



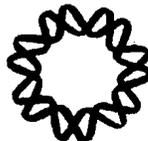
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL
Y

DE POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS
Y HUMANIDADES

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

03072 17
2eje.



"PURIFICACION, CARACTERIZACION E INMOVILIZACION
DE LA ENZIMA FENILALANINA AMONIO-LIASA
DE *Sporidiobolus pararoseus* NRRL Y-5484".

TESIS

Que para obtener el título de:

MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

Presenta:

Ignacio Monje Ramírez

Cuernavaca, Morelos

1994

TESIS CON
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.

El presente trabajo fué desarrollado en el Departamento de Bioingeniería del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Bajo la asesoría del Dr. AGUSTIN LOPEZ-MUNGUIA C.

La realización de los estudios de maestría y del presente trabajo recibieron el apoyo económico por parte del **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** mediante la beca crédito 8125, así como la beca de alimentación y hospedaje otorgada por el **Instituto de Biotecnología**, a quienes agradezco sinceramente.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer particularmente al **Dr. Agustín López-Munguía** director de esta tesis, por darme la oportunidad de participar en su grupo de trabajo. Así mismo por su dirección científica y por haber puesto a mi disposición los medios necesarios para la realización de esta tesis. Le agradezco su constante preocupación por mi formación académica y personal, así como la atención particular que me demostró durante mi estancia en el laboratorio. Quisiera hacer un reconocimiento a su calidad humana, sencillez y alegría de la cual siempre está rodeado elementos que sin duda alguna llevo como parte de mi formación.

Agradezco al **Dr. Miguel Lara Flores** quien aceptó llevar la carga de cotutor y a la vez juzgar mi trabajo. Por sus acertadas sugerencias, por haberme aconsejado en el curso de este trabajo así como por el material y equipo proporcionado le expreso mi sincero agradecimiento.

Quiero agradecer al **Dr. Octavio T. Ramírez Reivich** por aceptar formar parte del comité tutorial y juzgar este trabajo de tesis. Le estoy agradecido por toda la atención prestada en la corrección del trabajo escrito.

Quiero agradecer al jurado de tesis por aceptar juzgar este trabajo y contribuir a la elaboración del manuscrito:

Presidente: Dr. Miguel Lara Flores
Secretario: Dr. Agustín López-Munguía Canales
Vocal: Dr. Lourival Domingos Possani Postay
Suplente: Dra. Amelia Farrés González Saravia
Suplente: Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich

Quiero agradecer a todos los compañeros del laboratorio quienes me brindaron su amistad, compañía, apoyo y comprensión en todo momento. Mi más sincero cariño y agradecimiento a todos ellos.

Agradezco a todo el personal de trabajo del laboratorio de quienes recibí un gran apoyo y formación parte importante en desarrollo del trabajo experimental. Al técnico Fernando González por la ayuda brindada en este trabajo.

Agradezco sinceramente al Dr. Leopoldo Guereca, por la ayuda y asesoría brindada en el trabajo experimental.

A los integrantes de la Planta Piloto del Instituto de Biotecnología, Alfredo Martínez y Sr. Mario Caro por su colaboración para la realización de las fermentaciones; y a los integrantes de la Planta Piloto del Instituto de Investigaciones Biomédicas, en especial al Sr. Abel Blanca por haber puesto a mi disposición el equipo necesario para el procesamiento de los productos de fermentación. Mis más sinceros agradecimientos

Quiero agradecer a todos los integrantes de la casa de estudiantes por su amistad y apoyo brindado, y en especial a las siguientes personas con quienes he compartido una etapa más de mi vida.

Raunel Tinoco, Alfonso Gómez, Edmundo Castillo, Soledad Cordova, Maricarmen Quirazco, Fernando Martínez, Francisco Santana, Mariela Cuadras, Miguel y Marisela Corona, Alejandra Solache, Alejandra Vázquez, Renaud Condé, Alexei y Sandra Licea, Jorge y Lidia Olmos, Guillermo Perales, Susana Castro, Dolores Juárez, Filiberto Sánchez, Marina Ramírez, Enrique y Rosana Merino.

Muy especialmente a Violeta por todo su cariño, compañía y comprensión, así como por las atenciones recibidas.

Quiero agradecer infinitamente a toda mi familia quien ha sido la inspiración y el principal motivo de toda mi formación académica y personal. El esfuerzo conjunto de todos y cada uno de ellos ha hecho posible la culminación del presente trabajo, el cual dedico con todo cariño. Gracias por su cariño y confianza.

Dedico este trabajo fruto de sus esfuerzos a mis abuelos Eusebio e Irene Monje quienes siempre han estado a mi lado y a quienes agradezco con mucho cariño lo que han hecho por mí.

A mis padres Catarino y Dolores por sus consejos, confianza y apoyo incondicional agradezco y dedico como mucho cariño el fruto de su esfuerzo.

INDICE

	Página
RESUMEN	1
1. INTRODUCCION	3
2. OBJETIVOS	5
2.1. Objetivo general	5
2.2. Objetivos particulares	5
3. ANTECEDENTES	
3.1. Enzimas como biocatalizadores industriales	6
3.2. Limitaciones sobre el uso de enzimas en la industria	6
3.3. Estrategias para la obtención de enzimas estables	7
3.3.1. Aislamiento a partir de microorganismos termófilos	7
3.3.2. Obtención de enzimas estables por ingeniería genética	7
3.3.3. Estabilización de enzimas por modificación química	8
3.3.4. Estabilización de enzimas por inmovilización covalente	8
3.4. Fenilalanina amonio-liasas	9
3.4.1. Fuentes de la enzima	9
3.4.2. Fenilalanina amonio-liasas de levaduras	12
3.4.2.1. Cepa de trabajo: <i>Sporidiobolus pararoseus</i>	13
3.4.3. Cinética	14
3.4.3.1. Mecanismo de reacción	14
3.4.3.2. Modelos cinéticos	16
3.4.4. Aplicaciones	18
3.4.4.1. Usos comerciales	18
3.4.4.2. Perspectivas	18
3.4.5. Enzima inmovilizada	19

4. MATERIALES Y METODOS	
4.1. Microorganismo	20
4.2. Reactivos	20
4.3. Producción de la enzima	20
4.4. Crecimiento celular	20
4.5. Cuantificación de proteína	20
4.6. Medición de actividad enzimática	21
4.7. Purificación de la enzima	21
4.7.1 Extracción de la enzima	21
4.7.2. Recuperación de la enzima a partir de extractos celulares	21
4.7.2.1. Precipitación con sulfato de amonio	21
4.7.2.2. Precipitación ácida	22
4.7.3. Cromatografía de intercambio iónico	22
4.8. Electroforesis en gel de poliacrilamida	23
4.9. Inmovilización de la enzima parcialmente purificada por enlace covalente	23
3.9.1. Inmovilización en sílica porosa aminated	23
3.9.2. Inmovilización en perlas oxiranoacrilicas	25

RESULTADOS Y DISCUSION

5. Producción de la enzima	26
5.1.1 Efecto del oxígeno disuelto y pH, en la producción y estabilidad de la enzima	26
6. Purificación de la enzima	29
6.1. Extracción de la enzima, por molienda en molino de perlas	29
6.1.1. Tiempo de residencia	30
6.1.2. Efecto de la concentración de células	30
6.2. Recuperación de la enzima a partir del extracto celular	33
6.2.1. Precipitación con sulfato de amonio	34
6.2.2. Precipitación ácida	34
6.3. Purificación de la enzima por cromatografía de intercambio iónico	35
6.3.1. Cromatografía de intercambio iónico	35
6.3.2. Cromatografía de intercambio iónico, en presencia de glicerina	37
6.3.2.1. Estabilización parcial de PAL	37

6.3.2.2. Cromatografía de intercambio iónico: de PAL precipitada con sulfato de amonio	39
6.3.2.3. Cromatografía de intercambio iónico: de PAL obtenida por precipitación ácida	43
6.3.2.3. Análisis de la enzima parcialmente purificada por densitometría	45
6.4. Comparación relativa del proceso de purificación de la enzima de <i>S.pararoseus</i>	46
7. Caracterización cinética y fisicoquímica de la enzima parcialmente purificada	48
7.1. pH y temperatura óptimos de reacción	48
7.2. Parametros cinéticos	50
8. Inmovilización de PAL	52
8.1. Inmovilización por enlace covalente, en sílica porosa	52
8.2. Inmovilización por enlace covalente, en una resina oxirano acrílica	55
8.3. Estabilidad de la enzima inmovilizada	57
8.3.1. Estabilidad operacional	57
8.3.2. Estabilidad en almacenamiento	58
9. Catalizadores enzimáticos con actividad de fenilalanina amonio-liasa	59
9.1. Estudio comparativo de los catalizadores	59
9.2. Aplicaciones potenciales de la enzima inmovilizada	60
9.2.1. Producción de productos con bajo contenido de fenilalanina	60
9.2.2. Síntesis de fenilalanina a partir de ácido <i>trans</i> -cinámico y amonio	61
9.2.3. Cuantificación de fenilalanina y tirosina	61
10. CONCLUSIONES	62
11. BIBLIOGRAFIA	64

RESUMEN

En este trabajo se desarrolló un proceso para la purificación parcial de la enzima fenilalanina amonio-liasa de *Sporidiobolus pararoseus*, la caracterización cinética y fisicoquímica de la enzima soluble, así como la inmovilización de la misma.

