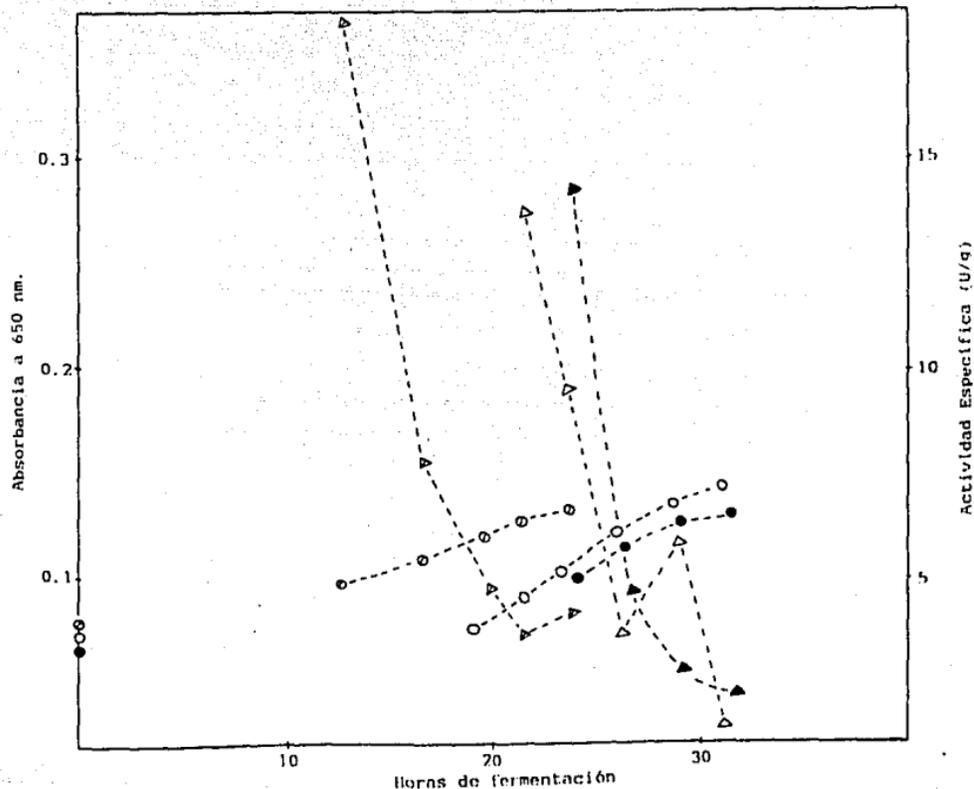


FIGURA 4.6. Fermentación en medio D de las tres sobrevivientes seleccionadas.
 Absorbancia: ● Cepa A, ○ Cepa B, ○ Cepa C. Actividad Específica:
 ▲ Cepa A, ▲ Cepa B, ▲ Cepa C.

primeras horas de fermentación, sin embargo se consideró que no valía la pena hacer estas determinaciones debido a la baja producción de biomasa.

Se decidió entonces crecer las tres cepas seleccionadas en medio A, y determinar el pico de actividad para tener un punto más de comparación con la cepa original (figura 4.7). Las cepas A y B tienen valores de actividad ligeramente superiores al obtenido para la cepa original, que se alcanzan en tiempos de fermentación ligeramente menores (tabla 4.4)

TABLA 4.4. Mediciones de actividad de las cepas seleccionadas en el medio A.

Datos de la muestra de mayor actividad enzimática	Cepa A	Cepa B	Cepa C
Máxima actividad (U/g)	6.54	6.23	10.41
tiempo de ferm.	21 h	22h 15 min.	15h 30 min.
g cél/ l medio	1.43	1.69	1.44
U/l de medio	9.42	10.52	14.99

Sin embargo, el valor de máxima actividad alcanzado en la fermentación con la cepa C es aproximadamente el doble que el obtenido con la cepa A, en un tiempo de fermentación mucho menor (casi la mitad). La producción de biomasa es en todos los casos muy parecida. El valor de unidades/ litro de medio también es mucho mayor para la cepa C.

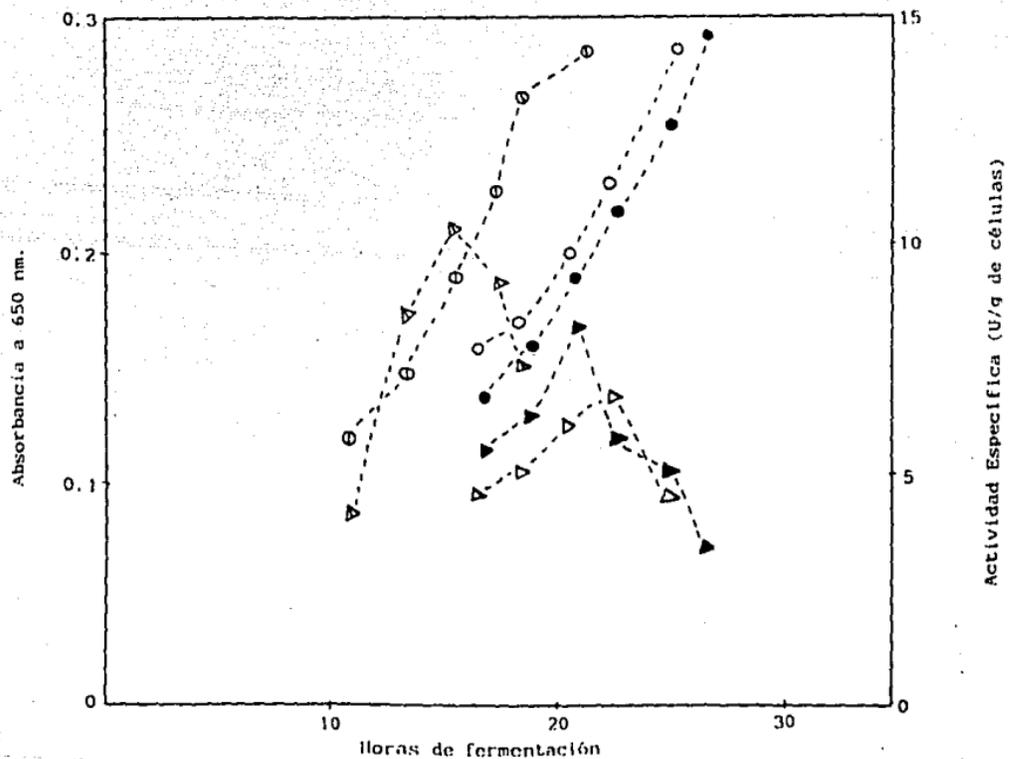


FIGURA 4.7. Fermentación en medio A de las tres cepas seleccionadas.
 Absorbancia: ● Cepa A, ○ Cepa B, ● Cepa C. Actividad Especifica: ▲ Cepa A, △ Cepa B, ▲ Cepa C.

Con base en los resultados anteriores, se decidió seleccionar a la cepa C para utilizarla en todos los experimentos posteriores, ya que presenta múltiples ventajas con respecto a la cepa original (tabla 4.5).

TABLA 4.5. Comparación entre las cepas original y mutada C en medio de cultivo A.

Datos de la muestra de mayor actividad enzimática	Cepa original	Cepa mutante C
máxima actividad (U/g)	5.42	10.41
tiempo de fermentación g cél/l medio	26 h	15h 30min.
U/l de medio	1.56	1.44
	8.45	14.99

4.8. OPTIMIZACION DEL MEDIO DE CULTIVO PARA PRODUCCION DE BIOMASA. METODO DE BOX WILSON.

Se decidió incluir glucosa en el medio en base al trabajo reportado por Orndorff et al. (1988), en donde se incluía glucosa en el medio para obtener una producción de biomasa muy alta. Una vez que los microorganismos utilizaban toda la glucosa del medio, se expresaba la actividad de la fenilalanina amonio-liasa.

Se hicieron varias fermentaciones para conocer la curva de crecimiento de la cepa C. El medio de cultivo utilizado fué el nivel base elegido para el estudio de Box Wilson (tabla 4.6.) y se encontró que la fase estacionaria se alcanzaba a las 30 horas

de fermentación. Una vez que se tuvo este dato se procedió a hacer los experimentos, midiendo la densidad óptica al finalizar la fermentación.

En la primera parte de la optimización del medio se escogieron como parámetros a optimizar el pH, concentración de glucosa y de extracto de malta.

El número de experimentos a realizar está dado por 2^n , donde n es el número de parámetros a optimizar. En nuestro caso fue $2^3 = 8$ experimentos, por duplicado, quedando un total de 16 matraces.

Una vez escogido el nivel base para la composición del medio se establecieron los números de unidades de variación, y con ello quedaron definidos los niveles superiores e inferiores de variación. El nivel base del que se partió se muestra en la tabla 4.6. Se escogió un número de unidades de variación de 0.5 para los tres parámetros.

TABLA 4.6. Niveles de variación. Primera serie de experimentos.

Parámetro	Nivel inf. de variac.	Nivel base	Nivel sup. de variac.	No. unid. de variac.
Extracto de malta	0.5%	1.0%	1.5%	0.5
Glucosa	0.5%	1.0%	1.5%	0.5
pH	4.9	5.4	5.9	0.5

Las condiciones de cada experimento se muestran en la tabla 4.7. Se utilizaron matraces erlenmeyer, en las condiciones ya descritas; todos los experimentos se hicieron por duplicado, midiendo la densidad óptica del medio de 6 a 8 horas después de haber alcanzado la fase estacionaria (que se alcanza alrededor de las 30 horas utilizando la cepa mutante) para tener la seguridad de que el microorganismo ya dejó de crecer, pero antes de que los valores de densidad óptica comiencen a disminuir. Se sacó el promedio entre los duplicados.

TABLA 4.7. Experimentos realizados en la primera parte de la optimización del medio.

Experimento	pH	Glucosa (%)	Extracto de malta
1	4.9	0.5	0.5
2	4.9	0.5	1.5
3	4.9	1.5	0.5
4	4.9	1.5	1.5
5	5.9	0.5	0.5
6	5.9	0.5	1.5
7	5.9	1.5	0.5
8	5.9	1.5	1.5

Una vez que se obtuvieron los resultados, fué necesario calcular el coeficiente de regresión para cada parámetro. Por ejemplo para pH tenemos:

$$X \text{ pH} = \frac{\sum \text{D.O. pH superiores} - \sum \text{D.O. pH inferiores}}{\text{No. de experimentos (8)}}$$

El valor absoluto del coeficiente de regresión indica qué

tan importante es un parámetro respecto a los otros (el de mayor valor absoluto es el más importante). Si el valor es positivo, indica un efecto igualmente positivo del parámetro, es decir, hay que aumentarlo. Un valor negativo indica que hay que disminuirlo. Después se multiplica para cada parámetro el coeficiente de regresión por las unidades de variación obteniéndose un valor para cada uno de los parámetros. El que tenga el valor absoluto mayor será el más importante.

