



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

OBTENCION Y CARACTERIZACION DE UNA MUTANTE  
DE Sporidiobolus parroseus SOBREPDUCTORA DE  
FENILALANINA AMONIO LIASA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

**Marina Ramírez Alvarado**

México, D. F.

1992.

FALLA DE ORIGEN



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.

## INDICE

	PAGINA
INTRODUCCION .....	1
OBJETIVOS.....	3
GENERALIDADES.....	4
MATERIALES Y METODOS.....	27
RESULTADOS.....	32
CONCLUSIONES.....	55
RECOMENDACIONES.....	56
ANEXO.....	57
BIBLIOGRAFIA.....	59

## INTRODUCCION

Se piensa que existen unas 2000 clases de defectos genéticos humanos (Lenhinger, 1986). La fenilcetonuria constituye un ejemplo de enfermedad genética, relativamente común y hasta el momento sin ninguna posibilidad de curación. Sin embargo, cuando se descubre en la infancia y si se controla la dieta del niño, éste crecerá y será un adulto normal. La detección y el tratamiento son muy costosos, aunque, independientemente de las cuestiones humanitarias, los costos ocasionados al no efectuar el diagnóstico y el tratamiento de los niños fenilcetonúricos son mucho mayores.

En Estados Unidos los nacimientos anuales se estiman en alrededor de 3 millones y se ha calculado que el programa de tratamiento y diagnóstico tendría un costo de 8 millones de dolares (Lenhinger, 1986). Considerando una incidencia de un caso de fenilcetonuria por cada 10,000 nacimientos, si no se efectúan los ensayos de detección y se suministra el tratamiento adecuado en el momento del nacimiento, los 300 niños fenilcetonúricos deberán ser mantenidos en una institución para enfermos mentales durante 30 años, que es su promedio de vida, con un costo por manutención de 80 millones de dolares. La detección oportuna y el tratamiento representan sólo el 10% del costo de manutención de los individuos afectados, de tal forma que con una inversión de 8 millones de dolares se pueden mantener con vida y sanos a 300 individuos durante más de 30 años.

En México no se ha estudiado aún un número suficientemente grande de recién nacidos como para conocer con exactitud la frecuencia de la fenilcetonuria. Entre 1975 y 1977 gracias a una colaboración entre la UNAM y SSA, se realizó el programa de tamiz neonatal que consistía en tomar gotas de sangre del talón del bebé recién nacido en una tarjeta de papel filtro y analizar el contenido de aminoácidos. Se detectaron dos pacientes entre treinta y seis mil recién nacidos estudiados. A causa del cambio de la Administración Pública, se interrumpió el programa, reanudándose en 1986.

A través del Programa Nacional de Prevención del Retraso Mental, en donde se realiza un trabajo conjunto entre la UNAM, la Secretaría de Salud, el ISSSTE, los servicios médicos del Departamento del Distrito Federal, así como la Secretaría de Defensa y de Marina, se ha desarrollado un proyecto Interinstitucional titulado "Obtención de un alimento bajo en Fenilalanina", con materia prima nacional, haciendo que el producto sea más disponible para los enfermos de fenilcetonuria.

Este proyecto se desarrolla desde 1987 en el Departamento de Alimentos y Biotecnología, de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química, y en el Instituto de Biotecnología de la UNAM, como una aportación al Programa de Prevención del Retraso Mental.

El proyecto está contemplado en varias etapas, a fin de desarrollar un proceso para obtener un alimento bajo en fenilalanina.

La primera etapa consistió en seleccionar una proteína base, llevar a cabo una hidrólisis enzimática extensa y realizar la separación de la fenilalanina del hidrolizado por adsorción física con carbón activado.

La segunda etapa consistió en efectuar la formulación del producto terminado, una evaluación económica preliminar y pruebas a nivel de planta piloto. Pensando en la posibilidad de eliminar la fenilalanina por un método enzimático, se caracterizaron los crecimientos y las actividades enzimáticas de dos diferentes cepas de levaduras.

Actualmente, en lo que se puede plantear como una tercera etapa del proyecto, se pretende mejorar el proceso de eliminación de fenilalanina, haciéndolo más específico a través de un método enzimático utilizando la enzima fenilalanina amonio liasa. Este trabajo piensa contribuir en esta dirección mediante la búsqueda selectiva de mutantes de *Sporidiobolus pararoseus* sobreproductoras de fenilalanina amonio liasa.

## OBJETIVOS

1.- Desarrollar un método de selección de cepas mutantes de *Sporidiobolus pararoseus* sobreproductoras de Fenilalanina amonio liasa.

2.- Obtener y caracterizar una mutante de *Sporidiobolus Pararoseus* sobreproductora de Fenilalanina amonio liasa.

## GENERALIDADES

### Fenilcetonuria

La fenilcetonuria es una enfermedad de tipo metabólico que se conoce desde hace 58 años cuando en 1934 Asborn Fölling identificó el primer caso en Noruega (Koch y Wenz, 1987). Esta enfermedad es causada por una mutación estructural en el gene de la fenilalanina hidroxilasa que está en el cromosoma 12. Esta mutación ocasiona una disminución o anulación de la actividad de la enzima hepática que transforma la fenilalanina en tirosina.

Esto ocasiona un incremento en los niveles de fenilalanina y de otros metabolitos, tanto en sangre como en orina. Estos metabolitos son neurotóxicos y ocasionan un retraso mental severo si se acumulan durante los primeros 6-8 años de vida. Los niveles altos de fenilalanina en sangre, desde 20 mg/10 mL, inhiben el transporte de tirosina a través de la membrana pre-sináptica, resultando en una reducción de catecolaminas (Bourget y Chang, 1985). Esto trae como consecuencia que los niveles de tirosina sean inferiores a 5 mg/10 mL, lo que provoca serios problemas en la síntesis de los neurotransmisores: dopamina, norepinefrina y epinefrina.

A su vez, los derivados de la fenilalanina que se encuentran en orina se incrementan (ácido orto-hidroxifenilacético, ácido fenilpiruvico, ácido fenilacético, y fenil acetil glutamina). Debido a todas estas alteraciones se presentan los siguientes problemas: incidencia alta de microcefalia, defectos de nacimiento, retardo en el crecimiento pre y post-natal, desórdenes neuropsiquiátricos, confusión e irritabilidad. Se ha observado también deficiencias en la eficiencia intelectual (Koch y Wenz, 1987).

La Fenilcetonuria es la forma más severa de la hiperfenilalaninemia, pero existen diferentes formas de manifestación de la enfermedad, requiriéndose diversos tratamientos:

#### **a) Fenilcetonuria clásica**

Las personas que sufren de esta enfermedad presentan concentraciones de fenilalanina en sangre superiores a 20 mg/10 mL, niveles normales de tirosina y un exceso de metabolitos de la fenilalanina en la orina. Esta situación se mantiene en tanto se consuma una dieta normal. Se presenta una mínima o nula actividad de fenilalanina hidroxilasa.

#### **b) Fenilcetonuria variante**

Las personas que presentan fenilcetonuria variante tienen concentraciones de fenilalanina sanguínea entre 10 y 20 mg/10 mL pero no tienen metabolitos de fenilalanina presentes en la orina, a menos que tengan ingestas proteicas excesivas. Los niveles de tirosina son normales y presentan actividad normal de fenilalanina hidroxilasa. Se piensa que esta forma de fenilcetonuria es provocada por un defecto en la biosíntesis de los co-factores de la fenilalanina hidroxilasa.

#### **c) Hiperfenilalaninemia benigna**

Esta enfermedad se le adjudica a las personas que tienen niveles de fenilalanina sanguínea entre 4 y 10 mg/10 mL, que están cercanos a los niveles normales de fenilalanina sanguínea que son entre 1 y 2 mg/10 mL, los niveles de tirosina en sangre son normales y no presentan metabolitos de fenilalanina en la orina, presentan actividad de fenilalanina hidroxilasa en niveles normales. La hiperfenilalaninemia es detectada a través de las pruebas que se realizan con los recién nacidos ya que ellos no presentan los síntomas de la fenilcetonuria clásica, llegando a ser individuos con una inteligencia normal y asintomáticos clínicamente.

La fenilcetonuria se detecta a través de cuatro parámetros bioquímicos:

- a) **Medición de la fenilalanina en sangre.** En el caso de los fenilcetonúricos es mayor o igual a 20 mg /10 mL de sangre. Por lo general se mide durante 2 días consecutivos teniendo una dieta normal.
- b) **Medición de los niveles de tirosina en sangre.** Los niveles de tirosina son menores de 5mg /10 mL de sangre en el caso de los fenilcetonúricos.
- c) **Presencia de metabolitos de la fenilalanina.** Análisis de metabolitos excretados en orina.
- d) **Ensayo de Gutrie.** Consiste en detectar fenilcetonuria por inhibición microbiana en gotas de sangre seca para diagnosticar la enfermedad en recién nacidos.

Como métodos más específicos se tienen los siguientes:

- d) **Medición de la actividad de fenilalanina hidroxilasa.**
- e) **Reto proteico.** Seguimiento de la fenilalanina consumida estableciendo situaciones de alto consumo del aminoácido.
- f) **Fenilalanina amonio liasa.** Medición de fenilalanina y tirosina en sangre a través de la reacción catalizada por la fenilalanina amonio liasa.

Los métodos de análisis del gene de fenilalanina hidroxilasa se han empezado a llevar a cabo, aunque esto es una técnica muy sofisticada de implantación como método de diagnóstico en el mediano plazo.

#### **Tratamiento de la fenilcetonuria**

A diferencia de muchas enfermedades que afectan al sistema nervioso central, la fenilcetonuria diagnosticada antes del año de vida, puede recuperar el retraso mental producido por la acumulación de ácido fenilpirúvico y la disminución de la tirosina. Esto se descubrió en 1963 cuando Gruter percibió una mejoría en el comportamiento y desarrollo motor de niños fenilcetonúricos que comenzaban con una dieta restringida de fenilalanina. Los cambios siempre se dirigían hacia la normalización.

La dieta baja en fenilalanina es hasta ahora, el método más efectivo para controlar la fenilcetonuria, aunque en periodos de infección, fiebre o embarazo, los niveles de fenilalanina en sangre se incrementan considerablemente y requieren de un tratamiento especial para eliminar este aminoácido. Algunos de estos métodos se basan en la utilización de la enzima fenilalanina hidroxilasa, como se mencionó, deficiente en los fenilcetonúricos. Sin embargo existe el problema de que se requiere de una gran cantidad de tejido de mamíferos para poder extraerla significativamente, además de que tiene una vida media muy corta (Ambrus et al, 1978).

Otro de los métodos enzimáticos utilizados se basa en el uso de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL), ampliamente distribuida en plantas superiores, levaduras y algunas bacterias. Los productos de la acción de la PAL sobre fenilalanina, ácido t-clínámico y amoníaco, no son tóxicos y son fácilmente eliminables a través de orina. Esta enzima se puede usar de diferentes maneras:

1) En un reactor enzimático con enzima inmovilizada en donde se hace pasar la sangre del paciente para que reaccione la fenilalanina con la enzima. A través de este método se crea una dependencia del paciente con la clínica, ya que tendría que asistir periódicamente para la eliminación del aminoácido, además de que requiere de una total esterilidad en todo el equipo. Así mismo, se podría provocar reacciones inmunológicas con la enzima (Ambrus et al, 1978).

2) Otra alternativa de tratamiento ha sido inmovilizar la enzima y encapsularla para que sea ingerida por el paciente. Esto trae otros problemas como son la desnaturalización de la enzima en el estómago por el pH tan bajo, o bien la hidrólisis por efecto de las proteasas intestinales. Además, la enzima pierde el 70% de su actividad estando encapsulada y a pH fisiológico (Inoue et al, 1986). Se trabaja arduamente en encontrar un excipiente adecuado para que la enzima llegue intacta a donde se encuentra el aminoácido y que se pueda conservar la mayor actividad posible (Gilbert y Jack, 1981)

Ante estos problemas, la mejor y más eficiente vía de tratamiento parece ser a través de un control estricto de la ingesta de fenilalanina (Arai et al, 1986). Para obtener el alimento bajo en fenilalanina se tienen las siguientes alternativas:

- 1.-Hidrólisis ácida de una proteína, en donde la fenilalanina se elimina por adsorción con carbón activado.
- 2.-Hidrólisis enzimática de una proteína con eliminación de la fenilalanina por cromatografía con ciclodextrinas y con carbón activado.
- 3.-Hidrólisis ácida o enzimática de una proteína y eliminación enzimática de la fenilalanina con fenilalanina amonio liasa
- 4.-Mezcla de aminoácidos en donde la formulación permite controlar la concentración de fenilalanina.

Entre los alimentos bajos en fenilalanina que existen actualmente en el mercado de los Estados Unidos y Europa se encuentran los siguientes:

1.-LOFENALAC. Es un producto comercial de Mead Johnson al que se le ha eliminado el 95% de la fenilalanina. Es un alimento nutricionalmente completo, que cubre los requerimientos diarios de proteínas, carbohidratos, grasas, vitaminas y minerales. La hidrólisis de la proteína se lleva a cabo utilizando ácido clorhídrico y esto intensifica el sabor desagradable y penetrante del hidrolizado, limitando su aceptación por los bebés.