La primera etapa del trabajo consistió en llevar a cabo la producción de la enzima por fermentación sumergida estableciendo el tiempo de fermentación y las condiciones preliminares de cultivo a nivel laboratorio y planta piloto. Las mejores condiciones de producción fueron: 600 rpm, 0.30 VVM de aireación y pH inicial de 5.5 sin control durante la fermentación. Bajo estas condiciones se alcanzó a las 16 horas de fermentación una actividad específica de 27.8 U/g de célula con una productividad de 7.23 U/l h.

En la segunda etapa se desarrolló un proceso de purificación que involucra tres operaciones: extracción de la enzima por ruptura en molino de perlas; recuperación de la enzima a partir del extracto celular por precipitación ácida; y purificación de la enzima por cromatografía de intercambio iónico. En la primera operación se estableció el tiempo de residencia y la concentración óptima para la liberación de la enzima, lográndose obtener al final de esta operación el 90% de la actividad intracelular. Para la recuperación de la enzima se evaluaron experimentalmente dos metodologías: la precipitación con sulfato de amonio y la precipitación ácida, siendo ésta última la que presentó los mejores rendimientos y la que permitió obtener una solución de enzima con el menor grado de impurezas incluyendo pigmentos carotenoides. Finalmente, se utilizó la cromatografía de intercambio iónico, como técnica de alta resolución en el proceso de purificación de la enzima fenilalanina amonio-liasa. Este proceso de purificación, permitió obtener una enzima con un grado de pureza de alrededor del 90%, parcialmente estable y susceptible de ser manipulada para incrementar su estabilidad.

La enzima parcialmente purificada fue caracterizada desde el punto de vista fisicoquímico y cinético. En el primer caso se determinó la temperatura y el pH óptimos de reacción de la enzima, y se encontró que la mayor actividad se presenta cuando se trabaja a una temperatura de 65 °C y a un valor de pH entre 8.5 y 9.0 respectivamente. Los estudios cinéticos de la enzima demostraron que esta presenta una cinética de Michaelis-Menten. Las constantes cinéticas V_{max} y K_m calculadas a partir de los datos de velocidad inicial de acuerdo a la ecuación de Lineaweaver-Burk son: 1.32 $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ de proteína y 0.3142 mM a 30 °C, y 2.266 $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ de proteína y 0.485 mM a 40 °C, respectivamente.

La tercera y última parte del trabajo experimental consistió en modificar químicamente a la fenilalanina amonio-liasa parcialmente purificada con la finalidad de incrementar la estabilidad de la enzima. Lo anterior se llevó a cabo mediante la unión covalente a dos soportes enzimáticos: Spherosil y EUPERGIT C. En ambos soportes fue posible llevar a cabo la expresión de la enzima fenilalanina amonio-liasa. En el caso de la enzima inmovilizada en Spherosil, se obtuvo un catalizador con una actividad específica de 2.3 U/g de soporte, con una vida media en operación de 5.4 horas y una estabilidad en almacenamiento de alrededor de 470 horas. Con el EUPERGIT C se obtuvo un catalizador de actividad específica de 5.8 U/g soporte, una vida media operacional de 6.25 horas y en almacenamiento de 50 horas. Comparando los dos soportes enzimáticos el Spherosil le confiere una mayor estabilidad a la enzima fenilalanina amonio-liasa.

INTRODUCCION

La utilización de enzimas en la industria alimentaria presenta muchas ventajas: son específicas, funcionan en condiciones moderadas de temperatura y pH, la velocidad de reacción puede ser controlada y son fácilmente inactivadas después de haber realizado el cambio deseado. Las limitaciones para utilizarlas suelen ser su alto costo y su baja disponibilidad a nivel industrial. Actualmente existe la tendencia a emplearlas en forma continua, mediante el uso de diferentes sistemas de inmovilización, haciendo que muchas reacciones se hayan vuelto atractivas para la industria.

La fenilalanina amonio-liasa o PAL (EC 4.3.1.5) es una enzima que desamina a la fenilalanina para producir ácido *trans*-cinámico y amonio. También puede llevar a cabo la reacción inversa, siendo ambas de interés industrial. La PAL es otro ejemplo de enzimas que catalizan reacciones diferentes a la hidrólisis que encuentra aplicación industrial: la producción de L-fenilalanina a partir de ácido *trans*-cinámico y amonio ha sido la principal aplicación desde el punto de vista económico.

El interés en obtener L-fenilalanina se ha incrementado debido a sus diversas aplicaciones: como precursor en la síntesis de aspartamo, un sustituto no calórico de azúcar cuya naturaleza protéica le permite tener ciertas ventajas sobre los edulcorantes calóricos como la sacarosa; como constituyente de mezcla de aminoácidos para la alimentación parenteral de pacientes; y como alimento de dieta para el tratamiento de la fenilacetonuria.

La síntesis de L-fenilalanina utilizando la enzima fenilalanina amonio-liasa es una ruta para su producción industrial que hasta 1985 era utilizada por la compañía Genex de los E.U.A [1]. El proceso está basado en el uso de células de *Rhodotorula rubra* inmovilizadas para producir al aminoácido, a través de un proceso que parte del ácido *trans*-cinámico y amonio en presencia de la enzima fenilalanina amonio-liasa, logrando obtener hasta 60 g/l del aminoácido.

Se han planteado otras aplicaciones para la enzima fenilalanina amonio-liasa. En el sector terapéutico se ha propuesto como una alternativa en el tratamiento de fenilacetonuria, tanto oral [2,3,4,5] como extracorporal [6,7] y en el tratamiento de neoplasmas [8]. En el área de diagnóstico, aunque no existen desarrollos específicos, puede ser utilizada para la cuantificación de fenilalanina y tirosina en un método rápido y sensible [9].

A pesar de este potencial, existen algunas limitaciones para su aplicación asociadas en su mayoría a problemas relacionados con la disponibilidad, velocidad de conversión y estabilidad de la PAL. Existe un gran número de estudios realizados con el fin de solucionar estas desventajas, siendo el principal cuello de botella, la baja estabilidad de la enzima y el poco éxito alcanzado en su estabilización [10,11,12].

El interés de trabajo con la enzima fenilalanina amonio-liasa, está dirigido esencialmente hacia el desarrollo de un catalizador para incorporarlo a un proceso de producción de alimentos de dieta para fenilcetonúricos [13]. Las principales etapas de este proceso son: hidrólisis enzimática extensa de la proteína base del alimento (caseína); separación de la fenilalanina del hidrolizado por adsorción física con carbón activado y la formulación del producto terminado. El uso de la fenilalanina amonio-liasa en dicho proceso se plantea como una alternativa para mejorar la etapa de eliminación de fenilalanina, haciéndola más específica a través de un método enzimático.

En trabajos previos se llevó a cabo un estudio sobre la fenilalanina amonio-liasa producida por las levaduras *Sporidiobolus pararoseus* y *Rhodospidium toruloides*, con el objeto de producir un catalizador de células completas con actividad de PAL [14]. Se encontró que *S. pararoseus* resultaba muy adecuado para el diseño del biocatalizador considerando los niveles de actividad, estabilidad y afinidad por el sustrato. Sin embargo, para la aplicación en hidrolizados, de acuerdo con cálculos preliminares que consideran los niveles de actividad disponibles, es necesario contar con un catalizador de mayor actividad específica, al menos dos o tres veces más alta que la cepa silvestre. Por esta razón se requiere de una cepa mutante con una mayor actividad intracelular. De otra forma, se requiere de la purificación e inmovilización de la enzima.