Una vez terminada la primera serie de experimentos, se obtuvieron los coeficientes de regresión para cada parámetro, que se muestran en la tabla 4.8. Después se multiplicaron los coeficientes de variación por las unidades de variación, obteniéndose los valores que se muestran en la misma tabla.

TABLA 4.8. Coeficientes de regresión. Primera serie de experimentos

	pH	glucosa	extracto de malta
primer experimento	-3.25×10^{-3}	7.5×10^{-4}	0.0137
repetición	7.5×10^{-3}	0.0157	0.02125

multiplicando los coeficientes de variación por las unidades de variación:			
	pH	glucosa	extracto de malta
primer experimento	-0.001625	0.000375	0.05685
repetición	0.00375	0.00785	0.01062

Estos resultados nos indicaron que el parámetro más

importante (por tener el mayor valor absoluto) era el extracto de malta. Tomándolo como referencia se hizo el cálculo de cuánto había que variar el pH y la concentración de glucosa al aumentar en 1.0% el extracto de malta, obteniéndose los valores de la tabla 4.9.

TABLA 4.9. Variación del pH y concentración de glucosa en función del aumento del extracto de malta.

	pH	glucosa
primer experimento	-0.028	0.00659%
repetición	0.353	0.739%

El efecto del pH resultó despreciable, ya que considerando el segundo experimento al aumentar en 1.0% la concentración de extracto de malta, apenas se movería en 0.353 el pH, mientras que de acuerdo con los resultados del primer caso, habría que disminuirlo en 0.028.

Los dos valores obtenidos para la glucosa son positivos, indicando que hay que aumentar su concentración, sin embargo, se puede notar que existe una diferencia importante entre los dos valores.

Se propuso entonces repetir el experimento con extracto de malta y glucosa, manteniendo el mismo valor de pH, ya que su variación tenía muy poca influencia en comparación con los otros dos factores. Se incluyó extracto de levadura como nuevo

parámetro a optimizar.

Los niveles de variación elegidos para esta nueva serie de experimentos se muestran en la tabla 4.10 y las condiciones de los experimentos realizados en la tabla 4.11.

TABLA 4.10. Niveles de variación. Segunda serie de experimentos.

Parámetro	Nivel inferior de variación (%)	Nivel base (%)	Nivel sup. de variac. (%)	No. de unidades de variac.
Ext. de levadura	0.05	0.1	0.15	0.05
glucosa	0.5	1.0	1.5	0.5
Ext. de malta	0.5	1.0	1.5	0.5

TABLA 4.11. Segunda serie de experimentos

Experimento	Ext. de levadura (%)	Glucosa (%)	Ext. de malta (%)
1	0.05	0.5	0.5
2	0.05	0.5	1.5
3	0.05	1.5	0.5
4	0.05	1.5	1.5
5	0.15	0.5	0.5
6	0.15	0.5	1.5
7	0.15	1.5	0.5
8	0.15	1.5	1.5

En la tabla 4.12 se muestran los coeficientes de regresión y también los resultados de multiplicar los coeficientes de regresión por las unidades de variación. En esta tabla se observa claramente que el factor más importante es la glucosa. Estos resul-

tados contradicen a los de la primera serie de experimentos en donde el extracto de malta resultó ser el factor de mayor importancia. Sin embargo, se consideran más confiables los resultados de esta última serie de experimentos, ya que existe una variabilidad mucho menor entre los experimentos y sus duplicados en comparación con los resultados anteriores.

TABLA 4.12. Coeficientes de regresión. Segunda serie de experimentos

	Ext. de levadura	Glucosa	Ext. de malta
Primer experimento	0.1462	0.0365	0.031
repetición	0.1276	0.0221	0.0171
multiplicando los coeficientes de regresión por las unidades de variación:			
	Ext. de levadura	Glucosa	Ext. de malta
Primer experimento	0.00731	0.0182	0.0155
repetición	0.00638	0.01105	0.00855

Los valores obtenidos sobre la modificación necesaria a la concentración de extracto de malta y de extracto de levadura al aumentar la glucosa en 1.0% se encuentran en la tabla 4.13.

Tomando los promedios se obtiene que si se aumenta en 1.0% la glucosa del medio, se tiene que aumentar 0.5% de extracto de levadura y 0.8% de extracto de malta.

TABLA 4.13. Variación de la concentración del extracto de malta y de levadura en función del aumento en la concentración de glucosa de 1.0%

	Extracto de malta(%)	Extracto de levadura(%)
Primer experim.	0.851	0.401
repetición	0.773	0.577

Con base en los resultados anteriores se propuso una última serie de experimentos incrementando entre uno y otro un 0.5% de glucosa, 0.25% de extracto de levadura y 0.4% de extracto de malta, como se muestra en la tabla 4.14.

TABLA 4.14. Tercera serie de experimentos

Matraz	Glucosa (%)	Extracto de levadura (%)	Extracto de malta (%)
1	1.0	0.1	1.0
2	1.5	0.35	1.4
3	2.0	0.60	1.8
4	2.5	0.85	2.2
5	3.0	1.10	2.6
6	3.5	1.35	3.0
7	4.0	1.60	3.4

En la figura 4.8 se puede observar que del matraz 1 (1.0% de glucosa) al matraz 2 (1.5% glucosa) hay un aumento más o menos importante en el crecimiento del microorganismo, y de ahí en adelante hay aumentos pequeños. Por lo tanto se decidió elegir la composición del matraz dos como el mejor medio de cultivo para el crecimiento de Sporidiobolus pararoseus (medio B en materiales y métodos).

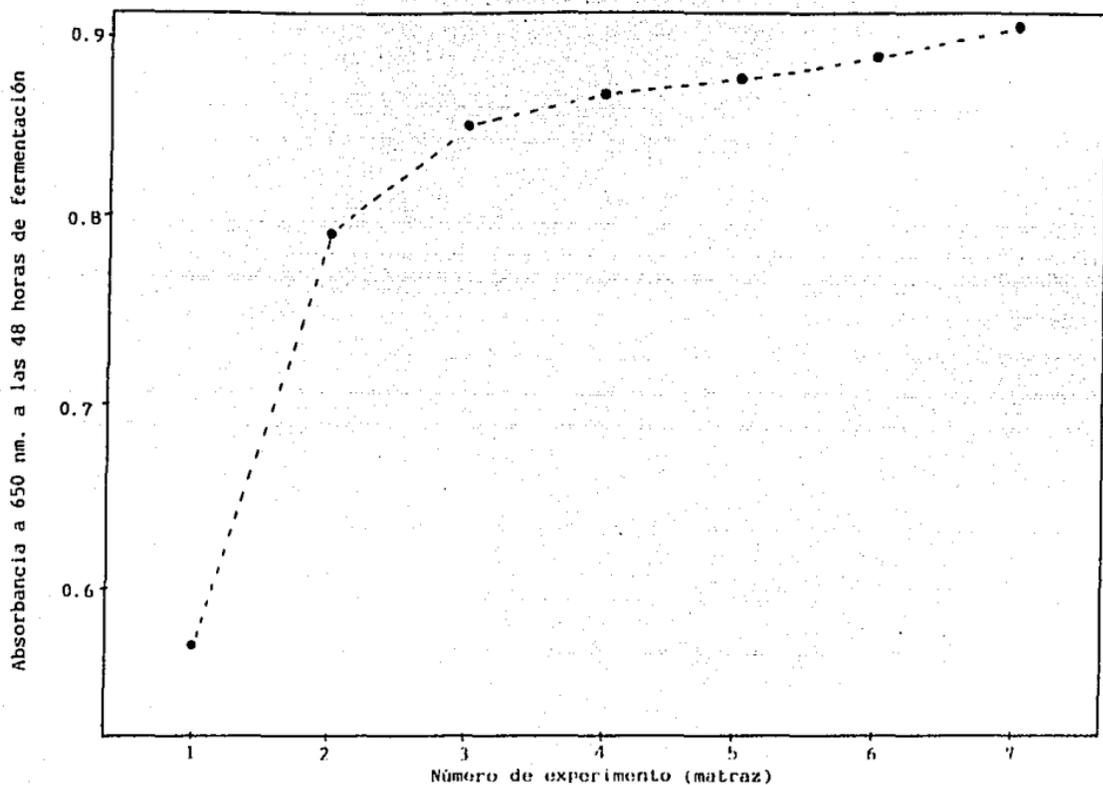


FIGURA 4.8. Optimización del medio de cultivo por el método de Box Wilson. Tercera serie de experimentos.

4.9. INFLUENCIA DE LA AIREACION EN EL CRECIMIENTO DE Sporidiobolus pararoseus.

Este experimento se llevó a cabo utilizando la cepa mutante seleccionada y el medio de cultivo B. Se utilizaron 6 matraces erlenmeyer de 500 ml. con diferentes volúmenes de medio (tabla 4.15) inoculados al 5% con la misma cantidad de células e incubados a 30 °C y 400 rpm, midiendo crecimiento microbiano a diferentes tiempos.

TABLA 4.15. Experimentos realizados para conocer la influencia de la aireación en el crecimiento de Sporidiobolus pararoseus.

matraz	volumen de medio (ml)
1	25
2	50
3	75
4	100
5	200
6	300

Los resultados de este experimento se muestran en la figura 4.9, en donde se puede ver que a medida que se incrementa el volumen de líquido, disminuyen la velocidad de absorción de oxígeno y el crecimiento microbiano.

Al disminuir el volumen de líquido, aumenta el oxígeno disuelto, que el microorganismo incorpora para satisfacer sus demandas metabólicas. (Wang et al., 1976).