2.-PHENYL-FREE. Es un producto de Mead Johnson formulado con una mezcla de L- aminoácidos y por lo tanto libre de fenilalanina. Contiene menos valor calórico que LOFENALAC pero permite combinarlo con otros alimentos por su ausencia de fenilalanina. Presenta resultados satisfactorios de los pacientes que lo consumen, aunque puede presentar problemas de osmolaridad a nivel de intestino delgado.

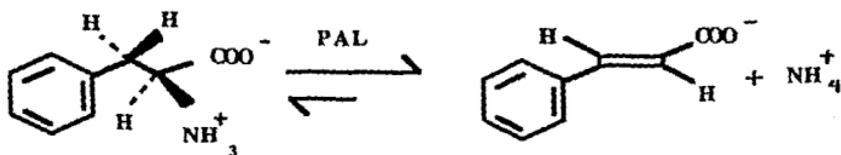
3.-MILUPA PKU1 Y PKU2. Se trata de mezclas sintéticas de L-aminoácidos que se producen por MILUPA AG en Alemania. Están adicionados con vitaminas, minerales, elementos traza y cantidades mínimas de sacarosa. Se puede combinar su consumo con el de otros alimentos, manteniendo el control cuidadoso de ingesta de fenilalanina. Su composición de aminoácidos semeja al de la leche materna y su sabor es más aceptado que el de los hidrolizados proteicos.

Como se mencionó en la Introducción, este proyecto pretende mejorar un proceso de elaboración de un alimento bajo en fenilalanina en donde la eliminación de Fenilalanina a través de carbón activado, se pretende sustituir con una eliminación específica con fenilalanina amonio liasa proveniente de *Sporidiobolus pararoseus*. El proceso será mucho más eficiente si se tiene un catalizador con gran actividad enzimática, misma que se busca a través de una mutación en donde se seleccionan cepas sobreproductoras.

#### Fenilalanina amonio liasa

La enzima fenilalanina amonio liasa (PAL), (E.C. 4.3.1.5.) está ampliamente distribuida en plantas verdes incluyendo las criptógamas. También se encuentra en los *Basidiomycetes* y *Streptomyces* y no ha sido observada en bacterias verdaderas como *Escherichia coli* y *Streptococcus*, ni en células de mamíferos. Fue descubierta por Koukol y Conn en 1961 y es quizá la enzima más estudiada en el metabolismo secundario de plantas. Una razón por la que esta enzima ha sido objeto de múltiples estudios es que en un tejido determinado, los niveles de enzima pueden fluctuar significativamente en intervalos cortos de tiempo en respuesta a una gran variedad de estímulos (Camm y Towers, 1973).

La PAL cataliza la reacción de desaminación de la fenilalanina para dar como productos ácido t-cinámico y amoníaco (de acuerdo a la reacción 1). No requiere de cofactores y la reacción catalizada es reversible. Esta es probablemente una de las razones por las que ha cobrado tanta importancia su estudio y su utilización ya que se ha aplicado para la síntesis industrial de fenilalanina. El aminoácido se utiliza, entre otras cosas, para sintetizar el dipéptido de asp-phe conocido comercialmente como Aspartame, edulcorante no calórico. Esta enzima también es utilizada para el tratamiento de ciertos tumores neoplásicos en ratones, para el análisis de fenilalanina en suero y para el tratamiento in vivo de la fenilcetonuria.



REACCION 1

Los pesos moleculares reportados para la Fenilalanina amonio liasa (PAL) son de 226,000 (en *Streptomyces verticillatus*) a 330,000 para la enzima de papa. Está formada por 4 subunidades, dos de las cuales están involucradas en la catálisis y aparentemente son idénticas. Se han encontrado dos formas de la enzima de papa: una de ellas tiene el doble de peso de la otra, pero no son interconvertibles.

Se ha encontrado que la PAL proveniente de una gran cantidad de tejidos presenta dos diferentes propiedades catalíticas, que en algunos casos difieren de su sensibilidad para los compuestos fenólicos. Una es catalítica sobre tirosina, lo que no se ha demostrado en muchas preparaciones de PAL.

El sitio activo de la enzima tiene un residuo de dehidroalanina en algunas plantas, en *Basidiomycetes* y en *Streptomyces*. Con respecto a los inhibidores, la PAL de todas las fuentes, es inhibida por el ácido t-cinámico (Camm y Towers, 1973). Esta enzima es una de las pocas transformadoras de aminoácidos que no requiere de piridoxal 5 fosfato como cofactor.

#### Fenilalanina amonio liasa en plantas

La PAL de origen vegetal cataliza la primera reacción de biosíntesis de faseolina a fenilalanina como respuesta de la infección de hongos o bacterias patógenas (Dixon y Lamb, 1979). También se piensa que es una enzima reguladora de la biosíntesis de isoflavonoides y otros fenilpropanoides, incluyendo lignina y otros flavonoides, así como ácido cafeico y ácido quínico. Neish *et al*, han demostrado que tanto la fenilalanina como el ácido t-cinámico son buenos precursores de lignina o de fenilpropanoides y que pueden ser incorporados a la lignina de monocotiledones y de dicotiledones. Dado que el ácido t-cinámico es el primer compuesto que está involucrado en la biogénesis de flavonoides, se puede esperar que la PAL tenga propiedades reguladoras.

El efecto de la luz en los niveles de la PAL ha recibido gran atención debido al descubrimiento de Zucker, en el que la actividad de PAL se incrementa en rebanadas de papa incubadas a la luz. El efecto estimulador de la luz en tejido dañado por un corte se ha visto en la mayoría de las plantas verdes, aunque algunas raíces, por razones obvias son insensibles a la luz.

Existe cierto interés en conocer los cambios graduales que permiten la síntesis de flavonoides en plantas que crecen en condiciones normales durante la coloración otoñal. Se ha comprobado que esto tiene que ver con la estimulación de la actividad de la fenilalanina amonio liasa (Creasy, 1978).

Se ha encontrado que la enzima fenilalanina amonio liasa es más estable y tiene una mayor especificidad por sus sustratos que la tirosina amonio liasa que se ha encontrado en la mayoría de las plantas superiores en las que se ha estudiado la PAL (O'Neal y Keller, 1970).

En la tabla 1 se presentan las características principales de la PAL proveniente de diversas fuentes vegetales.

TABLA 1

CARACTERÍSTICAS DE FENILALANINA AMONIO LIASA PROVENIENTES DE VARIAS PLANTAS SUPERIORES

Fuente	Peso molecular	pH óptimo	Temperatura óptima	Actividad específica	Km (L-fen) mM	Inhibidores	Especificidad	Referencia
discos de las hojas de fresa	—	8.8	25°C	0.046 U/g	—	ácido t-cinámico y DCMU	activa para L-fenilalanina, ácido t-cinámico y p-cumárico	Creasy, 1978
Ipomaea batatas (camote)	—	8.5-9.5	30°C	—	101	ácido t-cinámico, tirosina, p-fluorofenilalanina, -ácido cumárico y ácido cafeico	—	Young & Neish, 1966
Hordeum vulgare (cebada)	—	8.8-9.2	40°C	5.13 U/mg de prot.	1700	ácido t-cinámico, algunos metales, ácidos aromáticos y L-cisteína	activa para L-fenilalanina	Koukol & Conn, 1961
Nicotiana tabacum (tabaco)	—	8-8.6	37°C	—	220	ácido t-cinámico, ácido cafeico, ácido o-cumárico, o-tirosina, NaCN y NaBH <sub>4</sub>	—	O'Neal & Keller, 1970
Triticum Aestivum (trigo)	—	8.8	50-54°C	1.06 U/g	—	L y D-tirosina, DL-tirosina, DL-hidroxifenilalanina y DL-fluorofenilalanina	activa para L-fenilalanina y DL-fluorofenilalanina	Young & Neish, 1966
Tubérculo de papa	330,000	8.7	30°C	0.79U/mg de prot	*	agentes que reaccionan con grupos carbonilo	activa con L y D-fenilalanina	Havir y Hanson, 1968
Zea mays (maiz)	306,000	—	30°C	—	270	p-fenilalanina	activa con L-tirosina	Havir et al 1971

\* No sigue cinética de Michaelis-Menten

Haciendo un análisis general de la información presentada en la Tabla 1, podemos concluir que las condiciones de reacción ( pH y temperatura óptimos) son muy parecidos: pH=8.5 y T=30°C para todas las fuentes. La actividad específica en el tejido es una de las características que más varían, el máximo valor lo presenta la cebada, además de presentar diferentes especificidades.

Se ha encontrado que la hidroxilación de fenilalanina en para- o meta-, produce sustratos con poca afinidad por la enzima, mientras que la orto-tirosina y el ácido orto-cumárico, son inhibidores muy potentes. En el caso de la enzima de tubérculo de papa y de tabaco, éstas son fuertemente inhibidas por NaCN y NaBH<sub>4</sub>, que son compuestos generadores de carbonilos, por lo que se puede asegurar que el mecanismo de acción de la enzima requiere de la participación de al menos un grupo carbonilo (O'Neal y Keller, 1970).

#### Fenilalanina amonio liasa en levaduras *Basidiomycetes*.

La PAL ha sido estudiada en levaduras *Basidiomycetes* por la gran importancia que ha adquirido a partir de que su uso en la síntesis de fenilalanina para el Aspartame. Las enzimas de origen microbiano desplazan a las enzimas de origen vegetal ya que se pueden producir a gran escala y en un espacio relativamente reducido.

TABLA 2

COMPARACION DE LAS ACTIVIDADES DE FENILALANINA AMONIO LIASA TENIENDO L-FENILALANINA COMO SUSTRATO.	
Microorganismo	Actividad especifica de PAL (U/g)
<i>Rhodotorula rubra</i>	52.83
<i>Rhodotorula glutinis</i>	47.16
<i>Rhodotorula minuta</i>	41.81
<i>Rhodosporidium thoruloides</i>	32.36
<i>Rhodotorula infirmo-miniatum</i>	29.43
<i>Rhodotorula maivinellum</i>	18.00
<i>Rhodotorula graminis</i>	6.76
<i>Sporidiobolus roseus</i>	18.98
<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	31.40
Fuente: Evans et al, 1987	

Durante la fermentación para obtener la PAL de *Rhodotorula glutinis*, la enzima es inducida con una cantidad pequeña de fenilalanina. Se sabe también que para todas estas levaduras, la actividad de PAL tiene su pH y Temperatura óptimas diferentes a las del crecimiento. Es concebible que una restricción en el crecimiento cause estres metabólico suficiente para dirigir a las células a un metabolismo secundario, por lo que se prefiere establecer pH y temperaturas óptimas de crecimiento que en general son de pH=5.5-6.0 y T=30°C.

La enzima PAL es inducida por L-fenilalanina, por lo que en el momento en el que el aminoácido funciona como única fuente de carbono y de nitrógeno, la actividad de la enzima se expresa inmediatamente. La actividad se reprime cuando la fuente de carbono se cambia o en algunos casos, se diversifica.

Este es el caso del crecimiento en glucosa o cuando ésta se añade al medio con L-fenilalanina. Se ha encontrado que la presencia de amoniaco en el medio ayuda a aumentar la síntesis de PAL.

La PAL de *Rhodotorula glutinis* ha sido ampliamente estudiada y se toma como referencia para el estudio en otras levaduras.

La máxima actividad de PAL en *Rh. glutinis* se encuentra entre la mitad y el final de la fase logarítmica. La enzima es degradada por proteólisis cuando las células entran en fase estacionaria.

La inducción de la enzima PAL por L-fenilalanina, ocurre de la mitad al final de la fase logarítmica de crecimiento y es independiente del tiempo en el que se añade la L-fenilalanina, por lo que la fase de crecimiento de la levadura es crítico para la producción y aislamiento de enzima activa (Wick y Willis, 1984).

Fritz *et al* en 1976 estudiaron también el medio para la inducción de la enzima y encontraron que con 1.0% de extracto de malta, 0.1% de extracto de levadura y 0.1% de fenilalanina, la actividad se expresa a las 14 horas de crecimiento, al final de la fase logarítmica, con una actividad específica de 2 U/g peso húmedo de levadura.

A continuación presentamos las tablas 3 y 4 en donde se presentan las características cinéticas de la enzima en *Rh. glutinis* así como en otras fuentes microbianas.

Cuando el crecimiento de *Rh. glutinis* se realiza en un medio cuya única fuente de carbono y de nitrógeno es la fenilalanina, se encuentran dos funciones fisiológicas de la enzima fenilalanina amonio liasa: la liberación de ion amonio como única fuente de nitrógeno y el primer paso en la ruta de utilización de la cadena carbonada.

Se pensó que existían dos tipos de enzima, una inducible (pensando en una organización de un operón) durante la limitación de carbono y otra inducible por la limitación de nitrógeno.