El presente trabajo tiene como objetivo principal contribuir en el área de la "Tecnología Enzimática", con el desarrollo de un catalizador de PAL de *S. pararoseus* de gran potencial en diversos procesos biotecnológicos. Para este fin se lleva a cabo la purificación, caracterización e inmovilización de la enzima fenilalanina amonio-liasa

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Purificar e inmovilizar la enzima fenilalanina amonio-liasa de *S. pararoseus*, con la finalidad de disponer de un catalizador de alta estabilidad y alta actividad específica.

2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Producir la enzima fenilalanina amonio-liasa por fermentación sumergida de la levadura *S. pararoseus*.
- Desarrollar un proceso para la purificación parcial de la enzima.
- Caracterizar cinética y fisicoquímicamente la enzima parcialmente purificada
- Modificar la enzima mediante su inmovilización por enlace covalente a dos soportes enzimáticos
- Evaluar los catalizadores obtenidos en términos de: actividad específica y estabilidad de la enzima inmovilizada.
- Evaluar las perspectivas de aplicación de los biocatalizadores.

3. ANTECEDENTES

3.1. Enzimas como biocatalizadores industriales

Las enzimas son proteínas que se comportan como catalizadores; es decir, aceleran la velocidad con la que las reacciones se llevan a cabo sin alterar el equilibrio. Son responsables de las transformaciones metabólicas en los seres vivos.

En la actualidad existen más de 2000 enzimas perfectamente caracterizadas y registradas, se conoce la secuencia de aminoácidos de decenas de ellas y se sabe que en una bacteria como *E. coli* existen más de 300 proteínas; la mayor parte son enzimas responsables de su funcionamiento integral, todas ellas separables analíticamente y conocidas desde el punto de vista químico, fisicoquímico y cinético. Un dato impactante es que de las 2000 enzimas registradas sólo 60 son producidas comercialmente [15].

Las enzimas purificadas o incluidas en células son utilizadas en la manufactura de productos tales como quesos, detergentes, antibióticos, diagnósticos clínicos, etc. Hoy en día, las ventas anuales de enzimas para la aplicación en las industrias de alimentos, detergentes, química especializada y de diagnóstico son aproximadamente de 600 millones de dólares [16]. El mercado de enzimas en México se estima en 17 millones de dólares anuales. Las importaciones totales de productos enzimáticos fueron de 3.816, 2.412 y 3.313 millones de dólares en 1985, 1986 y 1987, respectivamente, de acuerdo con datos de la Secretaría de Comercio y Fomento Industrial [15].

Los principales proveedores de enzimas comerciales, incluyen compañías tales como Solvay Enzymes (Elkhart, IN), Gist-Brocades (Delft, Netherlands), Novo Nordisk (Bagsvaerd, Denmark), Finnsugar Starch Enzymes, Inc. (Espoo, Finland), Miles Kali-Chemie (Hannover, Germany), Biocatalysts (Pontypridd, Mid-Glamorgan, U.K) y Nagase (Tokyo, Japón) [16].

3.2. Limitaciones sobre el uso de enzimas en la industria

Las enzimas son utilizadas ampliamente en el procesamiento de alimentos, debido a sus propiedades de alta especificidad y a su capacidad para catalizar reacciones bajo condiciones suaves de temperatura y pH. En un proceso catalizado por enzimas, el costo de la enzima usualmente es un elemento clave en el costo del proceso. En efecto, el costo de la enzima es el principal obstáculo que ha limitado la expansión de la Tecnología Enzimática Industrial.

El costo de la enzima puede ser reducido: (a) incrementando los rendimientos de las cepas microbianas, mediante su mejoramiento genético o la optimización de las condiciones de fermentación, (b) desarrollando sistemas costo-efectivos para la recuperación y reuso de enzimas, incluyendo procesos con enzimas inmovilizadas y (c) llevando a cabo conversiones enzimáticas a altas temperaturas utilizando enzimas termoestables [17].

3.3. Estrategias para la obtención de enzimas estables

La capacidad para obtener enzimas estables es de crucial importancia para su aplicación como biocatalizadores. Las proteínas catalíticas, al igual que todas las proteínas, son solo parcialmente estables como resultado de un delicado balance de las interacciones de estabilización y desestabilización [18]. La comprensión de los mecanismos responsables de la estabilización y desestabilización de enzimas, especialmente a temperaturas elevadas, es de especial importancia desde el punto de vista científico y comercial [19]. A continuación se describen algunas estrategias que han permitido incrementar las aplicaciones de enzimas en la industria, incrementando su estabilidad.

3.3.1. Aislamiento de enzimas a partir de microorganismos termófilos

El interés de las enzimas termoestables, radica en que la mayoría de los procesos enzimáticos industriales son llevados a cabo bajo condiciones no fisiológicas, tales como altas temperaturas, altas presiones, valores de pH extremos, etc. En este sentido, una de las estrategias para obtener catalizadores para estos procesos es el aislamiento de enzimas a partir de microorganismos que naturalmente existen en un medio ambiente extremo, como es el caso de los microorganismos termófilos. Sólo las bacterias pueden crecer a temperaturas superiores a los 65 °C y en general las enzimas aisladas de estos microorganismos son estables a la temperatura óptima de crecimiento, aún cuando hayan sido purificadas. Dentro de las enzimas que han sido aisladas de microorganismos termófilos, podemos mencionar a la Taq-DNA polimerasa de *Thermus aquaticus*, de uso en sistemas de PCR, la L-asparaginasa, β -galactosidasa, α -glucosidasa y α -amilasa, por citar solo algunos ejemplos [15].

3.3.2. Obtención de enzimas estables por ingeniería genética

Otra estrategia biotecnológica es el uso de la ingeniería genética para el mejoramiento de la producción y estabilidad de enzimas de uso industrial. La ingeniería genética permite la

sobreproducción de enzimas, incrementando su disponibilidad y disminuyendo su costo. Sin duda, es una de las herramientas más poderosas hoy en día. Entre otros logros, ha hecho posible la producción de enzimas heterólogas; es decir, mediante la manipulación de la información genética, es posible la expresión de una proteína en un sistema diferente al que normalmente la produce. Una de las primeras aplicaciones que llegan a la industria, es el caso de la quimosina de ternera, cuyo gen ha sido clonado en *E. coli*, *Kluyveromyces marcianus* var. *lactis* y *Sacharomyces cerevisiae* (levadura de panificación). La quimosina es un claro ejemplo de como la ingeniería genética puede influir en el desarrollo de nuevos catalizadores, más económicos: por ejemplo, el costo del producto enzimático Kimax de Pfizer's, es aproximadamente 50% menor que el de la quimosina de ternero. Actualmente, otras enzimas recombinantes tales como la glucoamilasa, glucosa isomerasa, pululansa y varias proteasas se encuentran en desarrollo [16].

3.3.3. Estabilización de enzimas por modificación química

La modificación química selectiva de proteínas ha sido utilizada en algunos casos para estudiar y/o incrementar la estabilidad térmica de ciertas enzimas. Estos estudios han demostrado que la modificación química puede dar como resultado la estabilización, desestabilización, o bien no tener ningún efecto. La estabilización de las enzimas mediante esta estrategia, se puede llevar a cabo mediante la modificación de aminoácidos claves localizados en la superficie de la proteína. Uno de los mecanismos de estabilización radica en modificaciones tendientes a eliminar las repulsiones electrostáticas desfavorables que facilitan el desplegamiento (desnaturalización) de la conformación catalíticamente activa. Alternativamente, otro mecanismo consiste en incrementar las interacciones hidrofóbicas en la estructura globular. El entrecruzamiento de proteínas con agentes bi(poly)-funcionales, también ha sido ampliamente utilizado para la estabilización de proteínas. [20].

3.3.4. Estabilización de enzimas por inmovilización covalente

La inmovilización de enzimas por enlace covalente también puede ser clasificada como una modificación química. Los desarrollos en la aplicación de enzimas industriales en muchos casos involucran el uso de reactores continuos, lo que requiere de la inmovilización de la enzima. Dos parámetros claves a considerar en la factibilidad técnica de un proceso enzimático, son la eficiencia y la estabilidad de la enzima utilizada. La inmovilización frecuentemente da como resultado un incremento de la resistencia a varios factores desnaturalizantes: cambios de pH y temperaturas extremas, altas fuerzas iónicas, reactivos desnaturalizantes, proteasas, etc. [21].