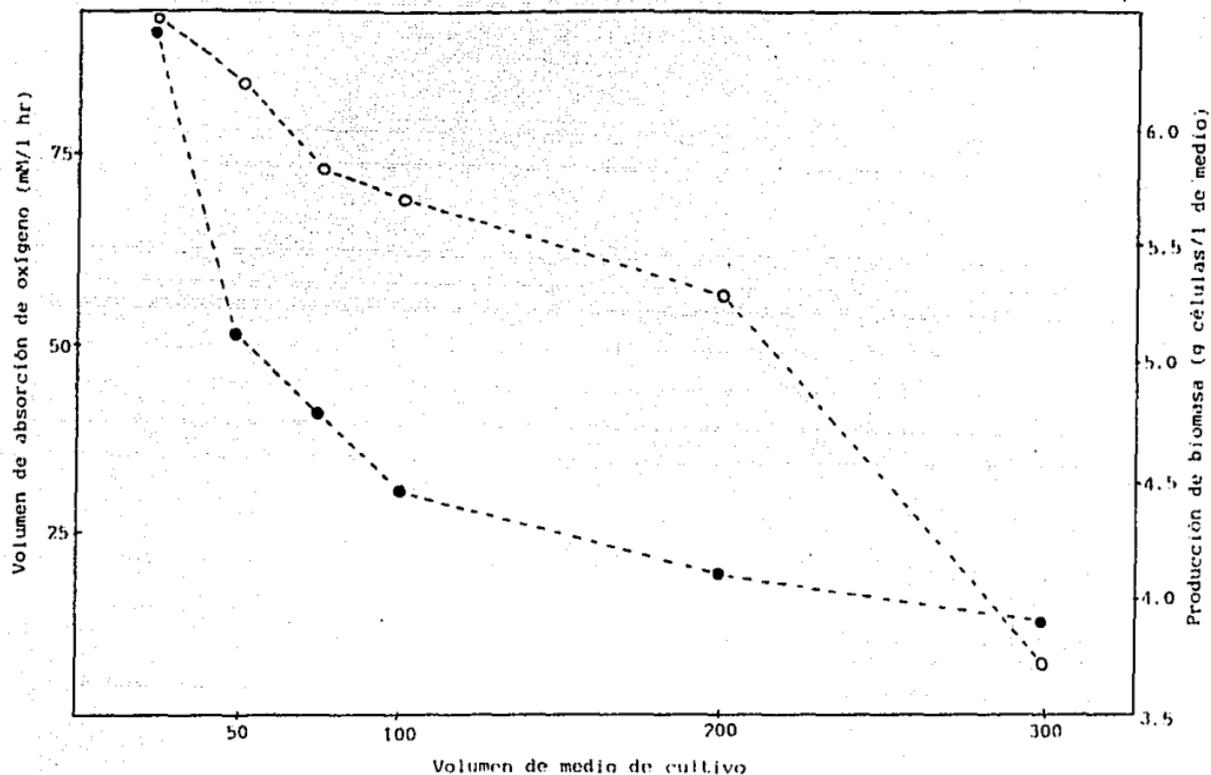


FIGURA 4.9. Influencia de la aireación en el crecimiento de *Sporidiobolus pararoseus*. ● Volumen de absorción de oxígeno (mM/l hr). ○ Producción de biomasa (g/l). Cepa C, medio de cultivo B. Células cosechadas a las 18 horas de fermentación.

4.10 FERMENTACIONES PARA DETERMINAR LAS INFLUENCIAS NUTRICIONALES EN LA ACTIVIDAD ENZIMATICA CON LA CEPA C.

4.10.1. Se realizó una primera fermentación (tabla 4.16) para determinar el pico de actividad enzimática en el medio obtenido como óptimo en el estudio de Box Wilson (B), con la concentración de inductor que se había utilizado en las fermentaciones anteriores (0.1%).

Esta fermentación tiene como ventaja que la producción de biomasa es muy alta, sin embargo, los valores de actividad son bajos en comparación a los obtenidos para la misma cepa en el medio A (tabla 4.4).

4.10.2. Se decidió hacer otra fermentación con el mismo medio de cultivo, pero aumentando la concentración de inductor a 0.8% (tabla 4.16). En este segundo caso se obtuvo una producción de biomasa similar a la fermentación anterior, y valores de actividades ligeramente más altos.

4.10.3. Se realizó una tercera fermentación en la que se utilizó el mismo medio de cultivo del punto 4.10.2., pero agregando el inductor después de 5 horas de haberse iniciado la fermentación (tabla 4.16).

Los resultados son muy similares con respecto al punto 4.10.2, indicando que la actividad enzimática no depende del

tiempo de introducción de inductor en el medio.

TABLA 4.16. Influencias nutricionales en la expresión de fenilalanina amonio-liasa.

Fermentación	tiempo de fermentac.	D.O. (650 nm)	Activ. Esp. (U/g)
4.10.1.	17 h 45 min	0.477	2.87
	20 h	0.515	3.43
	22 h	0.554	4.04
	24 h 30 min	0.612	4.97
	27 h 30 min	0.717	4.34
	29 h 35 min	0.736	3.91
4.10.2.	17 h 20 min	0.435	3.09
	19 h 35 min	0.480	4.94
	21 h 15 min	0.518	5.48
	23 h 35 min	0.591	5.85
	25 h 45 min	0.707	5.27
4.10.3.	19 h 35 min	0.502	4.02
	22 h 50 min	0.594	4.67
	24 h 45 min	0.683	5.36
	26 h 45 min	0.703	5.62
	28 h 30 min	0.732	5.14
4.10.4.	12 h 15 min	0.252	10.44
	14 h 15 min	0.317	13.75
	16 h 30 min	0.380	12.49
	18 h 30 min	0.448	12.21

4.10.4. Finalmente se hizo otra fermentación utilizando el medio óptimo (Box Wilson), pero sin glucosa, y con 0.8% de fenilalanina (tabla 4.16).

Si se hace una comparación de los resultados anteriores (tabla 4.17), se ve que la fermentación 4.10.4. es la que presenta mayores ventajas, ya que tiene el valor de actividad mayor, en un tiempo de fermentación menor.

Tabla 4.17. Comparación de los resultados de la evaluación de las influencias nutricionales en la actividad enzimática.

Datos de la muestra de máxima actividad	4.10.1.	4.10.2.	4.10.3.	4.10.4.
Actividad (U/g)	4.97	5.85	5.62	13.75
tiempo de fermentación	24h 30'	23h 35'	26h 45'	14h 15'
g cél/l medio	4.02	3.90	4.58	2.23
U/l	19.97	22.81	25.73	30.66
Productividad U/l h	0.82	0.97	0.96	2.15
medio de cultivo	glu 1.5% e. lev. 0.35% malta 1.4% L-fen 0.1%	igual pero con L-fen 0.8%	igual pero agre- gando el inductor a las 5h de ferm.	e. lev. 0.35% malta 1.4% L-fen 0.8%

Sin embargo, la producción de biomasa es mucho menor ya que es el único medio que no contiene glucosa. A pesar de esta última desventaja, si se observa la productividad se puede concluir que la fermentación 4.10.4. es la que resulta mejor. Todos estos resultados indican que la glucosa reprime la síntesis de PAL.

Cuando en el medio de cultivo hay varios sustratos, el microorganismo puede sintetizar enzimas para utilizarlos todos, pero eso sería una pérdida de energía. En lugar de eso, produce las enzimas necesarias para utilizar el sustrato más fácil de metabolizar (generalmente glucosa), disminuyendo así la velocidad de síntesis de otras enzimas (PAL) para gastar menos energía.

Si revisamos la literatura estos resultados concuerdan con lo reportado por Yamada et al. (1981) para la enzima de Rh. glutinis y por Camm y Towers (1969) para Sporobolomyces roseus, aunque resultan contrarios a los de Orndorff et al. (1988) para la enzima de Rhodotorula graminis y a los de Wick y Willis (1982) para Rhodosporidium toruloides.

4.11. OPTIMIZACION DE LA CONCENTRACION DE INDUCTOR

A partir de los resultados obtenidos en el punto 4.10, se decidió no incluir glucosa en el medio de cultivo, utilizando en los experimentos posteriores los valores para extracto de levadura y extracto de malta que resultaron de la optimización por el método de Box Wilson.

Para optimizar la concentración de inductor se hicieron los experimentos en un intervalo de concentraciones de 0.1% a 1.0% de fenilalanina, con un incremento de 0.15% entre cada experimento. Todos fueron inoculados al mismo tiempo, con la misma cantidad de células, y se tomaron muestras a las 12 y 16 horas de fermentación para medir densidad óptica y actividad de la enzima.

En la figura 4.10 se puede observar que la concentración de inductor es directamente proporcional a la actividad enzimática, no habiendo ninguna concentración en la que se observe un aumento significativamente mayor. Se seleccionó la concentración de 0.5%, quedando así constituido el medio C.

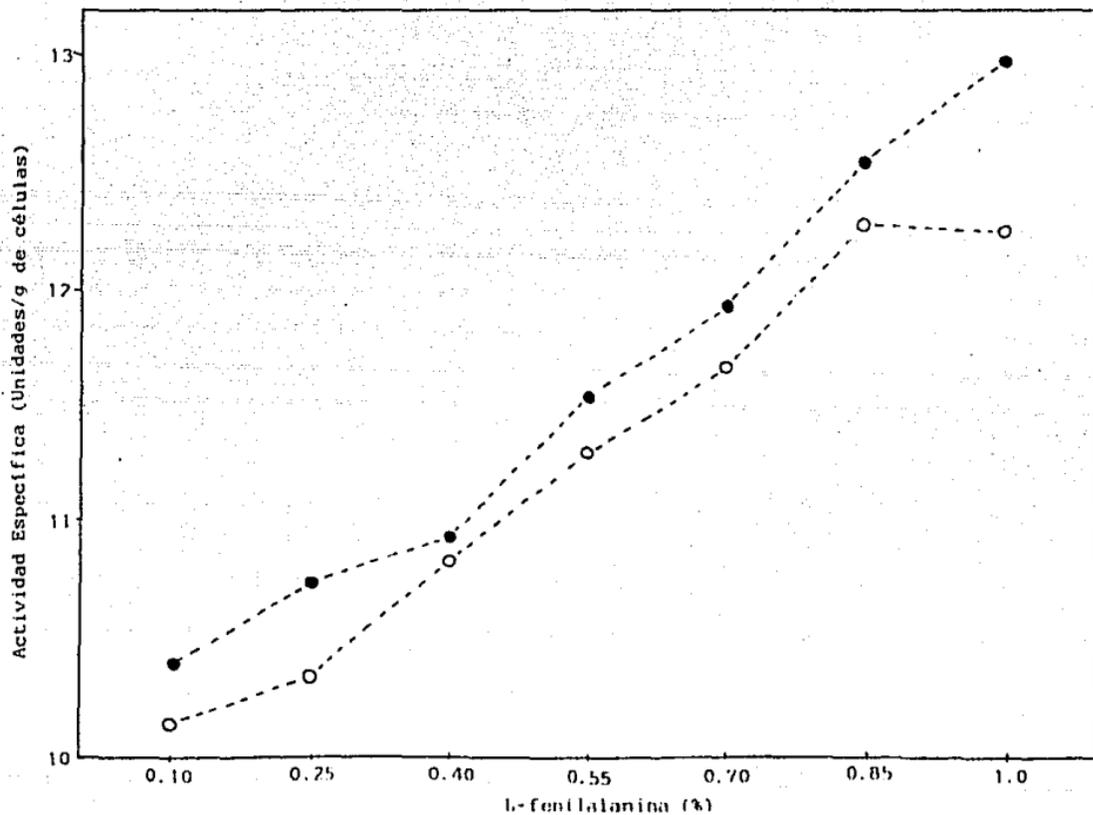


FIGURA 4.10. Optimización de la concentración de inductor. ● muestra a las 12 h de fermentación. ○ muestra a las 16 h de fermentación.

4.12. ESCALAMIENTO. FERMENTACION EN FERMENTADOR BIO FLO.

Estas fermentaciones se realizaron utilizando el medio de cultivo C. Se preparó el inóculo como se describe en el punto 3.4.1., se agregó a 500 ml. de medio en el fermentador, y se incubó a 30 °C, 600 rpm y 0.5 vvm. Para el análisis de la fermentación se hicieron las determinaciones de crecimiento microbiano, pH y actividad enzimática.