TABLA 3

PROPIEDADES DE FENILALANINA AMONIO LIASA DE RHODOTORULA GLUTINIS		
Especificidad por el sustrato:	$K_m$	$V_{max}$
L-fenilalanina	$2.5 \times 10^{-4}$ M	1.4 mol/min/g
L-tirosina	$1.5 \times 10^{-4}$ M	0.7 mol/min/g
Inhibidores competitivos:	$K_I$	
D-fenilalanina	$3.3 \times 10^{-3}$ M	
ácido t-cinámico	$2.6 \times 10^{-5}$ M	
ácido p-cumárico	$1.8 \times 10^{-5}$ M	
Peso molecular:	330,000 daltones	
subunidades	4	
a.a. en el sitio activo	dehidroalanina	
punto isoeléctrico:	5.4	
pH óptimo:	8.75	
estabilidad térmica:	no pierde actividad a 50°C en 10 min.	

fuentes: Havir y Hanson 1973, Hodgins 1971, Ogata et al 1967, Fritz et al 1976.

T A B L A 4  
CARACTERISTICAS DE FENILALANINA AMONIO LIASA PROVENIENTE DE DIVERSAS FUENTES MICROBIANAS

Microorganismo	Peso molecular	pH óptimo	Temperatura óptima	Actividad específica	Km (L-fen) mM	Inhibidores	Especificidad
<i>Neurospora crassa</i>	—	—	30°C	2.08 U/g prot	500	—	Activa con L-fen
<i>Rhizoctonia solani</i> (hongos patógeno)	330,000	8.7-8.9	30°C	680 U/g prot	*	Agentes que reaccionan con carbonilos, D-fen, ác. transcinámico, p-cumárico y caféico	Activa con L-fen, L-tir y análogos
<i>Rhodotorula glutinis</i>	275,000 330,000	9.0	30°C	37 U/g cel 28 U/g cel 2 U/g cel	250 210	Ac. t-cinámico, D-fen y análogos, agentes que reaccionan con grupos SH y carbonilos	Activa con L-fen, L-tir y DL-3-hidroxi-fen
<i>Rhodotorula texensis</i>	—	9	30°C	—	1,500	Agentes que reaccionan con grupos SH y algunos metales	Activa con L-fen y L-tir
<i>Rhodotorula graninis</i>	—	—	30°C	28 U/g cel	—	Ac. fenilpropiónico y t-cinámico	D,L y DL-fen
<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	—	8.5	50°C	31.4 U/g cel	780	Ac. fenilpropiónico, t-cinámico y análogos	Activa con L-fen y L-tir
<i>Sporobolomyces roseus</i>	—	8.7	30°C	18.9 U/g cel	400	Ac. t-cinámico y p-cumárico	Activa con L-fen y L-tir
<i>Sporobolomyces pararoseus</i>	300,000	—	30°C	—	300	Agentes que atacan grupos amino, SH y carbonilo	Activa con L-fen y L-tir
<i>Streptomyces verticillatus</i>	226,000	8.5-9.5	25°C	0.2 U/g micelio	180	Metales pesados, ác. t-cinámico, agentes que reaccionan con SH y carbonilos	Activa para o-, m- y p-fluoro, p-cloro y p-metil fen
<i>Ustilago hordei</i>	—	8.8	30°C	—	450	Ac. t-cinámico	Activa para L-fen

\* No sigue cinética de Michaelis-Menten

Esta hipótesis estaba respaldada por el hecho de que existen diferentes isoenzimas reguladoras de PAL en sistemas vegetales. En esta levadura, no se han encontrado diferencias en las características fisiológicas de las enzimas, dependiendo de que manera en que se induce (Marusich et al, 1981).

Pensando en la posibilidad de tener un precursor inactivo de la enzima, y que sea éste el que se induzca por la L- fenilalanina, Gilbert y Tully en 1982 encontraron que *Rhodospiridium thoruloides* presenta la síntesis de PAL de novo, debido a la inducción por L-fenilalanina y no encontraron evidencias del precursor inactivo sintetizado constitutivamente.

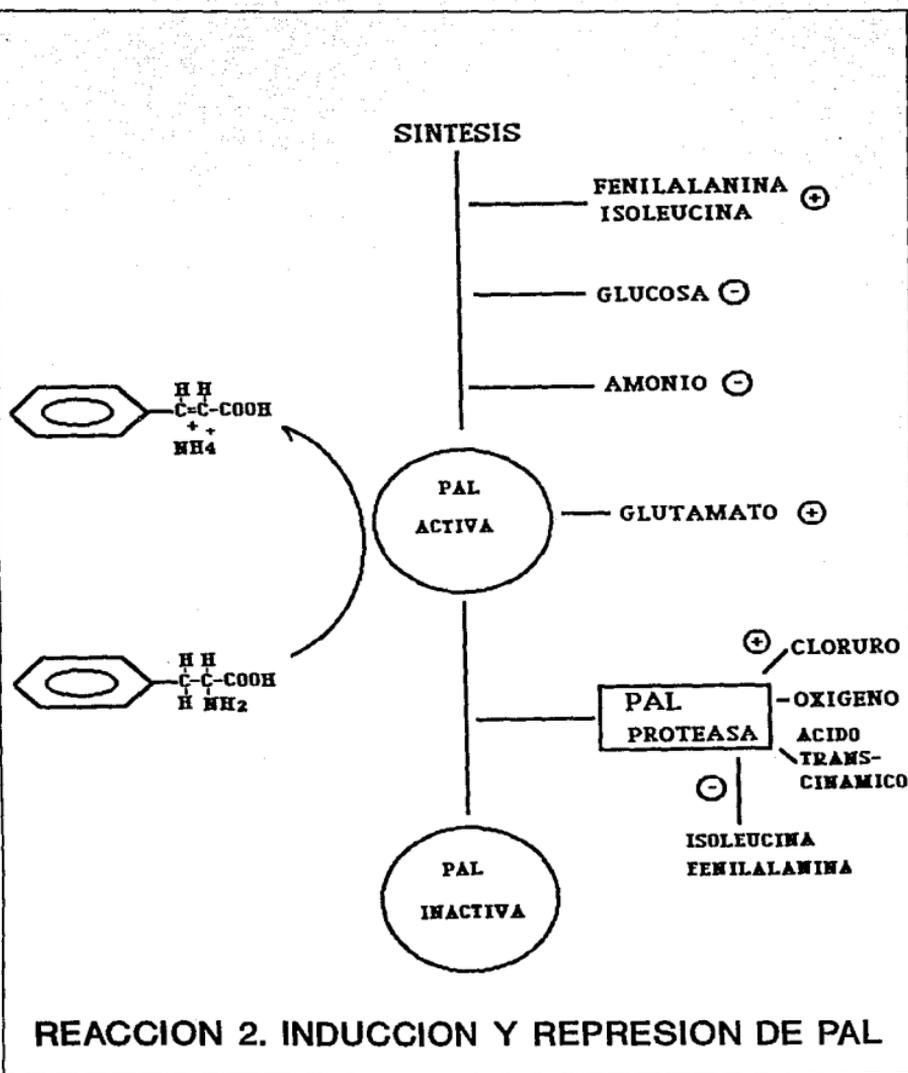
Así mismo, encontraron que la represión de la actividad de PAL por glucosa está ligada a la represión en la síntesis de la enzima y no por inactivación catabólica o exclusión del inductor.

En la reacción 2 se presenta el mecanismo de inducción y represión general para la PAL de levaduras.

Kawasaki et al (1992) caracterizaron el crecimiento y la producción de la PAL de *Sporidiobolus pararoseus* y *Rhodospiridium thoruloides*. Encontraron que la máxima actividad de ambas cepas se presenta en la última etapa de la fase logarítmica de crecimiento, teniendo mayor actividad específica *Sporidiobolus pararoseus*, además definieron un medio óptimo de inducción enzimática.

## M u t a c i ó n

El fenómeno de la mutación consiste en un cambio en el material genético; es de gran utilidad para cambiar las condiciones biológicas de los seres vivos. Se ha estudiado ampliamente las mutaciones en bacterias y se comienza a tener datos acerca de la mutación en Eucariotes.



En el marco del presente trabajo, la obtención de una mutante sobreproductora es una herramienta para la optimización del proceso de producción de la enzima, a partir de haber establecido los parámetros de crecimiento ideales para la cepa silvestre (Hernández, 1990).

Para aplicar una mutación se requiere de la coordinación de ciertos pasos experimentales que son los siguientes:

- 1.- Determinación del tipo de mutante deseada para la investigación que se realiza.
- 2.- Elección del mutágeno más apropiado para inducir la mutación deseada.
- 3.- Establecimiento de las condiciones adecuadas para la expresión de la nueva mutación.
- 4.- Enriquecimiento de la mutante deseada para asegurar la probabilidad de su reestablecimiento.
- 5.- Detección de la nueva mutante por procedimientos directo o indirectos apropiados.
- 6.- Caracterización de la mutante.
- 7.- Mapeo del sitio de la nueva mutación, de tal manera que se localice la posición en el genoma.

En la tabla 5 se presentan los diferentes tipos de mutágenos y su acción sobre el material genético.

### MUTAGENOS

Los mutágenos se dividen en dos tipos:

**MUTAGENESIS FISICA:** a través de radiación ultravioleta, gamma y X.

**MUTAGENESIS QUIMICA:** a través de etilen metano sulfonato (EMS), N-metil, N'-nitro, N-nitrosoguanidina (NTG), gas mostaza, etc.

Existe otra división de los agentes mutagénicos químicos, que se basa en su manera de actuar. Esta los divide en tres grupos:

**TABLA 5**  
**PROPIEDADES DE LOS AGENTES MUTAGENICOS MAS COMUNES**

Tipo de mutágeno	Mecanismo de mutagénesis	Tipo de mutación	Efectividad relativa	Ventajas y desventajas
<b>RADIACIONES</b>				
Rayos X, neutrones térmicos	Rompimiento del cromosoma	Inversiones	Alta	El equipo necesario no es accesible
Ultravioleta	Dimerización de pirimidina	Transición GC-AT, transversión	Media	Mutación de alto espectro
<b>AGENTES QUIMICOS</b>				
Bases análogas	Errores en la replicación del DNA	Transiciones AT-GC	Baja	Relativamente ineficiente
Hidroxiuremia	Deaminación de citosina	Transiciones GC-AT	Baja	Induce preferentemente en una dirección
Ac. nitroso	Deaminación de citosina y adenina	Transiciones bidireccionales	Media	—
N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG)	Alquilación de bases en la etapa de replicación	Transiciones GC-AT	Muy alta	Muy mutagénico a bajos niveles de muerte. Induce múltiples mutaciones en regiones localizadas
Etil-meta-sulfonato (EMS)	Alquilación de guanidina	Bidireccional	Media	Similar a NTG pero sin mutaciones múltiples
Gas mostaza	Interacción de bases durante la replicación	Inserción de bases	Alta	Compuestos difíciles de obtener
Polvo de ecricina	Interacción de bases durante la replicación	Pérdida de elementos extracromosómicos	Baja	Efectivo para células de plásmidos
Novobiocina	Bloquea la replicación del DNA	Recuperación de células con plásmidos	Alta	Efectivo para células de plásmidos

Fuentes: Carlton y Brown

+ Mutagenos que afectan la replicación del DNA. En este grupo están incluidos El ácido nitroso, que desamina la adenina produciéndose hipoxantina y se obtiene uracilo como producto de la desaminación de citosina; debido a esto se producen transiciones AT--GC y/o GC--AT.

También se encuentra en este grupo la hidroxilamina que reacciona con pirimidinas, pero solo la reacción con la citosina es mutagénica ya que el grupo amino es reemplazado por un grupo hidroxilamino. A través de su acción mutagénica se provoca una tautomerización en donde se dan transiciones GC--AT.

Otro grupo de compuestos es el de los AGENTES ALQUILANTES, considerándose el sistema mutagénico más potente para aplicación práctica. En este grupo están incluidos el etilmetanosulfonato (EMS), metilmetanosulfonato (MMS), dietilsulfato (DES), diepoxibutano (DEB), N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG), N-metil-N-nitroso-urea y el gas mostaza. La mutación con agentes alquilantes ocurre de varias maneras. Estos compuestos causan la formación de todo un espectro de bases alquiladas en el DNA, con fosfotriesteres y sitios con purina libre. Aunque la 7-alkilguanina es el producto de alquilación más común en la mayoría de los casos, éste no causa mutaciones.

La O<sup>6</sup>-alkilguanina y la O<sup>6</sup>-alkiluracilina son las lesiones premutacionales más importantes, esto ocasiona errores de apareado, principalmente transiciones AT--GC (mutación directa).