Existe un gran número de biocatalizadores industriales consistentes en enzimas inmovilizadas en soportes sólidos. El principal biocatalizador a base de enzima inmovilizada hoy en día es la glucosa isomerasa, el cual ocupa el primer lugar en ventas mundiales con aproximadamente 40 millones de dólares en 1990. La glucosa isomerasa inmovilizada, es producida por diferentes empresas, tales como Finnsugar, Solvay, Novo Nordisk y Gist-Brocades. Otras enzimas inmovilizadas, tales como penicilinoacilasa, fumarasa, beta galactosidasa y aminocilasa abarcan gran parte del mercado restante de las enzimas inmovilizadas para alimentos y química especializada. [16].

3.4. Fenilalanina amonio-liasa

3.4.1. Fuentes de la enzima

La enzima fenilalanina amonio-liasa (EC 4.3.1.5) pertenece al grupo de las liasas, que rompen enlaces de tipo C-C, C-O, C-N y otros enlaces por eliminación, dejando dobles enlaces; además, tienen la capacidad de adicionar grupos a estos dobles enlaces. Las amonio-liasas en particular, proveen un método de desaminación de aminoácidos, produciendo ácidos insaturados. Es un grupo de enzimas altamente específicas, que pueden adicionar amonio en vez de agua a ácidos insaturados. [22].

La enzima fenilalanina amonio-liasa se encuentra ampliamente distribuida en los seres vivos ya que se encuentra en vegetales, levaduras pigmentadas (rojas) y en algunos hongos. Hasta la fecha no ha sido encontrada en forma natural en sistemas bacterianos tales como *E. coli* y *Streptococcus*, ni tampoco en células de mamíferos; sin embargo ha sido posible expresar en *E. coli* el gen de levadura que codifica a la fenilalanina amonio-liasa [23].

En células vegetales la enzima cataliza la primera reacción de la biosíntesis de faseolina a partir de fenilalanina, en respuesta a la infección por hongos patogénicos o bacterias. Es también una enzima regulatoria de la biosíntesis de isoflavonoides y otros fenilpropanoides incluyendo ligninas, flavonoides y conjugados del ácido hidroxicinámico, tales como ácidos clorogénicos y ciertos alcaloides.

Su principal función en microorganismos es la degradación de fenilalanina como una función catalítica. Las enzimas de origen microbiano en su mayoría catalizan la desaminación de L-fenilalanina y L-tirosina, para producir ácido *trans*- cinámico y ácido *p*- cumárico, respectivamente (Figura 1). [24].

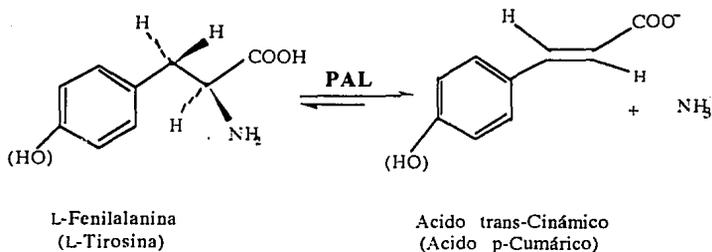


FIGURA 1. Reacción que cataliza la fenilalanina amonio-liasa.

La fenilalanina amonio-liasa de origen microbiano no presenta actividad catalítica sobre otros aminoácidos comunes, excepto L-fenilalanina y L-tirosina, así como algunos análogos estructurales (D-fenilalanina, DL-3-hidroxifenilalanina) [25,26,27]. Por otro lado, la enzima de fuentes vegetales es específica sobre la fenilalanina [22,24]. Una característica importante de esta enzima es que tiene la capacidad de catalizar la misma reacción en ambos sentidos: la reacción de desaminación de fenilalanina y la de síntesis a partir de ácido *trans*-cinámico y amonio, siendo ambas de interés industrial.

En la tabla 1 se resumen las principales propiedades de la fenilalanina amonio-liasa de diversas fuentes [14]. Su peso molecular se encuentra entre 275 000 y 330 000 Daltones y esta conformada por cuatro subunidades, de las cuales dos están involucradas en la catálisis. En el caso las enzimas de *Rhodotorula glutinis*, de papa y de maíz dos de las subunidades son aparentemente idénticas, mientras que la enzima de trigo y *Rhizoctonia solani* está conformada por dos pares de subunidades (α y β) de diferente peso molecular [28]. Con respecto al sitio activo, la enzima presenta dehidroalanina que se combina covalentemente con el grupo α -amino del sustrato durante la reacción catalítica [25,27].

La temperatura óptima de reacción de la fenilalanina amonio-liasa en la mayoría de los casos se encuentra entre los 20 °C y 30 °C, sin embargo las enzimas de *Rhodotorula rubra*, *Rhizoctonia solani* y trigo presentan valores que resultan interesantes (37 °C, 45 °C y 50 °C) para su aplicación industrial. El manejo de altas temperaturas no solo incrementa la velocidad de reacción, sino que permite manejar una concentración mayor de sustrato en una reacción, además de que evita los problemas de contaminación.

La constante cinética K_m reportada para la enzima fenilalanina amonio-*liasa* es diferente en la mayoría de los casos, lo anterior puede atribuirse a la fuente de la enzima y a las condiciones tanto de temperatura como de pH

TABLA 1
Propiedades principales de la
fenilalanina amonio-*liasa* de diferentes fuentes

Fuente	pH óptimo de reacción	Temperatura óptima de reacción (°C)	Peso molecular (Da)	K_m (mM)	Referencia
Tubérculos de papa	8.7	30	330 000	0.38 - 0.26 ^a	31
<i>Zea mays</i> (maíz)	---	30	306 000	270	31
<i>Tricum Aestivum</i> (trigo)	---	50-54	----	----	46
<i>Rhizoctonia solani</i>	8.8	45	330 000	0.18-5.0 ^b	28
<i>Neurospora crassa</i>	8.5	-	-	5.0 ^c	32
<i>Streptomyces verticillatus</i>	9.1	25	226 000	0.16	47
<i>Rhodotorula glutinis</i>	10	30	-	4.2 ^{b,c}	10
	8.5	30	275 000	0.25	25
			-	0.06-0.39 ^a	33
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	9	20	-	2.1	26
	-	-	-	0.6	24
<i>Rhodospiridium texensis</i>	9.5	20	-	15	26
<i>Rhodotorula rubra</i>	9.5	37	-	0.38 ^d	29
<i>Sporobolomyces pararoseus</i>	8.5	30	275 000	0.31	48
<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	8.8	40	-	0.53	14

a) No sigue la cinética de Michaelis-Menten

b) Cataliza la reacción inversa

c) Presenta inhibición por exceso de sustrato

d) Valor aparente

3.4.2. Fenilalanina amonio-liasa de levaduras

La principal fuente de obtención de fenilalanina amonio-liasa ha sido de fuentes microbianas y en especial de levaduras. Las enzimas de fuentes microbianas en general desplazan a las enzimas de origen vegetal ya que se pueden producir a gran escala en un tiempo y espacios relativamente reducidos. Las enzimas de los géneros *Rhodotorula*, *Rhodospiridium* y *Sporobolomices* ha sido la más estudiada, en particular en aspectos relacionados con su producción y aplicación.

Evans *et al.* [29], publicaron un estudio relacionado con el aislamiento y la evaluación de 21 cepas productoras de fenilalanina amonio-liasa. La capacidad de utilizar L-fenilalanina y *trans*-cinámico como sustratos, el nivel de producción celular y la actividad específica, fueron los criterios de selección. Dicho estudio se realizó con la finalidad de disponer de cepas que pudieran ser utilizadas en la producción comercial de L-fenilalanina. En la tabla 3, se presenta un resumen de las cepas que presentaron la mayor actividad enzimática.

TABLA 2
Levaduras productoras de fenilalanina amonio-liasa, con actividad catalítica sobre L-fenilalanina y t-cinámico. Evans, *et al.* [29]

Aislado	Identificación taxonómica	Actividad Específica (U/g célula)	
		L-fenilalanina	ácido <i>trans</i> -cinámico (sustratos)
SPA1	<i>Rhodotorula rubra</i>	37.16	3.8
SPA2	<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	29.56	3.08
SPA3	<i>Rhodotorula glutinis</i>	30.1	3.15
SPA6	<i>Rhodotorula minuta</i>	41.81	2.72
SPA8	<i>Rhodospiridium torulooides</i>	32.36	2.33
SPA10	<i>Rhodotorula rubra</i>	52.91	4.16
SPA13	<i>Rhodotorula informo-miniatum</i>	29.43	2.2
SPA20	<i>Rhodotorula glutinis</i>	47.16	3.85

U = una unidad enzimática, es la cantidad de fenilalanina o ácido *trans*-cinámico (μ moles) formado por minuto a 30 °C.