Se realizaron dos fermentaciones utilizando el medio de cultivo C y la cepa mutante. La primera se efectuó para conocer la curva de crecimiento del microorganismo y la curva de actividad enzimática en las condiciones ya indicadas.

En secciones anteriores se discutió que la utilización del medio de cultivo C (sin glucosa) presentaba la desventaja de que la producción de biomasa resultaba muy baja en comparación con los medios que tenían glucosa. Sin embargo, en esta fermentación se elimina esa desventaja, ya que debido a la alta aireación y agitación del medio en la fermentación, se obtienen 4.26 g/l de biomasa en el pico de actividad (figura 4.11), que resulta muy alto si lo comparamos con el obtenido en la fermentación en matraz (tabla 4.17, fermentación 4.10.4.). Lo mismo sucede con los valores de máxima actividad y unidades por litro de medio.

Aunado a lo anterior existe otra ventaja más: dada la mayor

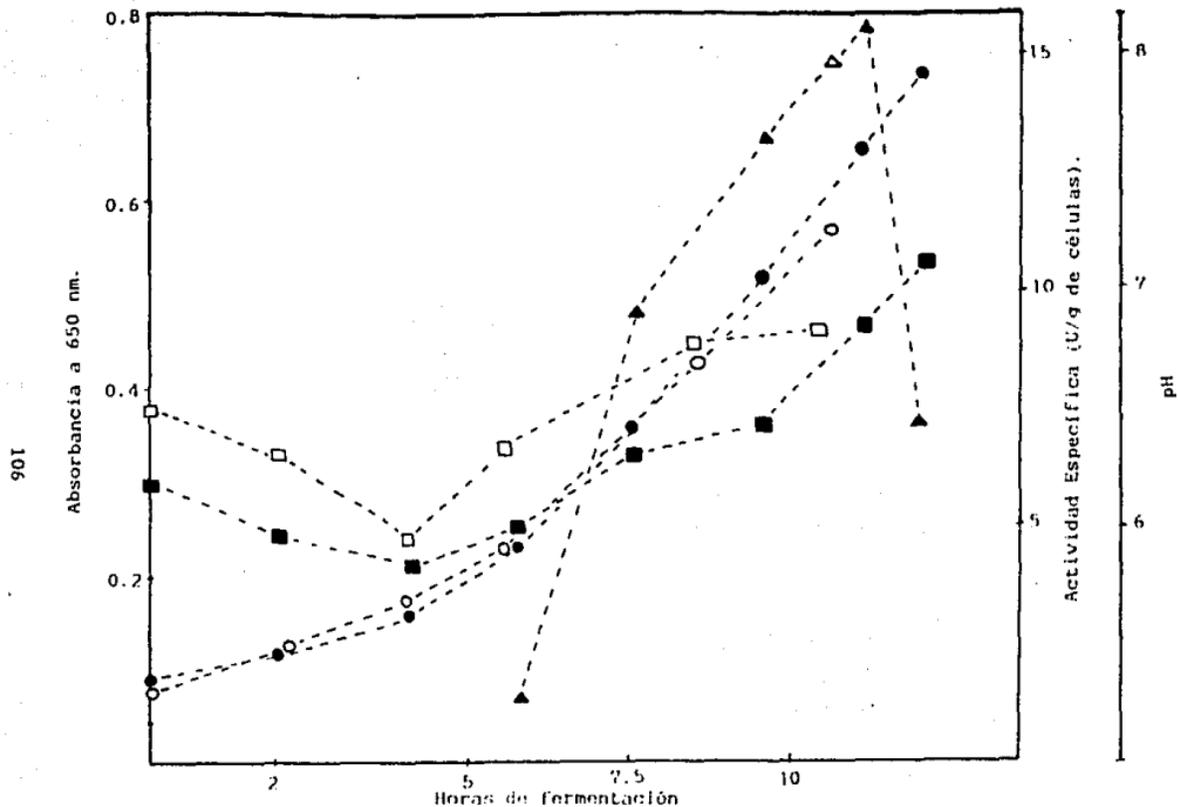


FIGURA 4.11. Escalamiento. Fermentación en fermentador Bio Flo. Primera fermentación: ● Absorbancia, ▲ Actividad Específica, ■ pH. Repetición: ○ Absorbancia, △ Actividad Específica, □ pH.

velocidad de crecimiento, el punto de máxima actividad enzimática se alcanza en un tiempo menor de fermentación (11 h). La única desventaja que se presenta es que la caída de actividad es muy brusca. Es posible que esta inactivación se deba a la inducción de proteasas o a la liberación de lisosomas.

Se llevó a cabo una segunda fermentación con el fin de obtener un lote importante de células para experimentos posteriores cosechando las células en el punto de máxima actividad enzimática, lográndose ratificar los resultados anteriores (figura 4.11)

La alta inestabilidad de la actividad enzimática en la fermentación hace necesario el tener perfectamente controladas y estandarizadas todas las condiciones de fermentación (cantidad de biomasa inicial, temperatura, pH, agitación, aireación) para que las fermentaciones sean totalmente reproducibles y poder así cosechar las células en el punto de máxima actividad, o bien buscar métodos para reducir la degradación enzimática durante la fermentación incrementando así la estabilidad de la enzima.

4.13. CARACTERIZACION DE LA ENZIMA PRODUCIDA POR LA CEPA MUTANTE C

4.13.1. pH óptimo

Esta serie de experimentos se llevó a cabo en un intervalo de pH de 8.5 a 9.0, a una temperatura de 25°C. Se encontró que el pH óptimo es 8.8, dato muy parecido al obtenido para la cepa

original (figura 4.12).

4.13.2. Temperatura óptima

Estas determinaciones se llevaron a cabo a pH 8.5, encontrándose que la temperatura a la que la enzima presentaba mayor actividad es 52.5°C (figura 4.13). Se ve que la curva es asimétrica: A temperaturas mayores a la óptima, la pérdida de actividad es mas rápida que el aumento observado en la primera mitad de la curva.

4.13.3. Estabilidad

Se hicieron estudios para conocer la estabilidad de la enzima (células permeabilizadas) en diferentes condiciones de almacenamiento.

4.13.3.1. Estabilidad a 50°C.

Este experimento se llevó a cabo utilizando células resuspendidas en buffer de fosfatos 0.05M con 0.85% de NaCl, pH 7.4, almacenadas a 50 °C. Los resultados se muestran en la figura 4.14, donde se puede observar que la enzima pierde un 29.2% de su actividad en 6 horas, y un 45.4% en 10.5 horas, lo que indica que es factible utilizarla a altas temperaturas logrando un considerable aumento en la actividad enzimática, y con un grado aceptable de estabilidad.

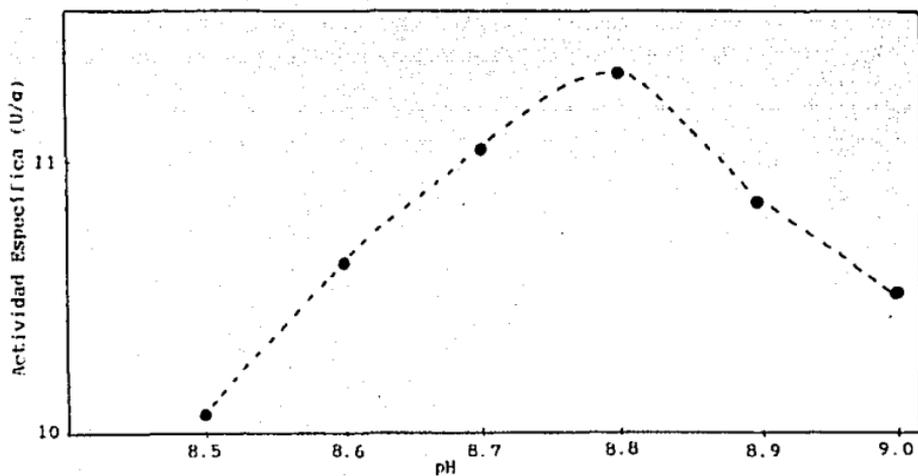


FIGURA 4.12. pH óptimo de la actividad enzimática. PAL de cepa C.

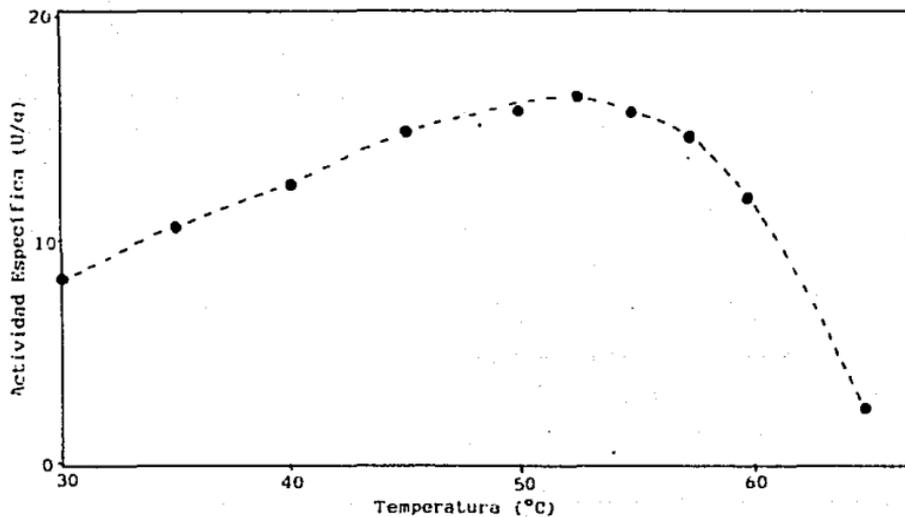


FIGURA 4.13. Temperatura óptima de la actividad enzimática. PAL de cepa C.