Un segundo proceso que también termina en mutación es la inducción de la reparación SOS (error prone). Cuando la alquilación del DNA se realiza en un nivel bajo, el sistema constitutivo de reparación libre entra en acción, ocasionándose mutaciones aleatorias dentro de este mecanismo. Aún cuando la alquilación se llevó a cabo en grandes niveles las enzimas involucradas en la reparación SOS son inducidas. Para *Escherichia coli*, existe competencia entre la reparación adaptativa de errores libres y la reparación del Sistema SOS. La frecuencia de mutación es dependiente de que sistema de reparación esté funcionando.

### **N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina**

El uso de N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG) en un programa de mutación ocasiona dificultades por su efecto carcinogénico, pero es una de los agentes mutagénicos más efectivos.

Una gran proporción de mutantes es encontrada teniendo un bajo índice de muertes. El 90 % de las mutaciones propiciadas por NTG son transiciones GC--AT, teniendo pocas omisiones en el DNA y mutaciones de barrera, que son propiciadas por la omisión de pares GC.

El mecanismo molecular de la reacción de la NTG no está completamente estudiado. Este compuesto se descompone *in vivo*. En soluciones acidificadas se produce ácido nitroso, que aunque es un agente mutagénico, no muy efectivo en el pH en el que actúa la NTG (pH 6-9). En pH alcalino se forma Diazometano que es un agente metilador muy fuerte.

Además de que la alquilación provoca que no exista replicación del DNA, el punto principal de acción de la NTG es en una de las zonas de replicación del DNA. Esto sucede a través del cambio que existe en la DNA polimerasa III, durante la replicación del DNA. En este proceso, existe una duplicación incorrecta de un pequeño segmento del DNA hasta que la polimerasa defectuosa sea reemplazada por una molécula intacta. Esto explica el hecho de que las mutaciones con NTG ocurren frecuentemente en agregados de genes.

### **+ Análogos de las bases que se incorporan en DNA replicado**

Por su similitud estructural, los análogos de las bases como el 5-bromouracilo (BU) o el 2-aminopurina (AP) son incorporados en el DNA replicado en lugar de las bases correspondiente Timina y Adenina. Los análogos tautomerizan más frecuentemente que las bases naturales: BU en ceto forma pares con adenina, mientras BU en enol forma pares con guanina. Si se incorpora BU en ceto la transición es AT--GC, y si la incorporación de BU es en enol, la transición es GC--AT.

Las bases análogas tienen menos importancia en la aplicación práctica debido a que existen cepas importantes industrialmente de las que se conoce poco acerca de su genética y podría ser muy costoso establecer las condiciones óptimas de mutagénesis. Como ejemplo podemos citar que para la incorporación de BU en el DNA se necesita hacer con un organismo que crezca con deficiencia de timina.

#### **+Mutágenos de barrera**

Estos mutágenos se introducen en el DNA durante la replicación o reparación y a través de esta intercalación causan inserción u omisión de uno ó varios nucleótidos. Esto dá como resultado la formación de una proteína falsa. Los mutágenos de barrera más comunes son la acridina naranja, la proflavina y la acriflavina. El tamaño de la acridina es exactamente equivalente al tamaño de un mononucleótido. Su desventaja es que no tienen mucho efecto mutagénico sobre bacterias.

#### **OTROS METODOS DE MUTACION**

##### **genes mutadores**

Se puede incrementar la frecuencia de mutación en un factor de 100 a través de introducir un gen mutador. Esto provoca equivocaciones de la DNA polimerasa que provoca transiciones o transversiones, dependiendo del gen mutador. Se ha probado en *Escherichia coli* con algunos problemas de manejo de las cepas mutantes, debido al gran intervalo de mutación que se genera.

##### **Elementos de inserción de secuencias, transposones y bacteriofagos Mu.**

Los elementos de inserción de secuencias son secuencias de DNA que cuentan con una longitud variable (entre 800 y 1400 pares de bases) que pueden ser incorporadas en diferentes puntos del genoma y esto mismo sucede con los transposones y el bacteriófago temperado Mu.

Estos elementos se han utilizado en *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*.

Estos elementos destruyen la función del gene en el sitio de su integración. La incorporación del insertador de secuencias 1 (IS1) tiene un efecto polar en los genes distales con respecto al promotor. Los genes no son lo suficientemente transcritos, probablemente debido al bloqueo de la síntesis del RNA mensajero.

El insertador de secuencias 2 (IS2) se conecta al promotor, el cual, cuando se incorpora en la orientación apropiada, resulta de una expresión constitutiva de genes localizada en la expresión del gene estructural. Más aún, los elementos insertadores de secuencias causan aberraciones cromosomales, en particular IS1 causa omisiones, mientras que IS2 causa duplicaciones.

No se tienen evidencias de que este procedimiento pueda llevarse a cabo para cepas industriales, aunque se ha trabajado con otros procariontes además de los mencionados anteriormente y se tienen estructuras similares en eucariotes.

#### **Mutagenesis "in vitro".**

Se ha hecho posible la inserción de mutaciones directamente a genes específicos, a través del conocimiento de nuevos métodos en Biología Molecular, como el uso de endonucleasas de restricción o la incorporación de análogos de las bases nitrogenadas en vértices en sitios específicos del DNA. Para la aplicación de estos métodos para mejorar cepas industriales, es necesario tener un conocimiento amplio de los genes involucrados en la vía metabólica y de sus sitios de restricción.

## MATERIALES Y METODOS

### MATERIALES

#### Microorganismo utilizado

Por su actividad, se trabajó con la cepa *Sporidiobolus pararoseus* NRRL-Y5484 que fue obtenida de USDA en forma liofilizada.

Esta cepa presenta una alta actividad de acuerdo con Kawasaki *et al* en 1992. Estos autores estudiaron dos levaduras que tienen actividad de PAL que no han sido estudiadas ampliamente, la cual se conservó a través de dos métodos:

a) En refrigeración a 4°C en tubos inclinados con medio optimizado para la inducción de la PAL sólido (MO) (La composición se describe posteriormente). Previamente se hizo crecer a 30°C durante 7 días. Se programaron resiembras cada 2 meses.

b) En congelación a -20°C en frascos viales con glicerol estéril al 15% y cultivo de 24 horas en MO líquido; volúmenes iguales de la solución de glicerol y del cultivo eran mezclados y congelados.

#### Medios de cultivo

a) Medio optimizado para la inducción de la PAL (MO). Este medio contiene 0.8% de L-fenilalanina, 0.35% de extracto de levadura y 1.4% de extracto de malta disueltos en agua destilada y sin ajuste de pH.

b) Medio de mutación para la inducción de la PAL (MM). Este medio contiene 0.8% de L-fenilalanina, 0.7% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y 1.0% de stock de sales. El stock de sales consiste en: 0.1% de NaCl, 0.1% de  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  y 0.1% de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  disueltos en agua destilada y sin ajuste de pH.

c) Medio de selección de mutantes (MSM). Este medio tiene la misma composición que el medio de mutación al cual se le adicionó ácido fenilpropiónico (PPA) en diferentes concentraciones (0.00073%-1.46%)

En todos los casos, si se requiere medio sólido, se agrega 2.0% de agar bacteriológico.

#### **Fermentaciones en matraz**

Se prepararon pre-inóculos de 24 horas de crecimiento a partir de las células mantenidas en congelación en matraces erlenmeyer de 125 mL con 50 mL de MO. Con este caldo se inocularon matraces erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de MO. Se consideró que el volumen de inóculo fuera siempre el 10% del volumen de fermentación.

Las condiciones de fermentación fueron las siguientes:

Temperatura : 30°C

Aereación producida por 100 rpm

## **MÉTODOS**

### **Permeabilización de células**

Las células fueron permeabilizadas como lo describen Gilbert y Tully (1985) con las siguientes modificaciones:

1.- Se toman 10 ml de medio de cultivo y se centrifuga a 4°C durante 10 minutos a 10,000 rpm.

2.- Se desecha el sobrenadante.

3.- Se resuspende el paquete celular en 1 ml de acetona fría y se mantiene a 4°C durante 10 minutos, con agitación ocasional.

4.- Se centrifuga a 4°C durante 10 minutos a 10,000 rpm.

5.- Se desecha el sobrenadante.

6.- Se resuspende el paquete celular en 10 ml de disolución amortiguadora de fosfatos 0.05 M, pH=7.4, con 0.85% de NaCl a fin de lavar las células. Se centrifuga a 4°C durante 10 minutos a 10,000 rpm.

7.- Se elimina el sobrenadante y se repite la operación de lavado al menos dos veces más.

8.- El último lavado se dá con buffer Tris-HCl 0.1N pH=8.5.

9.- Se elimina el sobrenadante y se almacena en congelación hasta la medición de actividad.

#### Medición de la actividad de PAL

Se determina la actividad de la enzima PAL siguiendo el incremento de absorbancia a 290 nm en un espectrofotometro durante 15 minutos como lo describen Abell y Shen (1987):

1.- Se coloca 0.1 ml de células permeabilizadas resuspendidas en disolución amortiguadora Tris-HCl 0.1 M, pH= 8.5.

2.- Se agrega 2.8 ml de disolución amortiguadora Tris-HCl 0.1 M, pH= 8.5.

3.- Se agita y se ajusta a cero.

4.- Se agrega 0.1 ml de L-Fenilalanina 24.99 mM.

5.- Se agita y se toma la lectura del espectrofotómetro a 290 nm, para observar la aparición del ácido trans-cinámico.

6.- Se sigue la reacción durante 15 min.

Una unidad de actividad de PAL se define como la cantidad de enzima que produce 1  $\mu\text{mol}$  de ácido trans-cinámico en un minuto.

La actividad específica se reporta por gramo de peso seco de células permeabilizadas, a 30°C y pH= 8.5.

Para obtener los gramos de peso seco, se realizó una curva patrón de peso seco, cuya ecuación es la siguiente:

$$\text{m(g de peso seco/mL)} = \{ (A_{650} \text{ nm dil } 1/10) + 0.0178 \} / 465.127$$

La curva patrón de peso seco de células se realiza de la siguiente manera:

Se inocula un matraz erlenmeyer de 250 mL que contiene 100 mL de medio óptimo, con 1 frasco que contiene 2 mL de glicerol al 30% estéril y 2 mL de caldo de cultivo todo esto conservado en congelación. Se deja crecer durante 24 horas y se toman 10 mL de medio, se realizan diluciones y se les mide la  $A_{650} \text{ nm}$  con una dilución 1/10; posteriormente se filtra al vacío sobre membranas millipore de 0.45  $\mu\text{m}$  previamente puestas a peso constante, se dejan secar a 50°C al vacío y se pesan cada 3 horas hasta que estén a peso constante.

**Método de selección de las cepas mutantes sobreproductoras de la enzima PAL**

**Método de mutación**

Para llevar a cabo la mutación fue necesario realizar una curva de sobrevivencia en donde se determina la concentración y el tiempo de exposición del agente mutagénico que nos lleva a tener de 1-10% de sobrevivientes.

Con esto se asegura que las cepas que sobreviven no solo resistieron sino que sí son mutantes. El esquema de trabajo es muy parecido para la curva de sobrevivencia y para la mutación.

La selección de mutantes se realizó tanto en medio sólido como en medio líquido. Como fundamento del método de selección se empleó la inhibición de un análogo del producto; el PPA.

#### MEDIO SOLIDO

Para conocer la concentración de células que se tenían en una caja petri, se realizó una curva de A650 nm en función de las unidades formadoras de colonias que crecen en 4-7 días a 30°C en cajas petri conteniendo al medio óptimo.

Conociendo la concentración de células, entonces se trabaja variando las concentraciones del inhibidor ácido fenil propiónico (PPA). El medio utilizado fue el medio de mutación.

Se variaron las concentraciones del inhibidor PPA en el medio de mutación en el intervalo descrito en el MSM.

Tratándose de un ácido, se tiene que disolver el PPA en agua y ya disuelto ajustar el pH a 7 ya que la disolución 100 mM presenta pH de 2.0.

#### MEDIO LIQUIDO

Se buscó la concentración en donde la cepa silvestre no presentara crecimiento, de tal manera que al poner a crecer las mutantes en ese medio, sólo las cepas sobreproductoras crecen.

Partiendo de la base de los ensayos en fase sólida, se realizaron fermentaciones con medio de mutación en donde se varió la concentración del inhibidor desde 10 hasta 100 mM. Se creció la cepa en las mismas condiciones de Temperatura y aereación.