El aislado SPA 10, identificado taxonómicamente como *Rhodotorula rubra*, es la cepa que presentó los mejores resultados en este estudio, habiendo sido objeto de varias publicaciones relacionadas con su aplicación en la producción de L-fenilalanina. Es posible afirmar que los géneros de levaduras enlistados en la tabla anterior, aunque no precisamente las mismas cepas, corresponden a las más frecuentemente reportadas en la literatura como fuentes principales de la enzima.

Un estudio reciente sobre el aislamiento de cepas con actividad de fenilalanina amonio-liasa, es el realizado por Kupletskaya y Dol'nikova [30]; en esta publicación se describe el aislamiento de levaduras pigmentadas y hongos miceliales productores de la enzima. Un total de 700 cepas de colección y aislados de levaduras rojas fueron ensayados. El criterio de selección fué la actividad de fenilalanina amonio-liasa, determinada por la conversión de fenilalanina a ácido *trans*-cinámico. Una concentración de biomasa de 0.2-0.8 mg/ml de levadura y de 1.0-5.0 mg/ml de micelio base seca previamente cultivados, se colocan en una solución amortiguadora 0.2 M de Tris-HCl (pH 8.8-8.9) con 0.02 DL-fenilalanina. La formación de ácido *trans*-cinámico durante la reacción se sigue por el incremento en la absorbancia a una densidad óptica de 278 nm. La actividad específica de fenilalanina amonio-liasa se expresa como miligramos de ácido *trans*-cinámico formado por hora por miligramo de biomasa. La presencia de la enzima fué confirmada en 417 levaduras pigmentadas y 112 hongos miceliales de colección. Es importante mencionar que no existe una relación directa entre la producción del pigmento y la presencia de la enzima fenilalanina amonio-liasa en las cepas que presentan una coloración característica, ya que en muchas de ellas no se detecta la actividad de la enzima. Las cepas que presentaron actividad de fenilalanina amonio-liasa fueron sometidas a un estudio más con la finalidad de determinar su capacidad para producir fenilalanina a partir de ácido *trans*-cinámico y amonio. La formación de dicho aminoácido se realizó con una mezcla de reacción que contiene 2.2 % de ácido *trans*-cinámico y 6.5 M de amonio, a un pH de 10. Se encontró que la mayor cantidad de fenilalanina es sintetizada por *Rhodotorula aurantiaca* KM-1 (levaduras pigmentada de colección) produce 18 mg/ml de fenilalanina. Entre los hongos miceliales, el productor más eficiente fué *Clamidosprium cladosporoides* 1699 (14 mg/ml). De los microorganismos aislados el que mejores resultados presentó fue *Rhodotorula glutinis* 9/1, capaz de producir 13 mg/ml de fenilalanina.

3.4.2.1 Cepa de trabajo: *Sporidiobolus pararoseus* NRRL Y-548

Dentro de las diversas fuentes microbianas para la producción de fenilalanina amonio-liasa, se seleccionó a la levadura *S. pararoseus* NRRL Y-548 por ser una cepa poco estudiada como fuente de la enzima y presentar la mayor actividad en una selección inicial de cepas disponibles. En efecto en estudios anteriores al presente trabajo de investigación, Kawasaki *et al* [14] caracterizaron el crecimiento y la producción de fenilalanina amonio-liasa de dicha cepa y de *Rhodospiridium toruloides* NRRL Y-1091 y encontraron que la máxima actividad se presenta en la última etapa de la fase logarítmica de crecimiento; optimizaron un medio de cultivo para la inducción de la enzima; determinaron las propiedades cinéticas y

físicoquímicas de la enzima intracelular en células completas; y propusieron un modelo cinético para describir la reacción de desaminación de fenilalanina presente en hidrolizados de proteína.

3.4.3. Cinética

El estudio del mecanismo de reacción de la fenilalanina amonio-lyasa, así como la determinación de los parámetros cinéticos de la enzima de diversas fuentes ha sido previamente reportado. El conocimiento del mecanismo en los procesos enzimáticos es de suma importancia, ya que proporciona una mayor comprensión de la reacción y permite un diseño adecuado del sistema.

3.4.3.1. Mecanismo de reacción

Havir y Hanson [31] propusieron un mecanismo de reacción para la enzima de tubérculos de papa. En la Figura 2 se respresenta esquemáticamente el mecanismo de reacción postulado. Se sugiere que un grupo carbonilo está involucrado en el proceso catalítico. Por otra parte se tienen evidencias para soportar la hipótesis de la existencia de un intermediario enzima-amonio. El primer paso de este mecanismo es la ruptura del enlace N-C, lo que es facilitado a través de la formación de un intermediario carbonil-amino, para dar origen a un segundo intermediario carbonil-amonio que posteriormente es hidrolizado. Parkhurst and Hodgins [27], también sugieren la formación del intermediario enzima-amonio en la reacción de desaminación de la fenilalanina por las enzimas de *Rhodotorula glutinis* (ATCC 15385) y *Sporobolomyces pararoseus* (ATCC 11386).

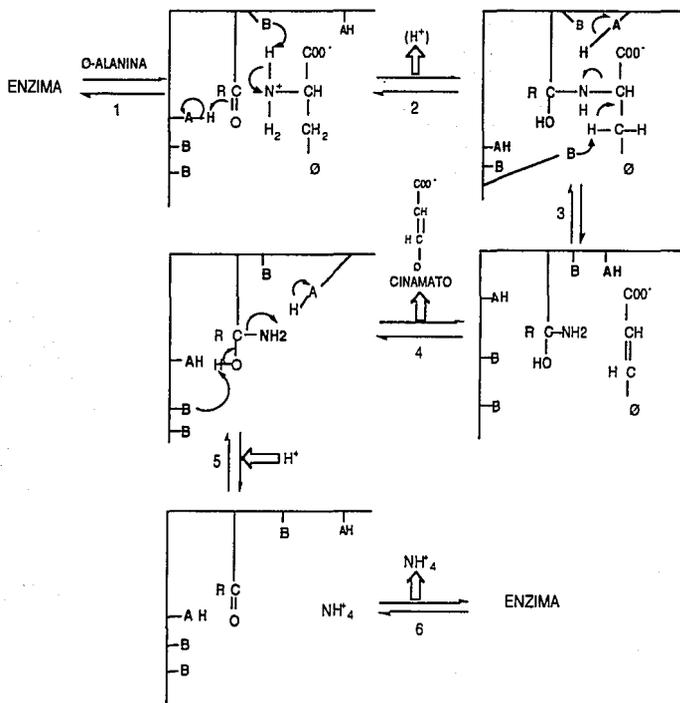


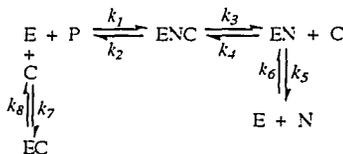
FIGURA 2. Mecanismo de reacción postulado para la enzima producida de tuberculos de papa. Los estados de ionización que se muestran son los obtenidos a pH 8.7 (óptimo de la enzima). Se asume que los productos de ionización son muy rápidos y por lo tanto la ganancia y pérdida de protones (H^+) por los grupos básicos (B) y ácidos (A) en la reacción no se muestran como pasos separados.

3.4.3.2. Modelos cinéticos

De acuerdo con lo reportado en la literatura la fenilalanina amonio-liasa presenta comportamientos cinéticos diferentes en función de la fuente, desde la cinética clásica de Michaelis-Menten [14, 24], inhibición competitiva por producto [25], inhibición por exceso de sustrato [10,32] y desviaciones más profundas del modelo de Michaelis-Menten [28,31, 33].

Kawasaki et al [14], estudiaron el efecto que tiene la concentración de sustrato en la velocidad inicial de la enzima contenida en células completas de *Sporidiobolus pararoseus* y *Rhodospordium toruloides* y encontraron que ambas siguen el modelo cinético de Michaelis-Menten.