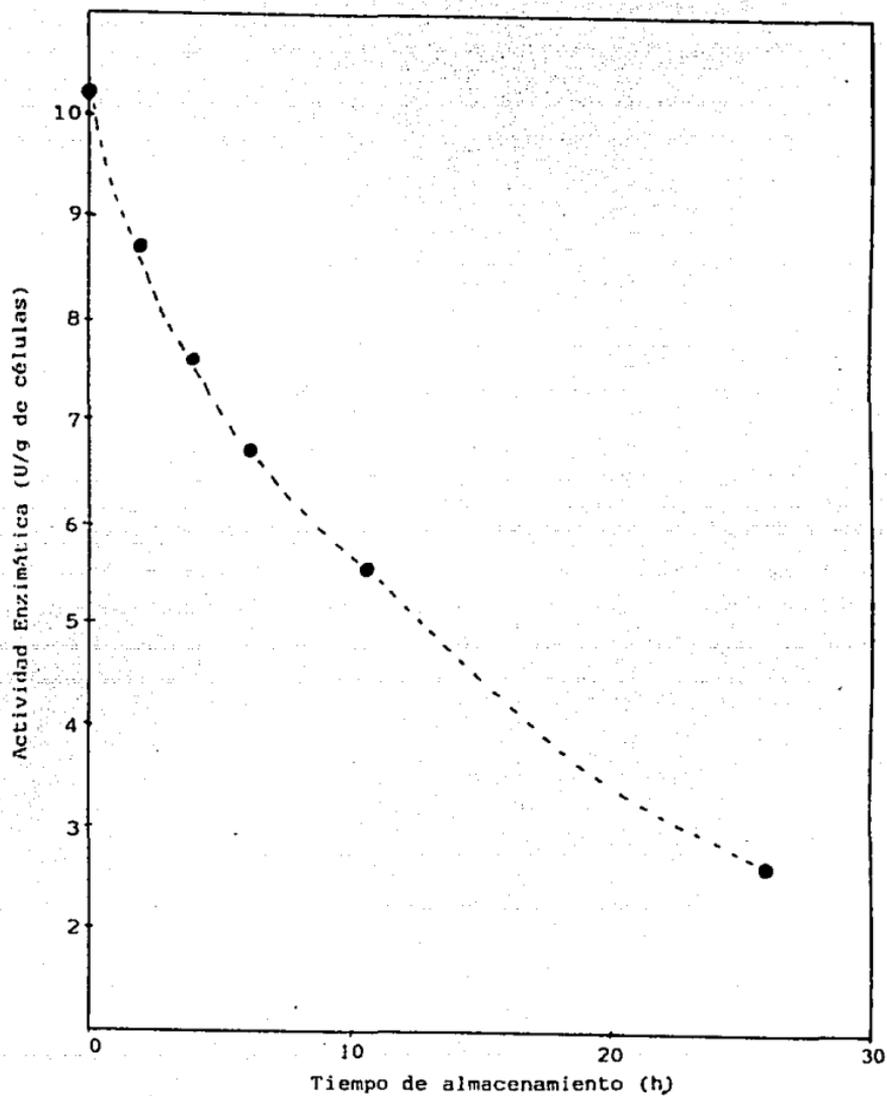


FIGURA 4.14. Estabilidad a 50°C.

4.13.3.2. Influencia del glicerol en la estabilidad de la enzima.

Se prepararon 3 lotes de células resuspendidas en buffer de fosfatos 0.05M, con 0.85% de NaCl, pH 7.4. Todas las muestras fueron almacenadas a 4°C; en dos de ellas se añadió glicerol para conocer su efecto en la estabilidad de las células.

En la tabla 4.18 se ve que el glicerol tiene un efecto estabilizador importante en la enzima, no existiendo diferencias significativas entre las dos concentraciones utilizadas. En todos los casos se observa que al inicio hay una pérdida más rápida de actividad, que conforme pasa el tiempo se va perdiendo más lentamente. Estas características corresponden a cinéticas de desactivación de primer orden.

TABLA 4.18. Influencia del glicerol en la estabilidad de la enzima

tiempo de almacenamiento	ACTIVIDAD RESIDUAL (%) Células resuspendidas en		
	buffer de fosfatos	buffer de fosfatos con glicerol al 25%	buffer de fosfatos con glicerol al 40%
30 días	41	72	78
60 días	22	57	67
90 días	18	48	47

4.13.3.3. Estabilidad de PAL en células liofilizadas

Se preparó un lote de células resuspendidas en el mismo

buffer de fosfatos del punto anterior; posteriormente se liofilizó y se almacenó a dos temperaturas. En la tabla 4.19 se puede ver que las células liofilizadas tienen una estabilidad mayor en comparación con las células resuspendidas en glicerol, incluso las que fueron almacenadas a temperatura ambiente.

TABLA 4.19. Estabilidad de PAL en células liofilizadas.

Tiempo de almacenamiento	Actividad residual (%)	
	24°C	4°C
15 días	88.90	91.7
30 días	82.90	87.0
60 días	64.60	72.7

En general es posible observar que la cepa mutada presenta bastantes diferencias con respecto a la cepa original: mayor producción de enzima en un menor tiempo de fermentación, diferente pH óptimo, menor estabilidad a iguales condiciones de almacenamiento. Esto sugiere que la mutagénesis afectó genes estructurales o regulatorios críticos para el metabolismo celular, crecimiento y síntesis de la enzima.

4.13.4. Caracterización cinética.

El estudio cinético se llevó a cabo a pH 8.5 y a 24 °C con los dos sustratos de la enzima: L-fenilalanina y L-tirosina. Se determinaron las velocidades iniciales en un rango de

concentraciones de sustrato de 83.33 μM a 2082 μM , para dos concentraciones de enzima.

A partir de las velocidades iniciales obtenidas se hicieron las gráficas de Lineweaver-Burk (figuras 4.15, 4.16, 4.17 y 4.18,

TABLA 4.20. Catacterización cinética de PAL

g cél/ensayo de activ.	Sustrato	Km (μM)	Vmax ($\mu\text{M}/\text{min}$)
3.77×10^{-3}	L-fen	425	27.77
1.88×10^{-3}	L-fen	400	15.62
3.77×10^{-3}	L-tir	289	11.11
1.88×10^{-3}	L-tir	250	6.84

con las cuales se determinaron los valores de Km y Vmax para cada sustrato (tabla 4.20).

En todas las gráficas es posible ver que la enzima se comporta de acuerdo con lo establecido por la teoría cinética de Michaelis-Menten.

Para comprobar lo anterior se llevó a cabo otro ensayo a 24°C, con una concentración de sustrato de 166.66 μM y 3.14×10^{-4} g cél/ml de suspensión de ensayo, siguiendo el curso de la reacción hasta que todo el sustrato fué convertido a producto. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4.21.

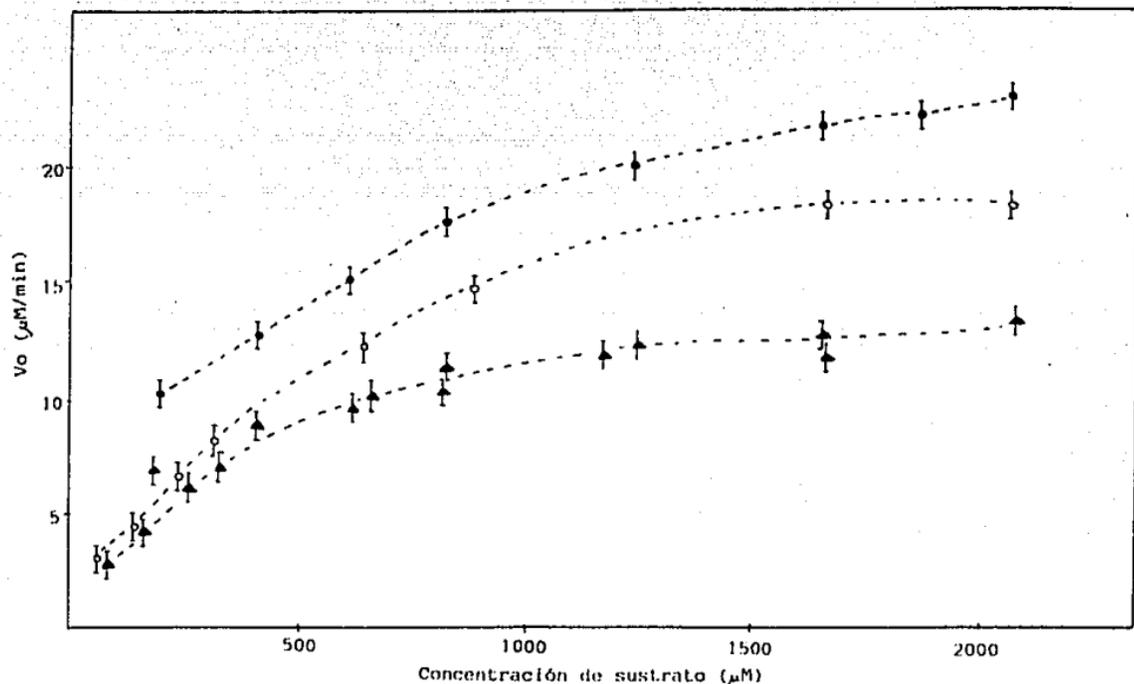


FIGURA 4.15. Caracterización cinética. PAL con L-fenilalanina como sustrato. T=21°C.

- Para 0.1 ml células (3.77×10^5 q cél): 14.10 U/q ; $V_{\text{máx}} = 27.7 \mu\text{M/min}$; $K_m = 425 \mu\text{M}$.
 - Para 0.1 ml células (3.77×10^5 q cél): 10.61 U/q ; $V_{\text{máx}} = 20.83 \mu\text{M/min}$; $K_m = 476 \mu\text{M}$.
 - ▲ Para 0.05 ml células (1.88×10^5 q cél): 13.42 U/q ; $V_{\text{máx}} = 15.62 \mu\text{M/min}$; $K_m = 400 \mu\text{M}$.
- En todos los casos $\sigma = 0.45$

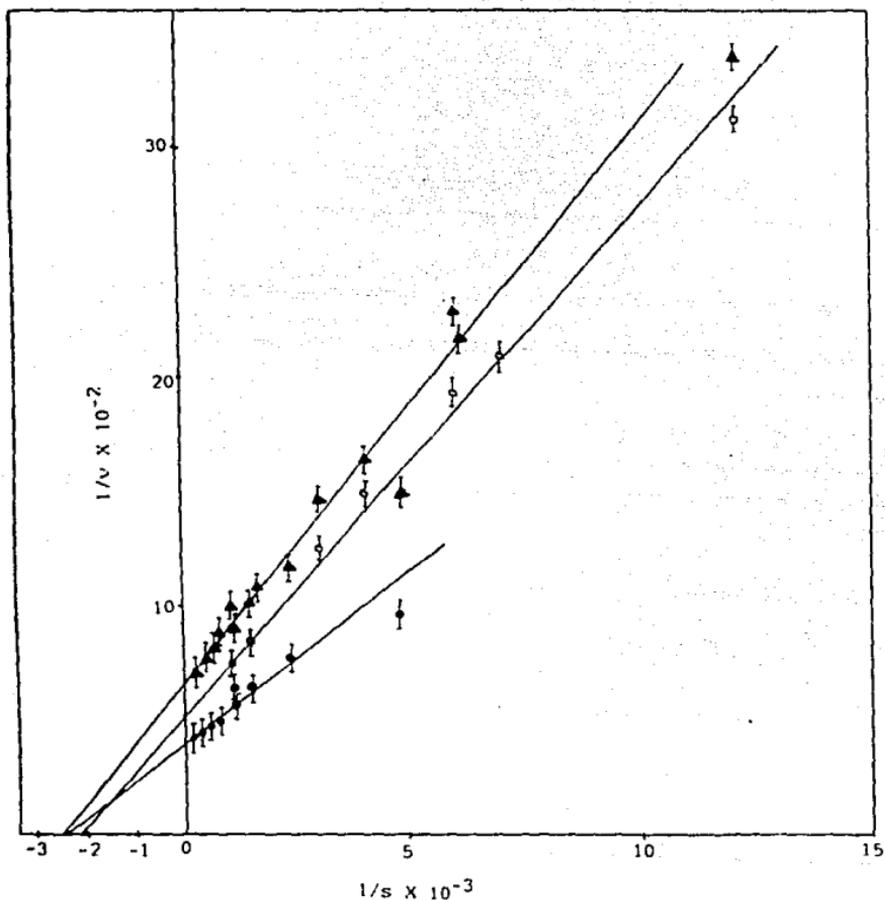


FIGURA 4.16. Caracterización cinética. PAL con L-fenilalanina como sustrato. $T=24^{\circ}\text{C}$.