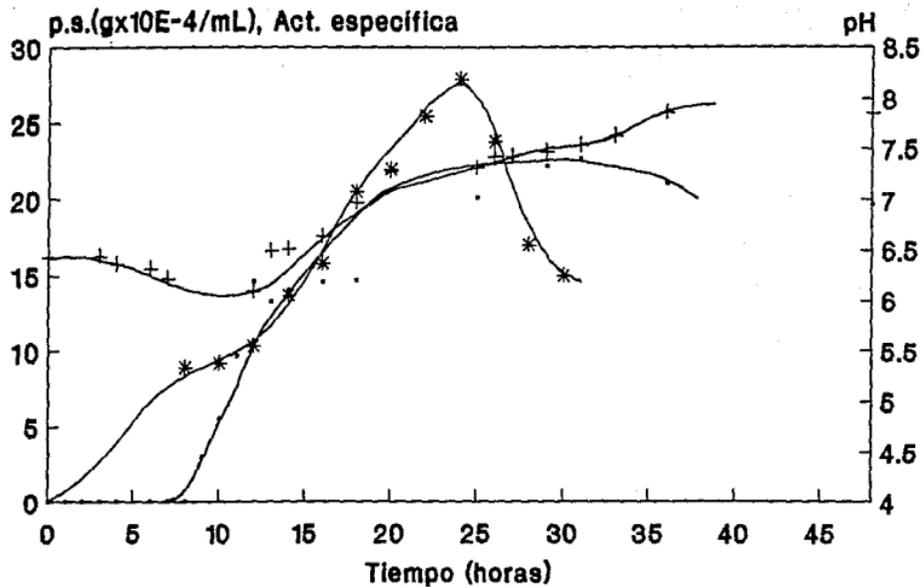
## RESULTADOS

### Fermentación con medio óptimo de la cepa silvestre

Se reprodujeron los resultados de la fermentación de *Sp. pararoseus* tomando en cuenta las condiciones de fermentación que establecen Kawasaki *et al* (1992), en donde se pone a crecer el inóculo congelado de la levadura en el medio óptimo a 30°C a 100 rpm.

Se encontró que la etapa de adaptación dentro de la curva de crecimiento abarca alrededor de 8 horas y que el crecimiento máximo se alcanza a las 24 horas. La enzima PAL se encuentra asociada al crecimiento, encontrándose la actividad máxima a las 24 horas y siendo esta actividad de 26 U/g (Figura 1). Así mismo, se encuentra una disminución en el pH de la fermentación en la primera etapa, esto probablemente por la formación de ácidos provenientes de los carbohidratos que contiene el extracto de malta y de levadura. Posteriormente, se presenta un aumento en el pH que se puede explicar por la reacción de desaminación de la L-fenilalanina, generando amoníaco. Existe una coincidencia en el momento en el que aumenta el pH con el inicio de la actividad enzimática. En las etapas finales del crecimiento se manifiesta el color rosado de las células, esto causado por la síntesis de pigmentos carotenoides, característico de esta cepa en las etapas finales de crecimiento.

La enzima presenta gran inestabilidad a temperatura ambiente. Por esto se debe conservar en congelación y durante la manipulación de las células así como la permeabilización es necesario mantener condiciones de refrigeración.



· crecimiento + pH \* Act. Enzimática

**FIGURA 1. FERMENTACION DE LA CEPA SILVESTRE.**

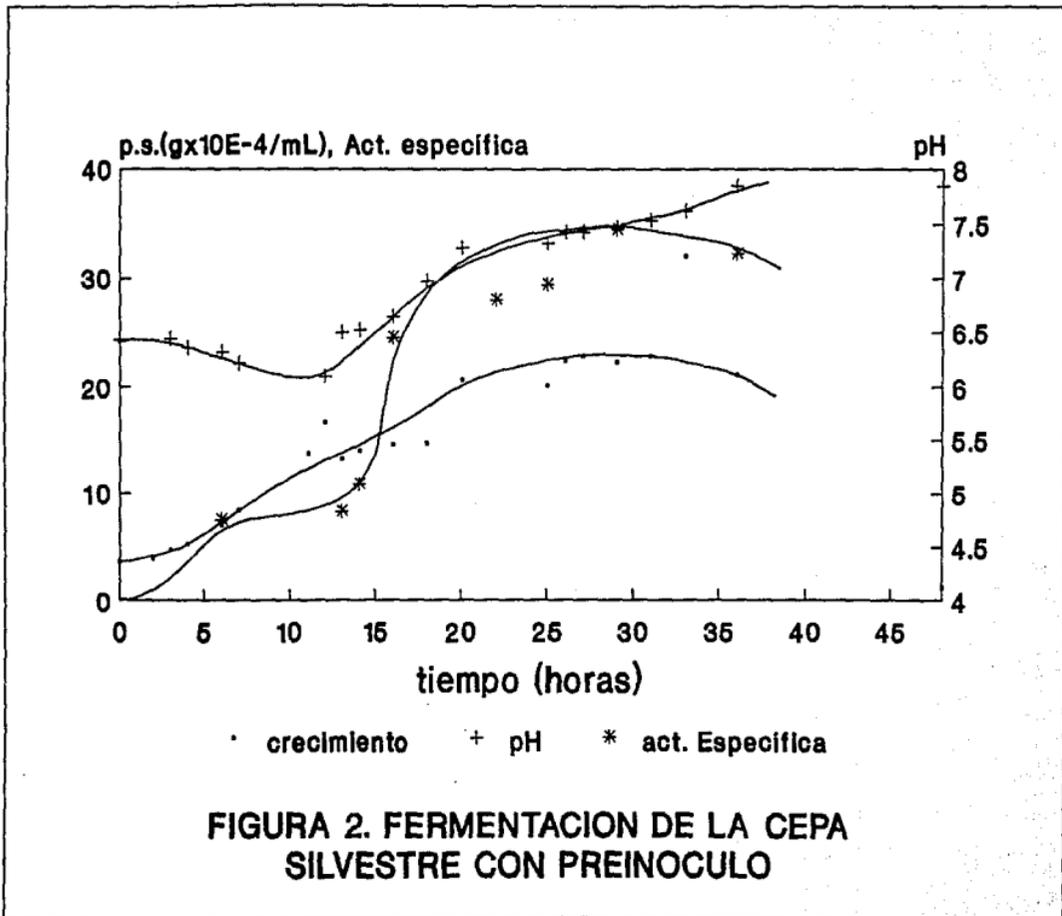
### **Optimización del inóculo para la fermentación**

Considerando que la fase de adaptación es muy larga, se trató de disminuirla a través de tener un pre-inóculo para crecer las células descongeladas durante 24 horas y usarlas como inóculo para los matraces de fermentación. Esto resultó exitoso ya que la fase de adaptación se redujo a 2 horas y en algunos casos es casi inexistente. Se puede obtener además, mayor cantidad de células, al presentarse mayor crecimiento. Esto nos lleva a pensar en el hecho de que la primera etapa permite readaptar y reproducir a las células.

Observando el efecto del pre-inóculo con respecto a la actividad enzimática, también se encuentra que esta se mantiene estable durante 4 horas, mientras que con el método de inoculación directa se tiene una hora (Figura 2).

### **Determinación de la temperatura óptima para la actividad de PAL**

A fin de conocer la temperatura óptima de actividad enzimática, se realizó un ensayo de actividad a diferentes temperaturas. Se encontró que el valor de la máxima actividad se presenta a 50°C, siendo 57.44 U/g. Esto concuerda con la temperatura de máxima actividad obtenida por otros autores con otras cepas, y coincide con lo reportado por Kawasaki et al en 1992. Este puede ser uno de los parámetros que nos lleven a pensar que la enzima conserva muchas de sus características cinéticas en todas las especies en las que está presente, teniendo diferencias significativas en los sustratos sobre los que actúa y la afinidad por éstos (tabla 4 en el capítulo de Generalidades).



**Ensayo de estabilidad con respecto al tiempo de almacenamiento en congelación.**

Se realizó un ensayo de estabilidad de la enzima con respecto a su almacenamiento en congelación, en donde se pudo observar que conforme va avanzando el tiempo, se va perdiendo la actividad enzimática (figura 3). Esto se puede deber a dos causas fundamentalmente:

1.- El ensayo se realiza con células permeabilizadas en donde se pueden encontrar proteasas que estén desnaturalizando a la enzima, provocando que pierda su actividad.

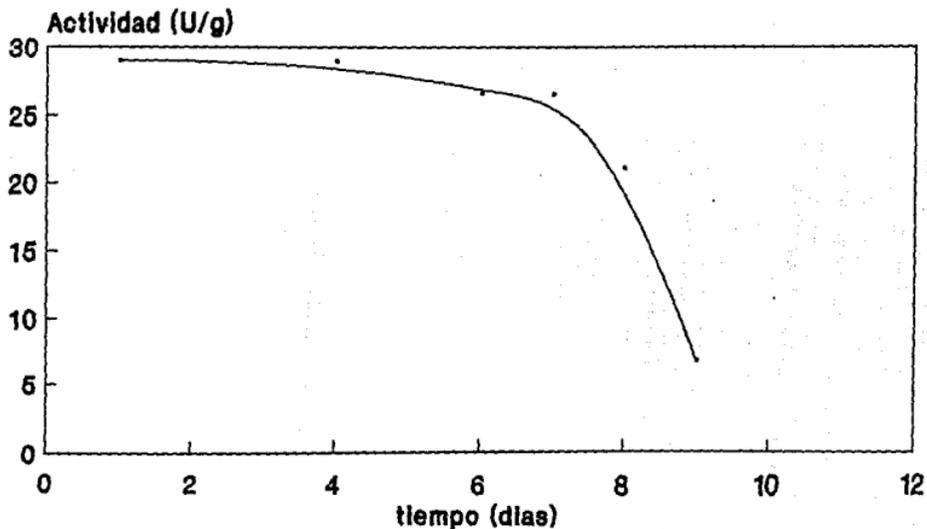
2.- Se está llevando a cabo una desnaturalización natural con respecto a la temperatura, aunado al daño por el descongelamiento.

**Método de selección para cepas mutantes sobreproductoras del la PAL.**

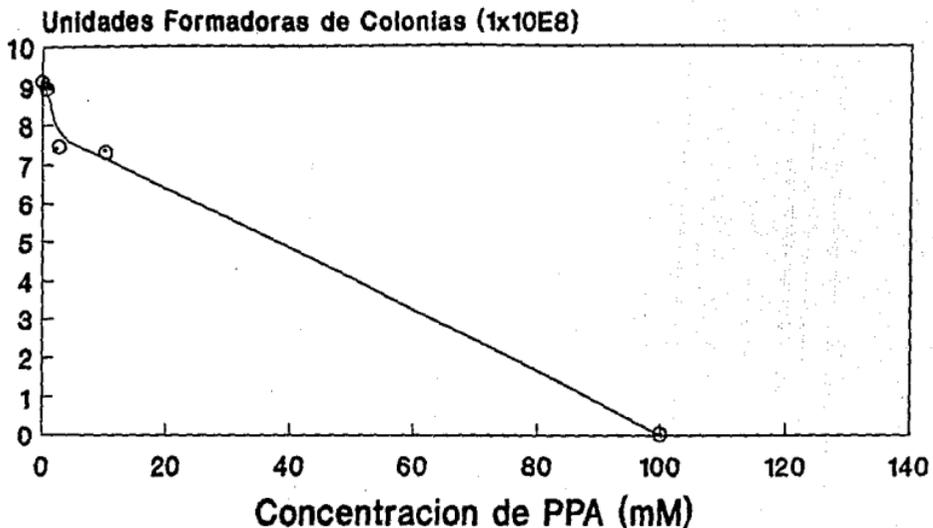
El método de selección de la cepa sobreproductora se basa en el crecimiento en presencia de un inhibidor no-competitivo de la enzima, el PPA. Se hicieron ensayos de inhibición en fase sólida y en fase líquida.

#### **Fase solida**

Se probó con diferentes concentraciones de PPA sobre el medio de mutación en fase sólida (ver materiales y métodos). Se encontró que para eliminar completamente el crecimiento se necesita tener 100 mM de PPA, lo que corresponde a tener una proporción aproximada de 2:1 (molar) con respecto a la L-fenilalanina. Orndorff *et al* (1988) encontraron que para *Rhodotorula graminis* las concentraciones ideales de inhibición de la cepa silvestre son de 100  $\mu$ M de PPA, es decir, 1000 veces menos concentrado que la encontrada para *Sp. pararoseus* (figura 4).



**FIGURA 3. ESTABILIDAD DE LA PAL SILVESTRE  
ALMACENADA A 0°C. ACTIVIDAD MEDIDA A  
30°C.**



**FIGURA 4. SELECCION DE LA CONCENTRACION DEL PPA PARA LA CEPA SILVESTRE. FASE SOLIDA**

Pensando que para las dos cepas el PPA es un inhibidor no-competitivo, se puede concluir que el PPA no es tan afin a la enzima de *Sp. pararoseus* como la PAL proveniente de *Rh. graminis*. No se ahondó en el tema debido a que el objetivo que se perseguía era tener un método de selección de mutantes sobreproductoras.

#### **Fase líquida**

A partir de la concentración de PPA adecuada para la fase sólida, se hicieron ensayos para establecer la inhibición en la fase líquida, comprobándose la eficacia de la concentración encontrada en la fase sólida. Esto se puede predecir debido a que la difusión de los componentes del medio es más eficaz en líquido que en sólido.

El pH de la fermentación se mantuvo oscilando en un rango muy pequeño, (entre 8.4-8.6) además de que no presentó crecimiento (figura 5).