Hodgins [25], encontró que durante la reacción de desaminación de L-fenilalanina por la enzima de *Rhodotorula glutinis*, el cinamato producto de la desaminación, se comporta como un inhibidor estrictamente competitivo. El mecanismo propuesto para esta reacción involucra un intermediario enzima-amonio:



Donde:

E = enzima
 P = fenilalanina
 N = amonio
 C = cinamato

k_j, g = constantes de reacción individuales

La presencia de centros electrofílicos en el sitio activo de la enzima de levaduras y de papa, sugiere la participación de éstos en la formación del intermediario enzima-amonio. La fenilalanina amonio-liasa es inactivada completamente por reactivos que se sabe reaccionan con grupos carbonilos los cuales están presentes en el sitio activo de la enzima. Si embargo, la enzima es protegida completamente del cianuro, boranhidruro y del bisulfito de sodio en presencia de análogos de la fenilalanina (DL-2-hidroxifenilalanina o ácido L-β-fenilacético). Lo anterior apoya la hipótesis de la formación del intermediario enzima-amonio.

Sikora y Marzluf [32], encontraron que la enzima de *Neurospora crassa* presenta inhibición por exceso de sustrato, ya que concentraciones mayores a 2 mM de fenilalanina dan como resultado una inhibición de la fenilalanina amonio-liasa durante el ensayo de actividad. Yamada *et al.* [10], también reportan una inhibición por exceso de sustrato para la enzima de *Rhodotorula glutinis*, cuando se utiliza ácido *trans*- cinámico en la producción de fenilalanina. El efecto de inhibición se presenta cuando se emplean con niveles de *trans*- cinámico mayores a 60 mM.

Otro modelo es el propuesto por Kalghatgi y S. Rao [28] para la enzima de *Rhizoctonia solani*. Estudios de velocidad inicial con la enzima de este microorganismo mostraron desviaciones significativas de la cinética de Michaelis-Menten. El valor de K_m aparente aumenta de 0.18 mM a 5 mM cuando se incrementa la concentración de sustrato y durante este proceso la V_{max} se incrementa de 2 a 2.5 veces. La obtención de una gráfica bifásica de doble recíproco (concava hacia abajo), un coeficiente de Hill menor a 1 y un valor de R_s de 81 son fuertes indicaciones de una cooperatividad negativa. Estudios de saturación de sustrato revelaron la presencia de interacciones homotrópicas, fenómeno que es característico de un enzima alostérico. En estos casos la unión de cada molécula disminuye la afinidad intrínseca de los sitios activos vacantes de la enzima. Aunado a lo anterior también se presentó el fenómeno de activación de la enzima a altas concentraciones de sustrato. Algunas observaciones similares se encontraron con la fenilalanina amonio-liasa de papa [33]. Wieder *et al.* [32] reporta un comportamiento cinético muy similar para la enzima de *Rhodotorula glutinis* una desviación del modelo cinético de Michaelis-Menten con cambios en los valores de K_m aparente y V_{max} aparente por el incremento de la concentración de fenilalanina.

A pesar de que existe una amplia información referente a las propiedades cinéticas de la enzima, el planteamiento de modelos cinéticos que describan el comportamiento de la reacción en los procesos en los que esta pueda participar son escasos en la literatura.

3.4.4. Aplicaciones

3.4.4.1. Usos comerciales

Las principales aplicaciones en procesos comerciales de la fenilalanina amonio-liasa, son básicamente dos: producción de fenilalanina a partir de ácido *trans*- cinámico y amonio y en diversos aspectos relacionados con la fenilcetonuria.

La producción de L-fenilalanina a partir de ácido *trans*- cinámico y amonio sin duda alguna es la principal aplicación comercial. Hasta 1985, la compañía Genex producía el aminoácido mediante un proceso basado en el uso de células de *Rhodotorula rubra* inmovilizadas en vermiculita [1]. Sin embargo hoy en día, la fermentación con cepas recombinantes es el proceso normalmente utilizado.

Una segunda aplicación, es en el tratamiento de hidrolizados ácidos o enzimáticos de proteínas, para la remoción de fenilalanina. Existe poca información publicada al respecto, sin embargo por lo menos existen tres patentes reportadas sobre el uso de esta enzima en estos procesos [34].

3.4.4.2. Perspectivas

La aplicación de la enzima en el tratamiento de fenilcetonuria, y la cuantificación de fenilalanina y tirosina, son dos alternativas más para el uso de la fenilalanina amonio-liasa. En el primer caso, existe un considerable número de publicaciones con respecto a las perspectivas de uso que podría tener la enzima en esta área. Por dar algunos ejemplos, Ambrus *et al.* [6,7], propusieron el uso de reactores enzimáticos con fenilalanina amonio-liasa de *Rhodotorula glutinis* inmovilizada para el tratamiento extracorporal de la fenilcetonuria. Utilizando un modelo animal, estos autores encontraron que mediante dicho tratamiento es posible reducir los niveles de fenilalanina, sin tener efectos adversos de tipo hematológico, inmunológico o fisiológico durante dos horas de tratamiento. Por su parte Inoue *et al.* [4], proponen el tratamiento oral con la enzima inmovilizada en un sistema constituido a base de materiales naturales. Es un hecho que la fenilalanina amonio-liasa podría jugar un papel importante en la terapia enzimática de la fenilcetonuria.

Otra de las aplicaciones poco exploradas de la enzima es en el área de diagnóstico. La propiedad que tiene la fenilalanina amonio-liasa de algunos microorganismo de desaminar fenilalanina y tirosina puede ser aprovechada para la cuantificación simultánea o en forma

separada de ambos aminoácidos: un caso particular podría ser en el diagnóstico de fenilcetonuria. Ron-sen y Creed [9], propusieron un método espectrofotométrico basado en la conversión de fenilalanina y tirosina a ácido *trans*- cinámico y ácido *p*- cumárico respectivamente. El método resulta ser bastante sensible, ya que permite detectar hasta concentraciones $1\mu\text{M}$ de los aminoácidos, y es reproducible y comparable con los resultados obtenidos en un analizador de aminoácidos.

3.4.5. Enzima inmovilizada

La principal limitante para el uso de esta enzima como catalizador es su baja estabilidad. Se han propuesto diferentes alternativas para resolver estos problemas. Evans *et al.* [11,12] optimizaron las condiciones de reacción utilizando células completas de *Rhodotorula rubra* con actividad de fenilalanina amonio-liasa, empleando agentes estabilizantes durante el proceso de conversión del ácido *trans*- cinámico a L-fenilalanina. Destacan el sorbitol, alginato, glutaraldehído, polietilenglicol y glicerol por su efecto positivo sobre la estabilidad de la enzima. En el sector clínico en el tratamiento oral de fenilcetonuria, su uso está limitado por la susceptibilidad a proteasas intestinales (principalmente quimotripsina y tripsina). Gilbert y Tully [35] utilizaron células de levaduras permeabilizadas con actividad de fenilalanina amonio-liasa para la protección de la enzima contra el ataque proteolítico. Sin embargo, los niveles de actividad en la células deben de ser incrementados para el tratamiento *in vivo*. En el mismo sentido Inoue *et al.* [4] desarrollaron un sistema mediante el atrapamiento de la enzima purificada en fibras de seda para la protección del ataque proteolítico, con la finalidad de disponer de un derivado para la terapia oral. Finalmente, Bourget y Thomas [5] estudiaron la posibilidad de utilizar la fenilalanina amonio-liasa inmovilizada en microcápsulas, en el tratamiento de la fenilcetonuria. Dicho sistema de inmovilización permite mantener la enzima dentro de células artificiales que la protegen contra cambios en los niveles de pH gastrointestinal y enzimas proteolíticas. Otra alternativa al uso en terapia son los reactores de fibra hueca como sistema de inmovilización de la enzima, donde la sangre del paciente es recirculada con la finalidad de disminuir los niveles de fenilalanina [6,7].

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. Microorganismo

Se utilizó la cepa de *Sporidiobolus pararoseus* NRRL-Y 5484, obtenida del Departamento de Agricultura de los E.U.A en forma liofilizada. La cepa fué conservada a 4 °C en medio sólido con extracto de levadura. Se realizaron resiembras cada dos meses para su preservación.