- Para 0.1 ml de células (3.77×10^{-3} g cél); 14.10 U/g;
 $V_{\text{máx}}= 27.7 \mu\text{M}/\text{min}$; $K_m= 425 \mu\text{M}$.
- Para 0.1 ml de células; 10.61 U/g; $V_{\text{máx}}=20.33 \mu\text{M}/\text{min}$;
 $K_m= 476 \mu\text{M}$.
- ▲ Para 0.05ml de células (1.88×10^{-3} g cél); 13.42 U/g;
 $V_{\text{máx}}= 15.62 \mu\text{M}/\text{min}$; $K_m= 400 \mu\text{M}$.

En todos los casos $\sigma = 0.2$

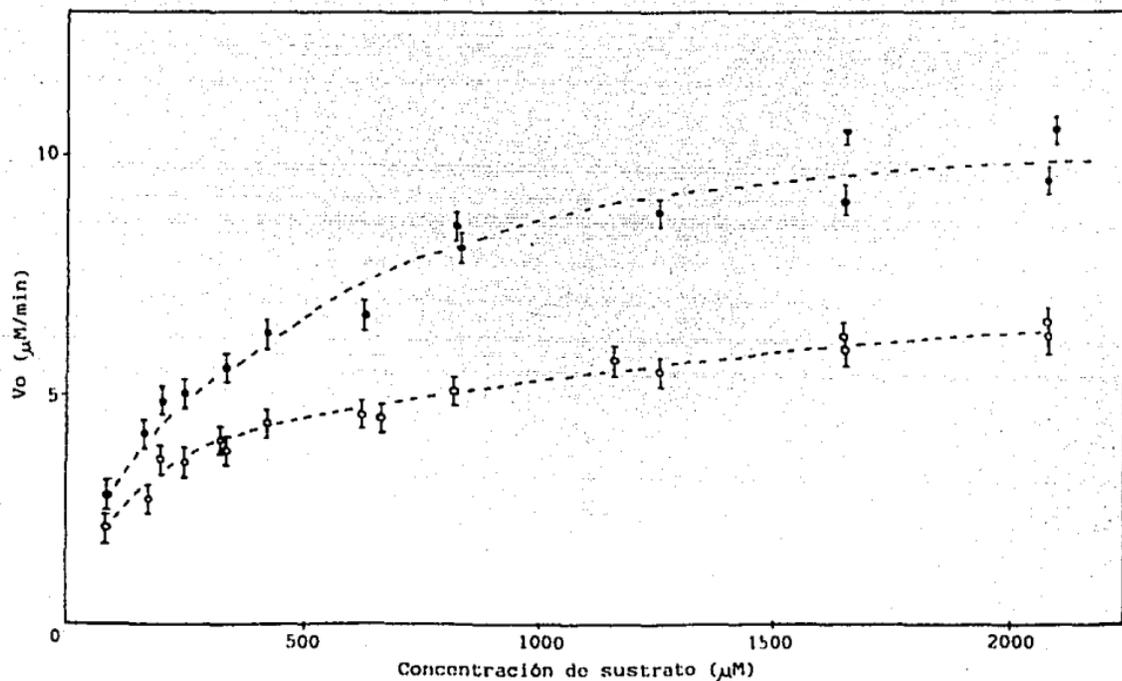


FIGURA 4.17. Caracterización cinética. PAL con l-tirosina como sustrato. T-24°C.

Con 0.1 ml cél.: 6.47 U/g; $V_{m\acute{a}x}$ 11.11 $\mu\text{M}/\text{min}$; K_m 289 μM .

Con 0.05 ml cél.: 6.16 U/g; $V_{m\acute{a}x}$ 6.84 $\mu\text{M}/\text{min}$; K_m 250 μM .

En todos los casos $\sigma = 0.2$

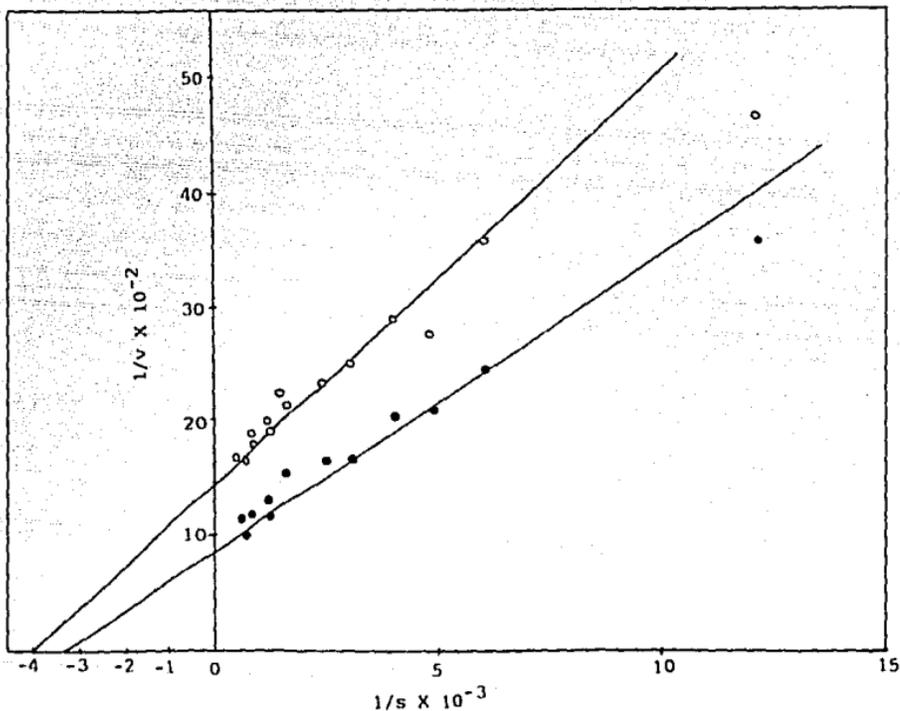


FIGURA 4.18. Caracterización cinética. PAL con L-tirosina como sustrato. $T=24^{\circ}\text{C}$.

Con 0.1ml cél: 6.58 U/g; $V_{\text{máx}}=11.11 \mu\text{M}/\text{min}$; $K_m=289 \mu\text{M}$.
 Con 0.05ml cél: 6.37 U/g; $V_{\text{máx}}=6.84 \mu\text{M}/\text{min}$; $K_m=250 \mu\text{M}$.
 En todos los casos $\sigma = -0.006$

TABLA 4.21. Caracterización cinética de PAL. Segunda serie de experimentos.

Sustrato	Duración del ensayo	Actividad Esp. (U/g)	V max ($\mu\text{M}/\text{min}$)
L-fen	4.5 h	5.77	3.62
L-tir	5.0 h	2.83	1.77

Es necesario hacer notar que la concentración de sustrato utilizada fué muy baja, que de acuerdo con las figuras 4.15 y 4.17 corresponde a la zona de primer orden de reacción: se puede entonces suponer que $S \ll K_m$ y por lo tanto $K_m + S \approx K_m$. Entonces la ecuación $V_i = V_{\text{max}} S / K_m + S$ se reduce a $V_i = V_{\text{max}} S / K_m = K' S$ donde K' es la constante de primer orden de la enzima. Si se integra esta última ecuación se obtiene $\ln S/S_0 = -Kt$ que se reduce a $\ln S_0(1-x)/S_0 = -Kt$ en donde S_0 es la concentración inicial de sustrato y x es el grado de conversión.

Se procedió a graficar $\ln(1-x)$ vs t , en donde $m = V_{\text{max}}/K_m$ (figura 4.19). La forma de la gráfica y los datos de V_{max} obtenidos (muy parecidos a los de la tabla 4.21) indican que a una concentración de sustrato de $166.66 \mu\text{M}$, la enzima se comporta siguiendo una cinética de primer orden. Con este ensayo fue posible ratificar la confiabilidad de los resultados obtenidos en la primera parte de la caracterización cinética.

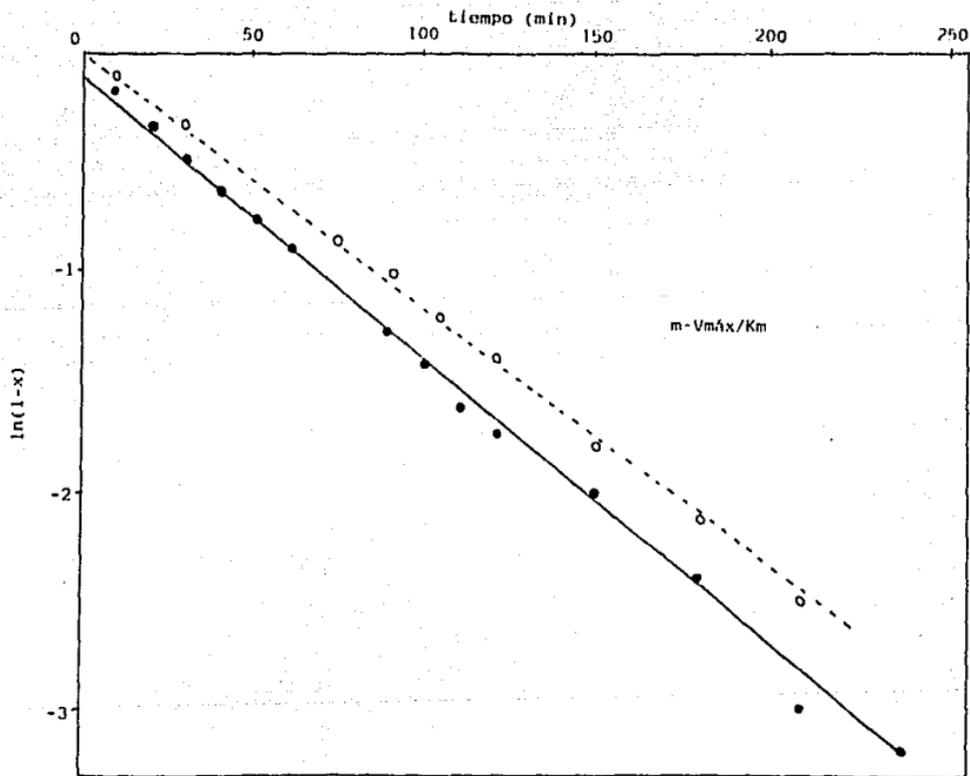
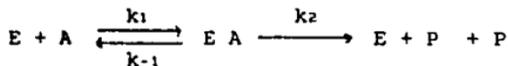


FIGURA 4.19. Caracterización cinética. Segunda serie de experimentos.
 T: 24°C; Concentración de sustrato-166,66 μ M.
 ● L-fen como sustrato. $m = 8.7 \times 10^{-3}$; $V_{máx} = 3.48 \mu$ M/min.
 ○ L-tir como sustrato. $m = 0.0118$; $V_{máx} = 2.95 \mu$ M/min.