**Fermentación líquida de la cepa silvestre con medio de mutación.**

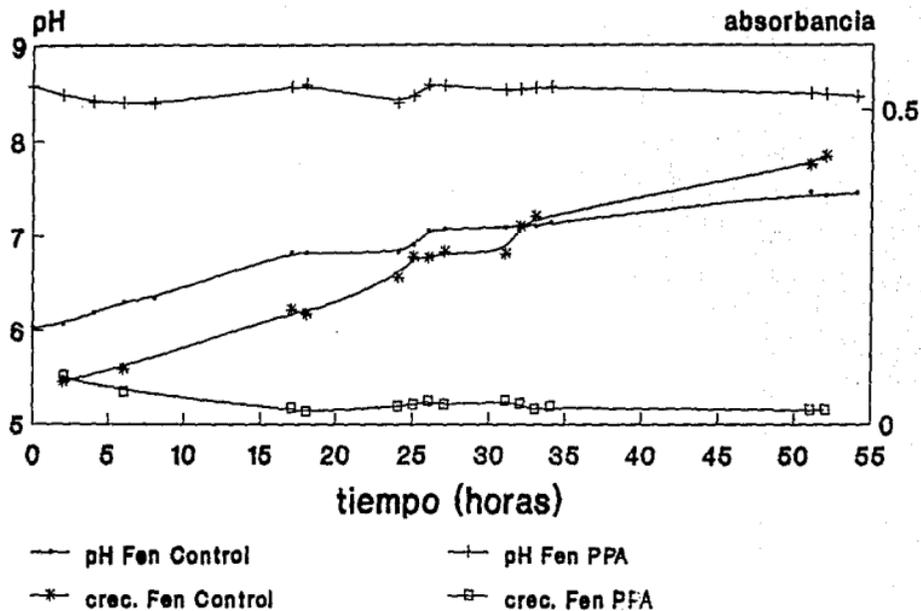
#### **Fuente de Nitrógeno**

En el proceso de obtención de la cepa desregulada, se comenzó a trabajar con un medio de mutación en donde la fuente de carbono no fuera la L-fenilalanina. Se decidió que se usara glucosa, pero se tenía que escoger una fuente de nitrógeno, ya que en el medio de mutación recomendado por Hernández (tesis 1990), la L-fenilalanina funciona como fuente de nitrógeno y de carbono. Se probó con dos sales inorgánicas, el  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , obteniéndose mejores resultados con el sulfato de amonio, ya que esta sal no funciona como amortiguador y permite el aumento de pH que favorece la actividad enzimática (figura 6).

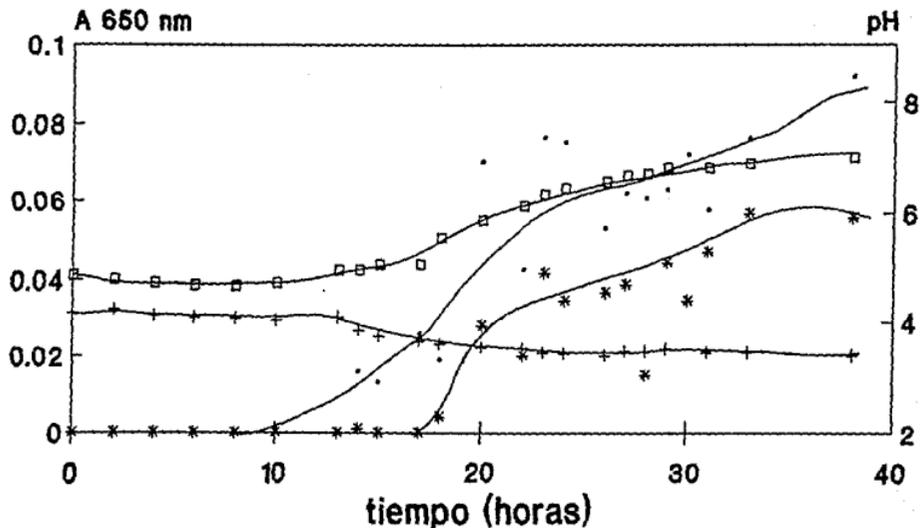
No Hay

Hoya

No. 42.



**FIGURA 5. CURVA DE CRECIMIENTO CON 100mM DE PPA. CEPA SILVESTRE.**



• crec. Glu    + pH Glu.    \* crec. fen.    □ pH fen.

**FIGURA 6. CURVA DE CRECIMIENTO DE LA  
CEPA SILVESTRE CON MEDIO DE MUTACION  
CONTENIENDO SULFATO DE AMONIO**

### Curva de sobrevivencia al agente mutagénico.

Se realizaron 3 ensayos para conocer la concentración y el tiempo necesarios para obtener de un 1-10% de sobrevivientes, de tal manera que el número de mutantes fuera adecuado para trabajar, así como para que se descarten las resistentes que no mutaron.

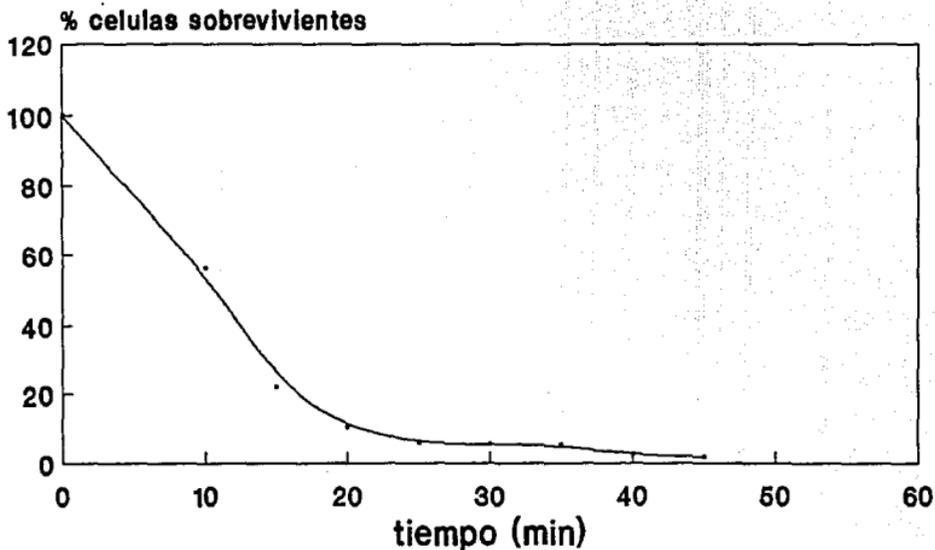
Se fijó una concentración para todos los ensayos, que fue de 100 µg/ml y se muestrearon diferentes tiempos de contacto. Los resultados fueron similares en los tres ensayos, encontrándose que en 25 minutos se tienen un promedio de sobrevivencia entre los límites que se establecieron (figura 8).

### Ensayo de mutación.

El ensayo de mutación asegura que las cepas aisladas a través de todo el proceso presentaban más actividad que la enzima PAL silvestre. El problema se presentó en la estabilidad a mediano y largo plazo, ya que al llevarse a cabo la mutación a través de un método químico, no se asegura que no hayan sucedido mutaciones adicionales a la de interés. Las cepas mutantes quedan muy dañadas y por lo tanto mueren o regresan a su estado original.

Se hizo una modificación al ensayo de mutación que se presentó originalmente por Hernández (tesis 1990) que consistió en hacer crecer el volumen total de mutación, es decir, las células mutadas y el agente mutagénico desactivado, en un matraz con medio de mutación adicionado con PPA.

Para seleccionar a las cepas mutantes se realizaron siembras progresivas cada 24 horas en medio en los que va disminuyendo la concentración de PPA pasando de 100 mM a 50 mM a 10 mM, para finalmente crecerla en medio de mutación. Esto se basa en el hecho de que las cepas mutantes de interés deben ser capaces de crecer con la máxima concentración de inhibidor. Ya crecido el microorganismo, la concentración va disminuyendo para empezar la readaptación a condiciones de crecimiento óptimas.



**FIGURA 8. CURVA DE SOBREVIVENCIA  
CEPA SILVESTRE CON 100µg/mL DE NTG**

Una vez comprobada la sobreproducción a través del ensayo, se sembró en cajas petri con medio óptimo y se aislaron colonias a las que se les midió la actividad enzimática una vez crecidas en MO líquido. Se comprobó que las colonias aisladas provenían de la misma cepa, al mostrar la misma actividad enzimática. Se conservaron de la misma manera que la cepa silvestre.

Se obtuvieron 3500 mutantes de 3 ensayos de mutación diferentes, sin embargo, prácticamente ninguna conservó la actividad enzimática al ser sometida al crecimiento en medio con PPA. Del tercer ensayo de mutación se aisló la cepa MRA1191 que fué la que finalmente se caracterizó.

#### **CARACTERIZACION DE LA CEPA MRA1191.**

La caracterización inicial que se llevó a cabo con esta cepa consistió en cuatro ensayos:

- 1.- Ensayo de estabilidad a través de las resiembras.**
- 2.- Caracterización de la fermentación para conocer el crecimiento y la actividad enzimática así como los cambios de pH.**
- 3.-Influencia de la Temperatura en la actividad enzimática.**
- 4.- Caracterización cinética.**

#### **1.- Ensayo de estabilidad a través de las resiembras.**

Se realizaron 8 resiembras en donde se cosechaba una parte de las células para realizar el ensayo de actividad, y se resembraban las restantes en medio nuevo. De esta manera se estudió la estabilidad de la cepa mutante.

Contrario a lo que se esperaba, la cepa presentó mayor actividad conforme se le iba resembrando, lo que lleva a pensar que sigue un proceso de adaptación.

Al ser aislada la cepa MRA1191 presentó 3 veces la actividad de la silvestre, y al ser resembrada, fue aumentando su actividad hasta tener 7 veces la actividad de la silvestre.

Este proceso de adaptación no se observa en la cepa silvestre y puede deberse al daño que sufrió la cepa al ser mutada.

## 2.- Caracterización de la fermentación para conocer el crecimiento, la actividad enzimática y los cambios de pH.

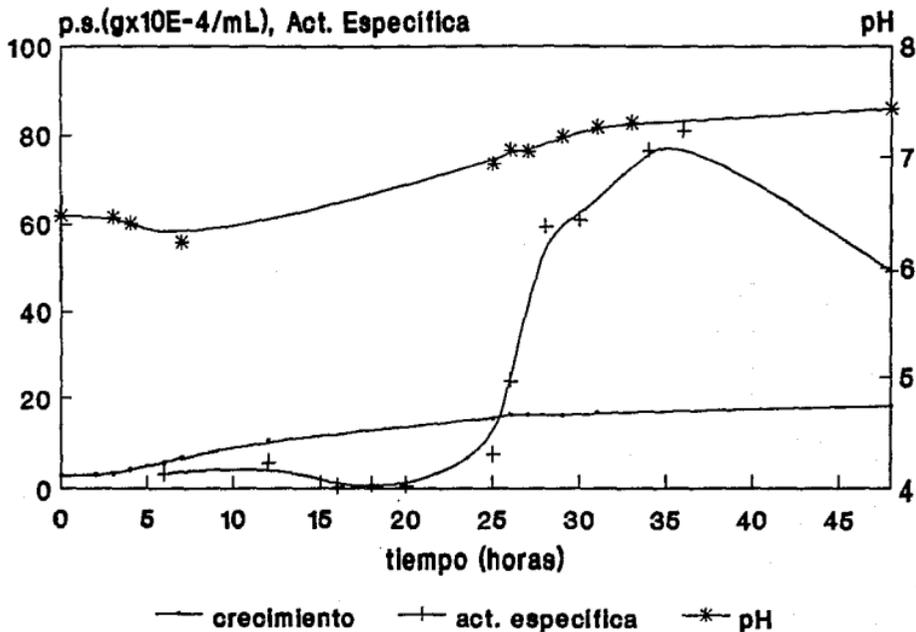
Manteniendo las mismas condiciones de aereación, temperatura y medio de cultivo óptimos de la cepa silvestre, se realizó una fermentación de 100 mL por duplicado. La cepa mutante presenta una fase de adaptación casi inexistente, así como un mayor tiempo para alcanzar el máximo crecimiento. La enzima está asociada al crecimiento, presentando su máxima actividad de 32 a 38 horas (figura 9). Fue importante encontrar que se tiene una meseta de actividad máxima lo que permite cosechar las células con un poco más de margen de tiempo. El pH disminuye en las primeras etapas de la fermentación para aumentar posteriormente y aumentar casi 2 unidades arriba del pH inicial.

La cepa mutante produjo 81.02 U/g en 36 horas de fermentación. En la figura 14 se presenta una comparación de la actividad específica y de la productividad de la cepa mutante MRA1191 y la cepa silvestre.

## 3.- Influencia de la Temperatura en la Actividad enzimática.

Se encontró que la actividad máxima de la cepa mutante se presenta a 60°C, disminuyendo la actividad significativamente a 70°C.

Esto nos puede llevar a pensar que la conformación de la enzima se estabilizó y mantiene el sitio activo en su posición en el espacio 10°C arriba de lo que la enzima de la cepa mutante puede hacer.