4.2. Reactivos

Los reactivos se adquirieron de las compañías indicadas entre parentesis: L-fenilalanina (SIGMA CHEMICAL CO.) y grado industrial (ENZIMOLOGA); Trizma Base, DEAE-Sephacel y Albúmina sérica de bovino (SIGMA CHEMICAL CO.); Sulfato de amonio, Acido acético, Glicerina (J.T BAKER); Extracto de levadura y Extracto de Malta (DFCO).

4.3. Producción de la enzima

Las fermentaciones a nivel laboratorio, se llevaron a cabo en un fermentador *Setric Genie Industriel Mod. 7F (Tolouse, Francia)* con un volumen de trabajo de 1.5 l. Las condiciones de fermentación fueron de pH inicial 5.5 sin control durante la fermentación, 30 °C, 300 rpm y una velocidad de aireación de 0.3 vvm. A nivel planta piloto, se utilizó un *Microfer Fermentor, New Brunswick Scientific CO., INC. EDISON, N.S (USA)* con un volumen de trabajo de 10 l., con agitación de 400 rpm y aireación de 0.5 vvm. Para la producción de la enzima se utilizó un medio optimizado por Kawasaki *et al.* [8] el cual contiene extracto de malta 1.4% (p/v), extracto de levadura 0.35% (p/v) y L-fenilalanina 0.8% (p/v).

4.4. Crecimiento celular

Para la determinación del crecimiento celular se determinó la absorbancia a 650 nm y se relacionó con el peso seco a través de una curva patrón, cuya ecuación es la siguiente:

$$\text{biomasa base seca (mg/ml)} = [(\text{Absorbancia}_{650 \text{ nm}} + 0.0178)] / 465.127$$

4.5. Cuantificación de proteína

La proteína soluble fué cuantificada utilizando el método descrito por Bradford [36], usando albúmina sérica de bovino como estandar.

4.6. Medición de actividad enzimática

La actividad de la enzima fenilalanina amonio-liasa en células completas así como la actividad de la enzima soluble, se determinó siguiendo el incremento de la absorbancia a 290 nm en un espectrofotómetro BECKMAN DU 650 (USA) durante 10 minutos. Una cantidad de células o de enzima soluble se adicionó a una solución amortiguadora 0.1 M de Tris-HCl pH 8.5 con fenilalanina 5 mM. La formación de ácido *trans*-cinámico producto de la reacción fué seguida a 290 nm, utilizando 9,000 como coeficiente de extinción molar para los cálculos de la concentración de este producto. En el caso de la medición de actividad en células, se efectuó previamente una permeabilización mediante una modificación del método descrito por Gilbert y Tully [35]. Una unidad de actividad de la enzima se define como la cantidad de enzima que produce 1 μ mol de producto en un minuto, a 30 °C.

4.7. Purificación de la enzima

Las células con actividad de PAL obtenidas de la fermentación de *S. pararoseus* fueron cosechadas por centrifugación y lavadas con una solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M pH 7.4, con NaCl 0.85% (*p/v*). Finalmente el paquete celular se resuspendió en una solución amortiguadora de Tris-HCl 0.1 M, pH 8.5 para obtener una concentración final de 12% (peso seco). La suspensión obtenida fué almacenada a 4 °C hasta su uso.

4.7.1. Extracción de la enzima

La extracción de la enzima a partir de células de *S. pararoseus* se llevó a cabo mediante la trituración de células en un BEAD-BEATER a nivel laboratorio, y a nivel piloto en un DYNO-MILL. Para este proceso se utilizaron perlas de vidrio con un diámetro promedio de 0.5 mm, la concentración de biomasa fué del 12% (base seca) y una temperatura entre 10 °C y 18 °C del efluente. En el caso del DYNO-MILL, se empleó un flujo equivalente a un tiempo de residencia de 20 minutos. Después de este tratamiento, el homogenado (producto de la ruptura celular) fué centrifugado a 13 000 rpm por 25 minutos y el residuo fué descartado.

4.7.2. Recuperación de la enzima a partir del extracto celular

4.7.2.1. Precipitación con sulfato de amonio

Se adicionó sulfato de amonio en forma sólida a una solución de enzima del extracto celular, para obtener un 30% de saturación de la solución. La adición de la sal se llevó a cabo en forma lenta y con agitación constantemente durante un período de dos horas. Al final de

este período la mezcla fué centrifugada (13 000-15 000 rpm, por 25 minutos). El sobrenadante fué llevado al 60% de saturación con sulfato de amonio; la mezcla se centrifugó nuevamente y el sobrenadante fué descartado. La enzima contenida en el residuo fué resuspendida en Tris-HCl 0.05 M pH 8.5 conteniendo 20 % de glicerina (v/v) y dializada contra dos volúmenes de la solución amortiguadora antes mencionada durante 24 hrs.

4.7.2.2. Precipitación ácida

La recuperación de la enzima a partir del extracto celular mediante precipitación ácida se utilizó como una alternativa a la precipitación con sulfato de amonio. Se llevó a cabo mediante una modificación del proceso de recuperación de invertasa intracelular de levadura, reportado por Büntemeyer *et al* [37]. Mediante éste proceso se busca llevar a cabo una desnaturalización selectiva de proteínas y otros componentes presentes en el extracto celular para de ésta manera precipitarlos sin afectar la estabilidad y la solubilidad de la proteína de interés. Se utilizó ácido acético al 5% para la modificación del pH hacia valores ácidos, y una solución de hidróxido de potasio 1M para la modificación del hacia valores básicos. La titulación se llevó a cabo en lotes de 100 y 900 ml. Los cambios de pH se realizaron en forma gradual de un pH inicial de 8.5 (pH de la solución de enzima del extracto celular), hasta un valor de pH de 5.5 sin alcanzar el punto isoeléctrico de la fenilalanina amonio-liasas (pI 5.4 reportado para la enzima de *R. glutinis*). Los cambios de pH se monitorearon con un potenciómetro y la adición de ácido se realizó en un período de 5 a 20 minutos. Después de un período de 10 minutos de contacto a pH 5.5, la mezcla se centrifugó (13 000 a 15 000 rpm, durante 5 minutos) y el residuo se descartó recuperando la enzima en el sobrenadante. Finalmente, el sobrenadante se tituló con hidróxido de sodio hasta alcanzar un pH igual a 8.5 y se concentró en un cartucho de fibra hueca (Amicon, H1P100-20) .

4.7.3. Cromatografía de intercambio iónico.

Se emplearon columnas de diversas capacidades: 1.5 x 20 cm, 1.5 x 50 cm y 2.5 x 80 cm . La solución de enzima, previamente dializada, se hace pasar por la columna de DEAE-Sephacel equilibrada con una solución amortiguadora de Tris-HCl 0.05 M, pH 8.5 conteniendo glicerina al 20% (v/v). La proteína absorbida a la columna fué eluída con el mismo amortiguador, conteniendo cloruro de potasio en un gradiente lineal de 0 a 0.3 M de KCl. Se colectaron fracciones durante el desarrollo de la cromatografía, durante todo el experimento se mantuvo un flujo de elución igual a 1 ml/min. La carga de proteína en todos los experimentos fué equivalente al 10% de la capacidad total de la columna.

4.8. Electroforesis en gel de poliacrilamida

La enzima soluble fué analizada por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS-PAGE al 10 % preparado de acuerdo al método de Laemmli [38].

4.9. Inmovilización de la enzima parcialmente purificada por enlace covalente

El acoplamiento de enzimas a soportes enzimáticos por enlace covalente puede llevarse a cabo mediante la unión directa a grupos apropiados del soporte ó vía un grupo espaciador. La molécula espaciadora permite cierto grado de movilidad a la enzima acoplada y de esta manera es posible evitar limitaciones en la actividad. Sin embargo, la actividad y estabilidad de una enzima inmovilizada en un soporte depende en gran parte del tipo de enlace formado con el soporte. En este sentido, es importante la selección y el manejo de diferentes alternativas de unión enzima-soporte. En el caso particular de la inmovilización de fenilalanina amonio-liasa, se decidió utilizar dos soportes que presentan diferentes grupos reactivos. El Spherosil es un soporte de sílica porosa activada con glutaraldehído, donde este último funciona como molécula espaciadora para la unión de la enzima. El EUPERGIT C, es una resina epoxiacrífica la cual está activada con grupos oxiranos en su estructura química, donde la enzima se acopla a estos grupos espaciadores. Ambos soportes enzimáticos han sido empleados en la inmovilización de otras enzimas logrando una mayor estabilidad térmica. A continuación se hace una breve descripción de los procedimientos y las reacciones de inmovilización en ambos soportes para la fenilalanina amonio-liasa