Posteriormente se hizo el estudio cinético a 40°C y pH 8.5, determinando las velocidades iniciales en un rango de concentraciones de sustrato de 83.3 μM a 1249 μM, los resultados se muestran en la figura 4.20, en donde se ve que el valor de Km es muy parecido para las dos temperaturas evaluadas (con ambos sustratos). En una reacción de la forma



el valor de Km esta dado por $K_m = K_{-1} + K_2 / K_1$, en donde cada una de las constantes de velocidad se ve influenciada por la temperatura de una forma diferente, sin embargo, se ve que el efecto total (en las 3 constantes) de la temperatura es muy pequeño.

Finalmente, se realizaron otros dos ensayos utilizando una concentración de sustrato de 2082 μM, que corresponde a la zona de saturación de la enzima (figuras 4.15 y 4.17), a una temperatura de 40°C y con una concentración de células en el ensayo de 3.43×10^{-3} g/ml en la reacción con L-fenilalanina y de 1.57×10^{-2} g/ml en el ensayo con L-tirosina, siguiendo el curso de la reacción hasta que la concentración de producto fué constante. Los resultados se muestran en la tabla 4.22.

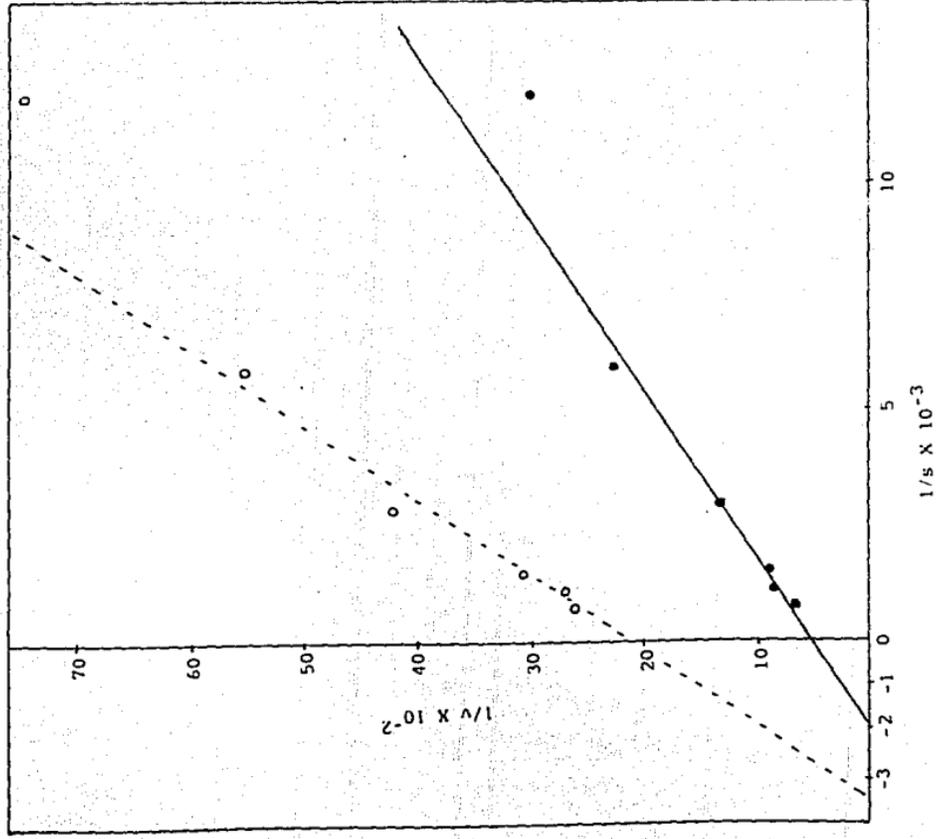


FIGURA 4.20. Estudio cinético a 40°C. Tercera serie de experimentos.

● Sustrato-L-fenilalanina: Km=526.31 μ M.

○ Sustrato-L-tirosina: Km=285.71 μ M.

TABLA 4.22. Caracterización cinética. Tercera serie de experimentos.

Sustrato	Duración del ensayo	Activ. Esp. (U/g)	Vmax (µM/min)
L-fen	4.48 h	5.06	17.37
L-tir	4.30 h	1.99	31.30

Utilizando la ecuación $V_{max} t = S_0 x - K_m \ln(1-x)$ y los valores de K_m obtenidos en el estudio cinético a 40°C, se pueden obtener los valores de tiempo que corresponden a los grados de conversión experimentales, y comparar así los valores teóricos con los obtenidos en los experimentos, como se muestra en la figura 4.21, en donde se ve que en el caso de la L-fenilalanina ambas curvas coinciden, pero no sucede lo mismo con la L-tirosina. Con esta última serie de experimentos se confirmaron los resultados anteriores, pudiéndose asegurar que la enzima evaluada sigue el modelo cinético de Michaelis-Menten.

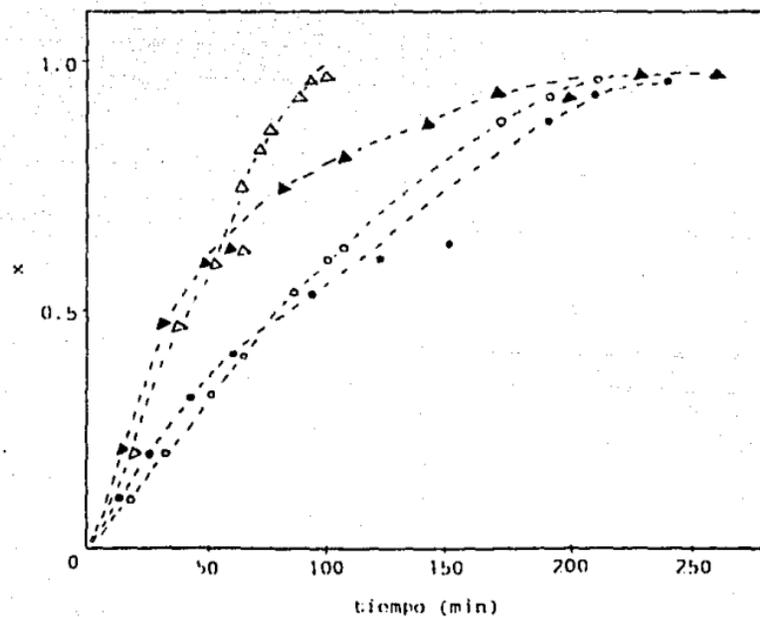


FIGURA 4.21. Caracterización cinética. Tercera serie de experimentos. T-40°C.

L-fenilalanina como sustrato:

- Datos experimentales
- Datos teóricos

L-tirosina como sustrato:

- ▲ Datos experimentales
- △ Datos teóricos

CAPITULO V

CONCLUSIONES

Se efectuó una extensa revisión de la situación que guarda la producción de la enzima fenilalanina amonio-liasa por diversas fuentes microbianas. Se decidió estudiar una cepa poco explotada con el fin de extender las alternativas de producción de la enzima de Sporidiobolus pararoseus.

Dicha cepa fué sujeta a un tratamiento mutagénico, que permitió obtener una mutante con múltiples ventajas con respecto a la cepa original: mayor producción de enzima en un menor tiempo de fermentación, lo que implica menor costo para su producción.

De acuerdo con los experimentos realizados las condiciones óptimas para la producción de fenilalanina amonio-liasa son: utilizando el medio de cultivo C (extracto de levadura, 0.35%; extracto de malta, 1.4% y L-fenilalanina, 0.5%) sin ajustar el pH, incubando a 30°C, 600 rpm y 0.5 vvm, que son las condiciones utilizadas en las fermentaciones en fermentador Bio Flo. Las células deben cosecharse al final de la fase logarítmica, antes de que se presente la caída de actividad. Es conveniente sugerir para trabajos posteriores la evaluación y aplicación de diferentes métodos para estabilizar la actividad de la enzima durante la fermentación, ya que de otra manera es necesario

caracterizar muy bien las fermentaciones y llevarlas a cabo en las mismas condiciones (temperatura, pH, inóculo inicial, agitación, aireación) para conocer el punto exacto de máxima actividad y hacer en ese momento la cosecha de células, antes de la caída brusca de actividad. Algunos reportes permiten preveer que esto es posible y que el uso de leucina o nitrógeno son una solución a este problema.

A pesar de que el medio de cultivo B obtenido por el método de Box Wilson no fué utilizado en la producción de fenilalanina amonio-liasa debido a que la glucosa reprime la síntesis de la enzima, se propone su aplicación para producir biomasa con un alto contenido de pigmentos carotenoides, con aplicación potencial en la alimentación de peces y crustáceos (salmón y camarón).

El trabajo desarrollado permite plantear una alternativa tecnológica para la producción de alimentos libres de fenilalanina. En efecto, con la enzima producida y una vez estabilizada, es posible preparar un catalizador con células inmovilizadas que sea usado para la eliminación de fenilalanina en hidrolizados. Para el efecto se requiere aún de lograr estabilizar la enzima (lo que parece factible) y formular un catalizador para uso continuo.

CAPITULO VI

BIBLIOGRAFIA

1. ABELL C.W. AND SHEN R. Phenylalanine Ammonia-Lyase form the yeast Rhodotorula glutinis. Division of Biochemistry. Department or Human Biological Chemistry and Genetics. The University of Texas Medical Branch. Galveston, Texas.
2. ABELL C.W., HODGINS D.S. AND STITH W.J., 1973. An in vivo evaluation of the chemotherapeutic potency of Phenylalanine Ammonia-Lyase. Cancer research, 33, 2529-2532.
3. AMBRUS C.M., AMBRUS J.L., HORVATH C., PEDERSON H., SHARMA S. AND KANT C., 1978. Phenylalanine depletion for the management of phenylketonuria: use of enzyme reactors with immobilized enzymes. Science, 201, 837-839.
4. AMBRUS C.M., SHARMA S.D., HORVATH C., KALGHATGI K., ANTHONY S., AMBRUS J.L., COOLEY C. AND MIRAND E.A., 1982. In vivo safety of hollow-fiber enzyme reactors with immobilized Phenylalanine Ammonia-Lyase in a large animal model for phenylketonuria. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 224,3,598-602.
5. BANDONI R.J., MOORE K., SUBBA RAO P.V. AND TOWERS G.H.N.,

1968. Phenylalanine and Tyrosine Ammonia-Lyase in some Basidiomycetes. *Phytochemistry*, 7, 205-207.

6. BEZANSON G.S., DESATY D., EMES A.V. AND VINING L.C., 1970. Biosynthesis of cinnamide and detection of phenylalanine ammonia-lyase in Streptomyces verticillatus. *Canadian Journal of Micro-biology*, 16, 147-151.