**FIGURA 9. FERMENTACION DE LA CEPA MUTANTE MRA1191.**

En la figura 10 se presenta una comparación de los perfiles de la actividad enzimática de la silvestre y de la mutante con respecto a la temperatura.

Se puede apreciar que es el comportamiento de la mutante es semejante al de la silvestre, siendo la cepa mutante mucho más estable a mayores temperaturas.

#### 4.- Caracterización Enzimática.

Se realizó un ensayo en el que se varió la concentración de sustrato con un misma cantidad de células permeabilizadas en suspensión tanto de la silvestre como de la mutante. Se midió la actividad de estos ensayos, y se encontró la ecuación de velocidad de la PAL según el modelo de Michaelis-Menten para cada cepa, presentados en la figura 11.

Para poder calcular el  $K_m$  y la  $v_{max}$  se realizó la gráfica del inverso de Michaelis-Menten, Lineweaver-Burk (figura 12). De esta gráfica se calculan los valores cinéticos, en los que encontramos  $v_{max}$  diferentes para cada cepa, pero mucha similitud en los valores de  $K_m$ . Se puede pensar que lo que varía en este ensayo es la cantidad de enzima, ya que se trabaja con células permeabilizadas. La afinidad de la enzima por el sustrato, en ambos casos es semejante por lo que esto nos puede llevar a conclusiones preliminares acerca de una verdadera sobreproducción de la enzima.

De acuerdo con los resultados encontrados por Monje (1992), se llevó a cabo una modificación al método de permeabilización de células durante este experimento (ver Mat y Mét.). Esta modificación consiste en efectuar el tercer lavado de células permeabilizadas con amortiguador Tris-HCl 0.01 M, pH=8.5, de tal manera que la enzima quede conservada en el pH en el que presenta la mayor actividad enzimática.

En la figura 10 se presenta una comparación de los perfiles de la actividad enzimática de la silvestre y de la mutante con respecto a la temperatura.

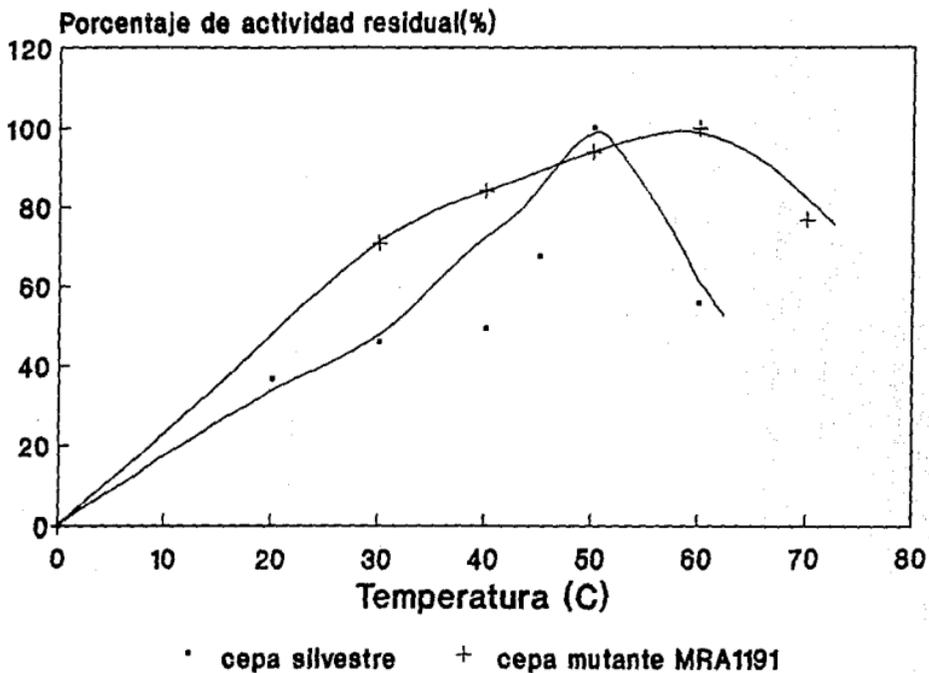
Se puede apreciar que es el comportamiento de la mutante es semejante al de la silvestre, siendo la cepa mutante mucho más estable a mayores temperaturas.

#### 4.- Caracterización Enzimática.

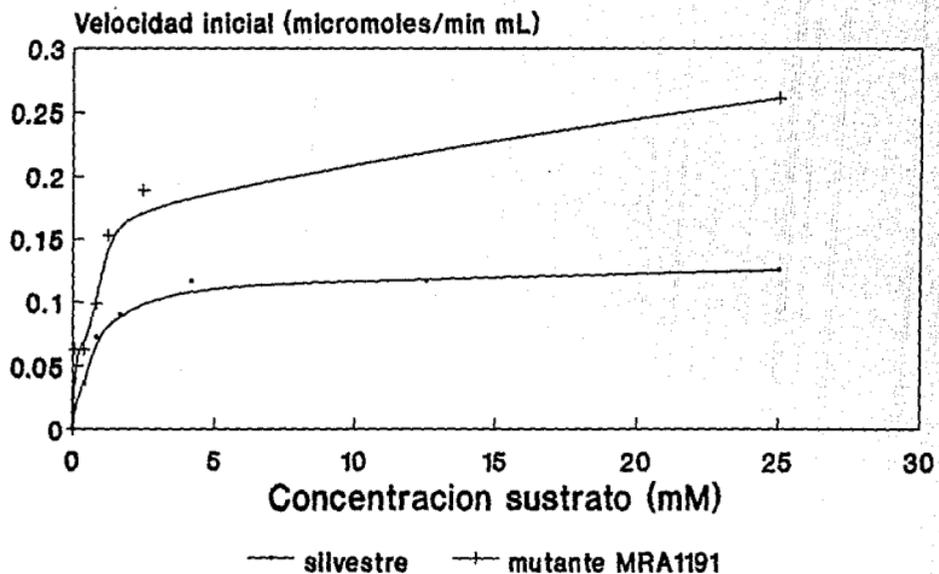
Se realizó un ensayo en el que se varió la concentración de sustrato con un misma cantidad de células permeabilizadas en suspensión tanto de la silvestre como de la mutante. Se midió la actividad de estos ensayos, y se encontró la ecuación de velocidad de la PAL según el modelo de Michaelis-Menten para cada cepa, presentados en la figura 11.

Para poder calcular el  $K_m$  y la  $v_{max}$  se realizó la gráfica del inverso de Michaelis-Menten, Lineweaver-Burk (figura 12). De esta gráfica se calculan los valores cinéticos, en los que encontramos  $v_{max}$  diferentes para cada cepa, pero mucha similitud en los valores de  $K_m$ . Se puede pensar que lo que varía en este ensayo es la cantidad de enzima, ya que se trabaja con células permeabilizadas. La afinidad de la enzima por el sustrato, en ambos casos es semejante por lo que esto nos puede llevar a conclusiones preliminares acerca de una verdadera sobreproducción de la enzima.

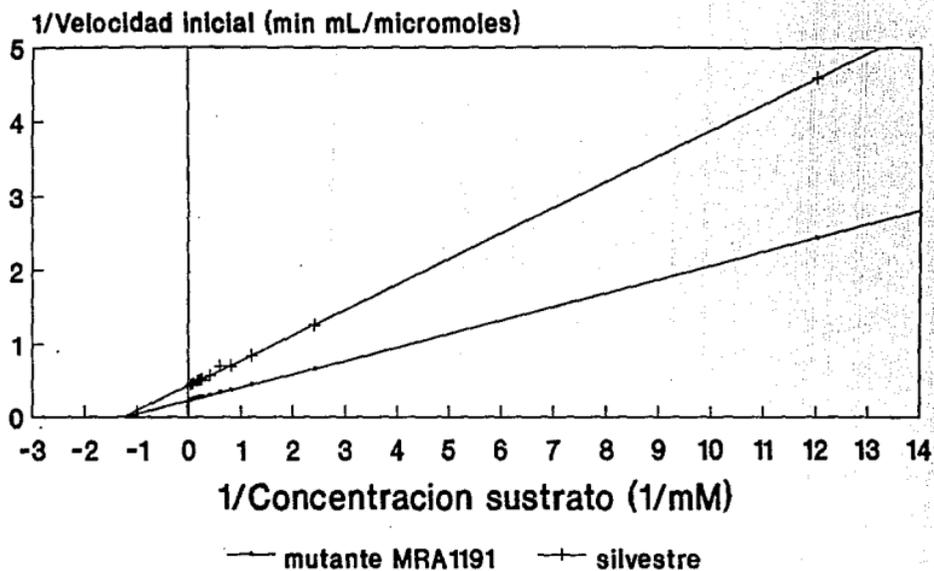
De acuerdo con los resultados encontrados por Monje (1992), se llevó a cabo una modificación al método de permeabilización de células durante este experimento (ver Mat y Mét.). Esta modificación consiste en efectuar el tercer lavado de células permeabilizadas con amortiguador Tris-HCl 0.01 M, pH=8.5, de tal manera que la enzima quede conservada en el pH en el que presenta la mayor actividad enzimática.



**FIGURA 10. ACTIVIDAD ENZIMATICA DE PAL**



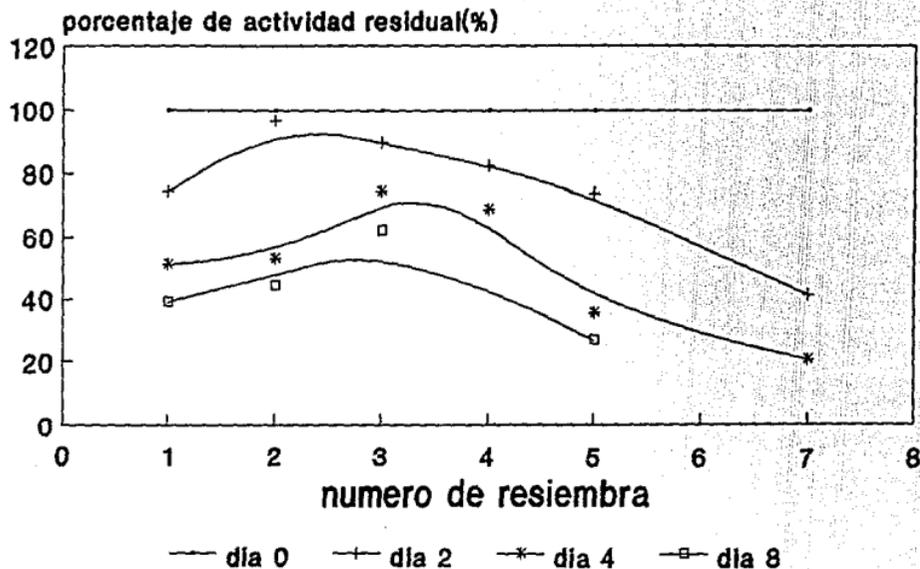
**FIGURA 11. ECUACION DE VELOCIDAD DE PAL**  
**T=30°C y pH=8.5**



**FIGURA 12. ECUACION DE LINEWEAVER BURK  
PARA FENILALANINA AMONIO LIASA  
T=30°C y pH=8.5**

Tomando en cuenta que después de este lavado se congelan las células, la conformación de la proteína se verá favorecida hacia la actividad enzimática de PAL debido al pH del entorno. Se ha podido comprobar el efecto positivo de esta modificación para la cepa silvestre y la mutante.

Al igual que la cepa silvestre, la cepa mutante va perdiendo su actividad con respecto al tiempo que se mantenga almacenada en congelación. En la figura 13 se aprecia la comparación de la actividad residual con respecto al tiempo de almacenamiento en congelación. Estos resultados surgieron del ensayo de estabilidad a través de las resiembras.



**FIGURA 13. ESTABILIDAD DE LA ENZIMA PAL MUTANTE MRA1191 ALMACENADA A 0°C CON RESPECTO AL TIEMPO. ACTIVIDAD A 30°C.**

	<b>CEPA SILVESTRE</b>	<b>CEPA MUTANTE MRA1191</b>	<b>%INCREMENTO</b>
<b>ACTIVIDAD ESPECIFICA U/g células</b>	29.43	81.02	275.29
<b>CONCENTRACION DE CELULAS g/L</b>	0.217	0.12	-55.29
<b>PRODUCTIVIDAD U/L hr</b>	5.216	21.0989	404.5

**FIGURA 14. COMPARACION DE LAS CEPAS**

## CONCLUSIONES

1.- Se desarrolló un método para aislar mutantes sobreproductoras de PAL que consiste en hacer crecer cepas mutantes de *Sporidiobolus pararoseus* en medio de mutación con 100 mM de PPA. Se trabajó en fase sólida y en fase líquida, obteniéndose resultados satisfactorios para las dos fases.

2.- Se aisló una mutante denominada MRA1191 que presenta una actividad de 81.02 U/g células.

3.- Se encontró que la cepa mutante MRA1191 reacciona a un proceso de adaptación incrementando su actividad.