7. BICKEL H., 1980. Phenylketonuria: Past, Present, Future. *J. Inher. Metab. Dis.*, 3, 123-132.

8. BOURGET L. AND CHANG T.M.S., 1986. Phenylalanine ammonia-lyase immobilized in microcapsules for the depletion of phenylalanine in plasma in phenylketonuric rat model. *Biochimica et Biophysica Acta*, 883, 432-438.

9. CAMM E.L. AND TOWERS G.H.N., 1969. Phenylalanine and Tyrosine Ammonia-Lyase activity in Sporobolomyces roseus. *Phytochemistry*, 8, 1407-1413.

10. CAMM E.L. AND TOWERS G.H.N., 1973. Phenylalanine Ammonia-lyase. *Phytochemistry*, 12, 961-973.

11. CHOI Y.J. AND TRIBE D.E., 1982. Continuous production of phenylalanine using an Escherichia coli regulatory mutant. *Biotechnology letters*, 4, 223-228.

12. COSTA I., MARTELLI H.L., DA SILVA I.M. AND POMEROY D., 1987. Production of Beta-carotene by a Rhodotorula strain. Biotechnology letters, 9, 5, 373-375.
13. DIXON R.A., BOLWELL G.P., SUNLOY R.L., LAWRENCE D.K. AND BRIDGES I.G., 1987. An affinity matrix for the isolation of L-phenylalanine ammonia-lyase. Phytochemistry, 26, 3, 659-661.
14. EVANS C.T., CONRAD D., HANNA K., PETERSON W., CHOMA C. AND MISAWA M., 1987. Novel stabilization of phenylalanine ammonia-lyase catalyst during bioconversion of trans-cinnamic acid to L-Phenylalanine. Appl. Microbiol. Biotechnol., 25, 399-405.
15. EVANS C.T., HANNA K., CONRAD D., PETERSON W., MISAWA M., 1987. Production of phenylalanine ammonia-lyase (PAL): isolation and evaluation of yeast strains suitable for commercial production of L-phenylalanine. Applied Microbiology and Biotechnology, 25, 406-414.
16. EMES A.V. AND VINING L.C., 1970. Partial purification and properties of L-phenylalanine ammonia-lyase from Streptomyces verticillatus. Canadian Journal of Biochemistry, 48, 613-622.
17. FINKELMAN M.A.J. AND YANG H.H., 1986. Method for the production of phenylalanine ammonia-lyase by fermentation. Patente americana No. 4,584,273.

18. FISKE M.J. AND KANE J.F., 1984. Regulation of Phenylalanine biosynthesis in Rhodotorula glutinis. Journal of Bacteriology, 160, 2, 676-681.
19. FRITZ R.R., HODGINS D.S. AND ABELL C.W., 1976. Induction and purification from yeast and clearance in mammals. The Journal of Biological Chemistry, 251, 15, 4646-4650.
20. GILBERT H.J. AND JACK G.W., 1981. The effect of proteinases on phenylalanine ammonia-lyase from the yeast Rhodotorula glutinis. Biochem. J., 199, 715-723.
21. GILBERT H.J. AND TULLY M., 1982. Synthesis and degradation of phenylalanine ammonia-lyase of Rhodospiridium torulooides. Journal of Bacteriology, 150, 2, 498-505.
22. GILBERT H.J. AND TULLY M., 1985. Protection of phenylalanine ammonia-lyase from proteolytic attack. Biochemical and Biophysical research communications, 131, 2, 557-563.
23. GILBERT. H.J., CLARKE I.N., GIBSON R.K., STEPEHNSON J.R. AND TULLY M., 1985. Molecular cloning of the phenylalanine ammonia-lyase gene from Rhodospiridium torulooides in Escherichia coli K- 12. Journal of Bacteriology, 161, 314-320.
24. HAVIR E.A. AND HANSON K.R., 1968. L-Phenylalanine ammonia-

lyase I. Purification and molecular size of the enzyme from potato tubers. *Biochemistry*, 7, 5, 1896-1903.

25. HAVIR E.A. AND HANSON K.R., 1968. L-Phenylalanine ammonia-lyase II. Mechanism and kinetic properties of the enzyme from potato tubers. *Biochemistry*, 7, 5, 1904-1914.

26. HODGINS D.S., 1971. Yeast Phenylalanine ammonia-lyase. Purification, properties and the identification of catalytically essential dehydroalanine. *The Journal of Biological Chemistry*, 246, 9, 2977-2985.

27. HOSKINS J.A., JACK G., WADE H.E., PEIRIS R.J.D. AND WRIGHT E.C., 1980. Enzymatic control of phenylalanine intake in phenylketonuria. *The Lancet*, 1, 8165, 392-394.

28. INOUE S., MATSUNAGA Y., IWANE H., SOTOMURA M. AND NOSE T., 1986. Entrapment of phenylalanine ammonia-lyase in silk fibroin for protection from proteolytic attack. *Biochemical and Biophysical research communications*, 141, 1, 165-170.

29. KALGHATGI K.K. AND SUBBA RAO P.V., 1975. Microbial L-Phenylalanine ammonia-lyase. Purification, subunit structure and kinetic properties of the enzyme from Rhizoctonia solani. *Biochem. J.*, 149, 65-72.

30. KANE J.F. AND FISKE M.J., 1985. Regulation of phenylalanine

ammonia-lyase in Rhodotorula glutinis. Journal of Bacteriology, 161, 3, 963-966.

31. KLEIN M.D. AND LANGER R., 1986. Immobilized enzymes in clinical medicine: an emerging approach to new drug therapies. Tibtech, 179-186.

32. KOUKOL J. AND C.E.E., 1961. The metabolism of aromatic compounds in higher plants IV. Purification and properties of the phenylalanine deaminase of Hordeum vulgare. The Journal of Biological Chemistry, 236, 10, 2692-2698.

33. LARA P., 1989. Producción de alimentos libres de fenilalanina II. Separación de la fenilalanina. Tesis de maestría. Facultad de Química, U.N.A.M.

34. LOPEZ B.J., 1989. Producción de alimentos libres de fenilalanina I. Hidrólisis enzimática de la proteína. Tesis de maestría. Facultad de Química, U.N.A.M.

35. MARUSICH W.C., JENSEN R.A. AND ZAMIR L.O., 1981. Induction of L-phenylalanine ammonia-lyase during utilization of phenylalanine as a carbon or nitrogen source in Rhodotorula glutinis. Journal of Bacteriology, 146, 3, 1013-1019.

36. MEISTER A., 1965. Biochemistry of the aminoacids, second edition, vol II. Academic Press, U.S.A., 1067-1073.

37. MOORE K., SUBBA RAO P.V. AND TOWERS G.H.N., 1968. Degradation of phenylalanine and tyrosine by Sporobolomyces roseus. Bioch.J., 106, 507-514.
38. OGATA K., UCHIYAMA K. AND YAMADA H., 1967. Metabolism of aromatic amino acid in microorganisms, part I. Formation of cinnamic acid from phenylalanine. Agr. Biol. Chem., 31, 2, 200-206.
39. OGATA K., UCHIYAMA K., YAMADA H. AND TOCHIKURA T., 1967. Metabolism of aromatic amino acid in microorganisms, part II. Properties of phenylalanine ammonia-lyase of Rhodotorula Agr. Biol. Chem., 31, 5, 600-606.
40. ONISHI N., YOKOZEKI K., HIROSE Y. AND KUBOTA K., 1987. Enzymatic production of L-phenylalanine from trans-cinnamic acid by Endomyces lindneri. Agric. Biol. Chem., 51, 1, 291-292.
41. ORNDORFF S.A., CONSTANTINO N., STEWART D. AND DURHAM D.R., 1988. Strain improvement of Rhodotorula graminis for production of a novel L-phenylalanine ammonia-lyase. Applied and Environmental Microbiology, 54, 4, 996-1002.
42. PARKHURST J.R. AND HODGINS D.S., 1971. Phenylalanine and tyrosine ammonia-lyase activity in Sporobolomyces pararoseus Phytochemistry, 10, 2997-3000.

43. PARKHURST J.R. AND HODGINS D.S., 1972. Yeast Phenylalanine ammonia-lyase. Properties of the enzyme from Sporobolomyces pararoseus and its catalytic site. Archives of Biochemistry and Biophysics, 152, 597-605.
44. SHEN R. AND ABELL C.W., 1977. Phenylketonuria: a new method for simultaneous determination of plasma phenylalanine and tyrosine. Science, 197, 665-667.
45. SIKORA L.A. AND MARZLUF G.A., 1982. Regulation of L-phenylalanine ammonia-lyase by L-phenylalanine and nitrogen in Neurospora crassa. Journal of Bacteriology, 150, 3, 1287-1291.
46. SKINNER F.A., PASSMORE S.M., DAVENPORT R.R., 1980. Biology and activities of yeasts. Academic Press, London, 45, 97.
47. SNAPPER I., YU T.F. AND CHIANG Y.T., 1940. Cinnamic acid metabolism in man. Proc. Soc. Exp. Biochem. Med., 44, 30-34.
48. SUBSECRETARIA DE SALUD. Guía para la prevención del retraso mental producido por hipotiroidismo congénito, toxoplasmosis congénita activa y fenilcetonuria, 1988.
49. VOLLMER P.J., SCHRUBEN J.J., MONTGOMERY J.P. AND YANG H.H., 1986. Method for stabilizing the enzymatic activity of phenylalanine ammonia-lyase during L-phenylalanine production.

Patente americana No. 4,584,269.

50. WANG D.I., COONEY C.L., DEMAIN A.L., DUNNILL P., HUMPHREY A.E., LILLY M.D., 1979. Fermentation and Enzyme Technology. John Wiley and Sons, U.S.A.

51. WICK J.F. AND WILLIS J.E., 1982. Phenylalanine dependent de novo synthesis of phenylalanine ammonia-lyase from Rhodotorula glutinis. Archives of Biochemistry and Biophysics, 216, 2, 385-391.

52. WIEDER K.J., PALCZUK N.C., VAN ES T. AND DAVIS F.F., 1979. Some properties of polyethylene glycol: Phenylalanine ammonia-lyase adducts. The Journal of Biological Chemistry, 254, 24, 12579-12587.

53. YAMADA S., NABE K., IZUO N., NAKAMICHI K. AND CHIBATA I., 1981. Production of L-phenylalanine from trans-cinnamic acid with Rhodotorula glutinis containing L-phenylalanine ammonia-lyase activity. Applied and Environmental Microbiology, 42, 5, 773-778.