4.- La enzima de la cepa mutante MRA1191 presenta una temperatura óptima de 60°C. De la caracterización cinética se encontró un  $K_m = 0.803 \mu M$ . Se corroboró la hipótesis de haber generado una cepa mutante sobreproductora ya que la  $v_{max}$  es mayor que la de la cepa silvestre, pero el  $K_m$  es el mismo. La mutación solo multiplicó en el material genético el gene de expresión de la PAL.

## RECOMENDACIONES

1.- Es recomendable optimizar las condiciones de fermentación de la cepa mutante MRA1191, (temperatura, pH, aereación y medio de cultivo), a fin de mejorar aún más la actividad enzimática. En este mismo sentido, será necesario continuar con el proceso de adaptación de la cepa mutante hasta que se establezca la actividad enzimática.

2.- Se requiere llevar a cabo un estudio mucho más profundo con respecto a la sobreproducción de la enzima, conociendo la cantidad de proteína que produce y comparándola con la cepa silvestre.

3.- La inmovilización de las células permeabilizadas puede ser recomendable pensando en el proyecto general, de tal manera que se pueda producir un catalizador biológico capaz de desaminar la fenilalanina de un hidrolizado proteico de caseinato de sodio. Esto se sumará al proceso de obtención del alimento bajo en fenilalanina.

4.- Se plantea la posibilidad de volver a mutar para buscar la cepa desregulada, es decir, la cepa que pueda crecer con una fuente de carbono diferente y que nos exprese la actividad de PAL. Esto se puede hacer sobre la cepa silvestre o inclusive sobre la mutante MRA1191.

## ANEXO

El cálculo de la actividad específica se hace de la siguiente manera:

Partiendo de la ecuación de Lambert-Beer:

$$A=lcC$$

donde A= absorbancia, l= longitud de la celda, c= coeficiente de absorptividad molar y C= Concentración del compuesto que se está detectando.

Si despejamos C;

$$C= A/lc$$

Del método para obtener la actividad citado anteriormente, se obtiene la pendiente de la curva, es decir,

$$m= \Delta \text{abst-cinamico} / \text{min}$$

Al multiplicar la pendiente por la ecuación para obtener la concentración, obtenemos:

$$m \times C= \text{moles t-cinamico/L min.}$$

se cambian las unidades de concentración a  $\mu\text{moles t-cinamico/ml}$ ,

$$(\mu\text{moles t-cinamico/mL min}) \times 1000= F_1$$

tomando en cuenta las diluciones hechas para medir la actividad  
tenemos que :

$$(F1) \times (3 \text{ mL reaccion} / 0.1 \text{ mL concentrado de células}) = F2$$

finalmente se toman en cuenta las últimas diluciones y se  
transforma los mL de células en gramos de peso seco de células:

$$(F2) \times (1 \text{ mL concentrado} / 10 \text{ ml medio}) = F3$$

$$(F3) \times (10 \text{ ml medio} / \text{g células peso seco}) = \text{Actividad esp.}$$

- 1.-Abell C.W., Hodgins D.S. and Stith W.J. An *in vivo* evaluation of the chemotherapeutic potency of Phenylalanine ammonia-lyase. *Cancer Research*, 1973, 33: 2529-2532.
  
- 2.-Abell C.W. and Shen R. Phenylketonuria: a new method for the simultaneous determination of plasma phenylalanine and tyrosine. *Science*, 1977, 197: 665-667.
  
- 3.-Abell C.W. and Shen R. Phenylalanine ammonia-lyase from the yeast *Rhodotorula glutinis*. Division of Biochemistry, Department of Human Biological Chemistry and Genetics. The University of Texas Medical Branch, Galveston Texas. 1-8.
  
- 4.-Ambrus C.M., Ambrus J.L., Horvarth Cs., Pedersen H., Sharma S., Kant E.M., Guthrie R. and Paul Th. Phenylalanine Depletion for the management of Phenylketonuria: Use of Enzyme Reactors with Immobilized Enzymes. *Science*, 1978, 201: 837-839.
  
- 5.- Ambrus C.M., Sharma S.D., Horváth Cs., Kaighatgi K., Anthone S., Ambrus J.L., Cooley C. and Mirand E.A. *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*. 1983, 224 (1): 598-602.
  
- 6.- Arai S., Maeda A., Matsumura M., Hirao N. and Watanabe M. Enlarged-scale production of a low-phenylalanine peptide substance as a foodstuff for patients with phenylketonuria. *Agricultural Biological Chemistry*, 1986, 50 (11): 2929-2931.
  
- 7.- Bourget L. and Chang Th.M.S. Phenylalanine ammonia-lyase immobilized in semipermeable microcapsules for enzyme replacement in phenylketonuria. *FEBS letters*, 1985, 180(1): 5-8.

- 8.- Bourget L. and Chang Th.M.S. Phenylalanine ammonia-lyase immobilized in microcapsules for the depletion of phenylalanine in plasma in phenylketonuric rat model. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1986, 883: 432-438.
- 9.- Camm E.L., and Towers G.H.N. Phenylalanine ammonia-lyase activity in *Sporobolomyces roseus*. *Phytochemistry*, 1969, 8: 1407-1413.
- 10.- Camm E.L. and Towers G.H.N. Phenylalanine ammonia-lyase *Phytochemistry*, 1973, 12: 961-973.
- 11.- Carlton B.C. and Brown B.J. Gene Mutation. 223-235.
- 12.- Cotton R.G.H. and Gibson F. Tyrosine and Phenylalanine Biosynthesis: The T and P Proteins (*Aerobacter aerogenes*); Chorismate mutase (*Pisum sativum*). *Methods in Enzymology*, Vol. XVII, Part A. 564-596.
- 13.- Creasy L.L. The increase in Phenylalanine ammonia-lyase activity in strawberry leaf disks and its correlation with flavonoid synthesis. *Phytochemistry*, 1968, 7: 441-446.
- 14.- Crueger W. and Crueger A. *Biotechnology: A textbook of Industrial Microbiology*. Sinauer Associates Inc. Science Tec. Eng. USA 1982. 15-20.
- 15.- Ems A.V., and Vining L.C. Partial purification and properties of L-phenylalanine ammonia-lyase from *Streptomyces verticillatus*. *Canadian Journal of Biochemistry*, 1970, 48: 613-622.
- 16.- Evans C.T., Conrad D., Hanna K., Peterson W., Choma C. and Misawa M. Novel stabilization of phenylalanine ammonia-lyase catalyst during bioconversion of trans-cinnamic acid to L-phenylalanine. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1987, 25: 399-405.

17.- Evans C.T., Hanna D., Conrad D., Peterson W. and Misawa M. Production of phenylalanine ammonia-lyase (PAL): isolation and evaluation of yeast strains suitable for commercial production of L-phenylalanine. Applied Microbiology and Biotechnology, 1987, 25: 406-414.

18.- Finkelman M.A. and Yang H.H.(Genex Co.) Method for the production of phenylalanine ammonia-lyase by fermentation. UNITED STATES PATENT. App. no. 547,139. Patent number: 4,584,273. Apr. 22, 1986.

19.- Fritz R.R., Hodgins D.S. and Abell C.W. Phenylalanine ammonia-lyase. Induction and purification from yeast and clearance in mammals. The Journal of Biological Chemistry, 1976, 251 (15): 4646-4650.

20.- Gilbert H.J. and Jack G.W. The effect of proteinases on phenylalanine ammonia-lyase from the yeast *Rhodotorula glutinis*. Biochemical Journal, 1981, 199: 715-723.

21.- Gilbert H.J. and Tully M. Synthesis and degradation of Phenylalanine ammonia-lyase of *Rhodosporidium toruloides*. Journal of Bacteriology, 1982, 150 (3): 498-505.

22.- Havir E.A. and Hanson K.R. L-Phenylalanine ammonia-lyase. Purification and molecular size of the enzyme from Potato tubers. Biochemistry, 1968, 7(5): 1896-1903.

23.- Hernández V.G. Producción de Fenilalanina amonio-liasa por *Sporidiobolus pararoseus*. TESIS (1990) Facultad de Química, UNAM:

24.- Hodgins D.S. Yeast Phenylalanine ammonia-lyase. Purification, properties and the identification of catalytically essential dehydroalanine. The Journal of Biological Chemistry, 1971, 246 (9): 2977-2985.

- 25.- Hopwood D.A. The isolation of mutants. Methods in Microbiology, Vol. 3A. Edited by J.R. Norris and D.W. Ribbons. 1970, Academic Press, London and New York. 368-377.
- 26.- Inoue Sh., Matsunaga Y., Iwane H., Sotomura M. and Nose T. Entrapment of Phenylalanine ammonia-lyase in silk fibroin for protection from proteolytic attack. Biochemical and Biophysical Communications, 1986, 141: 165-170.
- 27.- Kawasaki W.S., Hernández V.G., Iturbe Ch.F.A. and López-Munguía C.A. Phenylalanine ammonia lyase from *Sporidiobolus pararoseus* and *Rhodospiridium toruloides*: Application for phenylalanine and tyrosine deamination. The World Journal of Microbiology and Biotechnology, 1992. (en prensa).
- 28.- Koch R. and Wenz E. Phenylketonuria. Annual Revision of Nutrition, 1987, 7: 117-135.
- 29.- Koukol J. and Conn E.E. The metabolism of aromatic compounds in higher plants. The Journal of Biological Chemistry, 1961, 236 (10) 2692-2698.
- 30.- Lehninger A.L. Biochemistry. Worth Publishers, Nueva York. 1985.
- 31.- Maeda A., Abe K., Watanabe M. and Arai S. Peptic Hydrolysis of Bovine  $\beta$ -lactoglobulin to produce a low-phenylalanine peptide foodstuff for phenylketonuria. Agricultural and Biological Chemistry, 1987, 51 (6): 1501-1507.
- 32.- Marusich W.C., Jensen R.A. and Zamir L.O. Induction of L-Phenylalanine ammonia-lyase during utilization of Phenylalanine as a carbon or nitrogen source in *Rhodotorula glutinis*. Journal of Bacteriology, 1981, 146 (3): 1013-1019.
- 33.- Monje R. I. Tesis de maestría (1992) Comunicación personal.

34.- Neish A.C. Formation of m- and p- coumaric acids by enzymatic deamination of the corresponding isomers of tyrosine. *Phytochemistry*, 1961, 1: 1-24.

35.- Ogata K., Uchiyama K. and Yamada H. Metabolism of Aromatic amino acid in microorganisms. Part I. Formation of cinnamic acid from Phenylalanine. *Agricultural and Biological Chemistry*, 31(2): 200-206.

36.- O'Neal D. and Keller C.J. Partial purification and some properties of Phenylalanine ammonia-lyase of tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Phytochemistry*, 1970, 9: 1373-1383.

37.- Orndorff S.A., Costantino N., Stewart D and Durham D.R. Strain improvement of *Rhodotorula glutinis* for production of a novel L-phenylalanine ammonia-lyase. *Applied and Environmental Microbiology*, 1988, 54 (4): 996-1002.

38.- Parkhurst J.R. and Hodgins D.S. Phenylalanine and Tyrosine ammonia-lyase activity in *Sporobolomyces paroseus*. *Phytochemistry*, 1971, 10: 2997-3000.

39.- Parkhurst J.R. and Hodgins D.S. Yeast Phenylalanine ammonia-lyase. Properties of the enzyme from *Sporobolomyces paroseus* and its catalytic site. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1972, 152: 597-605.

40.- Rowlands R. T. Industrial Strain improvement: mutagenesis and random screening procedures. *Enzyme Microbiology Technology*, 1984, 6: 96-102.

41.- Shen R. and Abell C.W. Phenylketonuria: A new method for the Simultaneous determination of Plasma Phenylalanine and Tyrosine. *Science*, 1977, 197: 667-669.

42.- Sikora L.A. and Marzluf G.A. Regulation of L-phenylalanine ammonia-lyase by L-phenylalanine and nitrogen in *Neurospora crassa*. Journal of Bacteriology, 1982, 150 (3): 1287-1291.

43.- Snyderman S. E. Human amino acid nutrition. Genetics Factors in Nutrition, 1984, 269-278. Edited by Velázquez Antonio and Bourges Héctor.

44.- Subba Rao P.V., Moore K. and Towers G.H.N. Degradation of aromatic amino acid by Fungi. II. Purification and Properties of Phenylalanine ammonia-lyase from *Ustilago hordei*. Canadian Journal of Biochemistry, 1967, 45: 1863-1873.

45.- Velázquez R.R.E. Caracterización de un alimento bajo en fenilalanina. TESIS 1991, Facultad de Química, UNAM.

46.- Vollmer P.J., Schruben J.J., Montgomery J.P. and Yang H.H. (Genex Co.) Method for stabilizing the enzymatic activity of phenylalanine ammonia-lyase during L-phenylalanine production. UNITED STATES PATENT. App. No. 547,258. Patent number: 4,584,269. Apr. 22, 1986.

47.- Young M.R. and Neish A.C. Properties of the ammonia-lyases deaminating phenylalanine and related compounds in *Triticum aestivum* and *Pteridium aquilinum*. Phytochemistry, 1966, 5: 1121-1132.