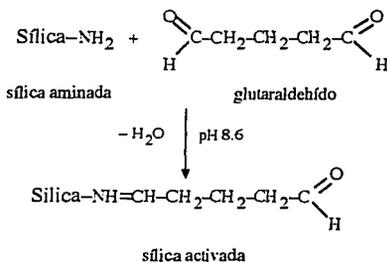
4.9.1. Inmovilización por enlace covalente en sílica porosa aminada

La enzima fenilalanina amonio-liasa parcialmente purificada se inmovilizó por enlace covalente en un soporte de sílica porosa aminada (*Spherosil, Rhone Poulenc*), activado con glutaraldehído al 2% en una solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M pH 8.6 [39]. Después de dos horas de contacto con el glutaraldehído, el Spherosil queda activado y es entonces lavado con Tris-HCl 0.05 M pH 8.5. La solución de enzima parcialmente purificada contenida en Tris-HCl 0.05 M pH 8.6 y glicerina al 20% (v/v), fué adicionada en una relación de 80 ml/g de soporte equivalente a 12 mg de proteína por gramo de soporte. Después de dos horas de contacto el soporte con la enzima inmovilizada se lava con suficiente solución amortiguadora y NaCl 1M. Finalmente se determina la actividad enzimática de la enzima inmovilizada.

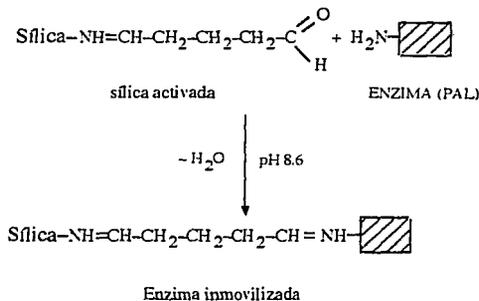
Dada la porosidad del soporte, el área específica de la sílica es un parámetro importante a considerar en este método de inmovilización. En este caso se probaron tres diferentes áreas: 6 m²/g, 122 m²/g y 445 m²/g, con un tamaño de partícula de 100 a 200 μ en los tres casos.

La inmovilización de la enzima en sílica, involucra dos etapas: primero se lleva a cabo la activación de la sílica con glutaraldehído (a), y segundo la unión de la enzima con el soporte vía grupos aldehído (b) como se describe en la siguiente reacción.

(a) activación con glutaraldehído



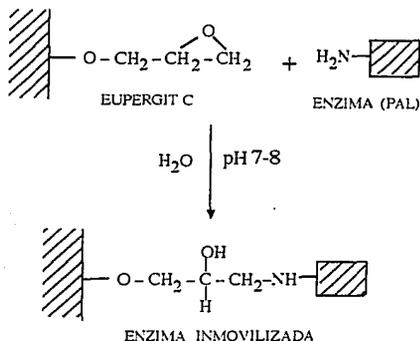
(b) acoplamiento de la enzima al soporte activado



4.9.2. Inmovilización por enlace covalente en EUPERGIT C

Una solución de enzima (8 ml) parcialmente purificada contenida en una solución amortiguadora de fosfato de potasio 1 M (pH 7.4; preparada con la mezcla de KH_2PO_4 y K_2HPO_4 , conteniendo 0.1% de NaN_3 como conservador) y glicerina al 20% (v/v), fué adicionada de manera uniforme a 100 mg de EUPERGIT C (Röhm Pharma; perlas epoxiacríficas). La relación proteína/sopORTE fué de 12 a 18 mg de proteína por gramo de soporte. Después de un período de contacto de 24 horas a temperatura ambiente (21 - 25 °C), la enzima acoplada al soporte se lavó primero con 50 ml de agua destilada, después con una solución de NaCl 1 M y finalmente con la solución amortiguadora en la cual se utiliza el catalizador. El catalizador obtenido se almacenó en refrigeración (aproximadamente 5 °C). La remoción de grupos oxiranos del catalizador, después de la unión del soporte con la enzima generalmente es innecesaria, sin embargo si se requiere puede llevarse a cabo mediante la reacción con los siguientes compuestos: 2-mercaptoetanol, 2-aminoetanol, glicina, ácido tioacético ó cisteína. [40].

La unión de la proteína al soporte se realiza vía grupos oxiranos, como se presenta en la siguiente reacción:



RESULTADOS Y DISCUSION

5. Producción de la enzima fenilalanina amonio-liasa

En estudios previos con el mismo microorganismo [14] fueron definidas las condiciones de fermentación: 30 °C, pH inicial 5.5 sin control durante la fermentación, 600 rpm y una velocidad de aireación de 0.3 vvm; y se llevó a cabo la optimización de un medio de cultivo para la inducción de la enzima, estando constituido por extracto de malta (1.4 %), extracto de levadura (0.35%) y fenilalanina como inductor (0.8%).

Bajo éstas condiciones de cultivo el comportamiento cinético de la levadura *S. paraseus* en fermentador de 2 l en un medio inducido se reporta en la Fig. 3a. El perfil de actividad durante el proceso de fermentación fué bastante similar a los perfiles reportados para otros microorganismos con respecto a la inducción y estabilidad de la fenilalanina amonio-liasa durante la fermentación [29,41,42]. Se obtuvieron células con una actividad específica de 27.8 U/g a las 16 horas de fermentación con una productividad de enzima de 7.23 U/h (Tabla 3). Los niveles máximos de actividad se presentaron a la mitad de la fase exponencial de crecimiento, para después disminuir fuertemente en las últimas horas de la fermentación. Esta caída de actividad coincide con el incremento de los niveles de oxígeno en el medio de cultivo. Evans *et al.* [12], postulan que el oxígeno está involucrado en el mecanismo de desactivación de la enzima durante la fermentación y demostraron que cuando se cambian las condiciones aerobias de la fermentación a un proceso anaerobio después de alcanzar el punto máximo de actividad, es posible prevenir la desactivación de la enzima. Por lo anteriormente expuesto, es necesario caracterizar el sistema de producción de la enzima en términos del tiempo óptimo de fermentación para la cosecha de células, de acuerdo con las condiciones de fermentación óptimas para la producción de la enzima tales como la agitación, aireación y control del pH.

5.1. Efecto del oxígeno y el pH en la producción y estabilidad de la enzima PAL

Con el fin de observar si una disminución en el suministro de oxígeno en la fermentación ocasionaba un efecto sobre la actividad y estabilidad de la enzima, se disminuyó el nivel de oxígeno disuelto en el medio, bajando la velocidad de agitación de 600 rpm a 300 rpm y manteniendo la misma velocidad de aireación (0.30 vvm). Mediante este cambio se registró un incremento en la actividad específica, así como una caída de actividad menos drástica después de haberse alcanzado el punto máximo (Fig. 3b).

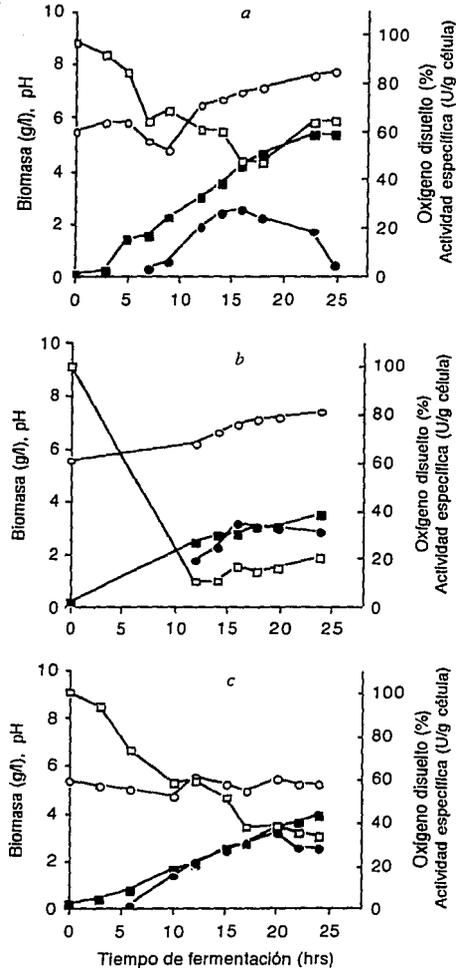


FIGURA 3. Perfil del crecimiento celular, actividad enzimática, pH y oxígeno disuelto durante la producción de la enzima PAL de *S. pararoseus*. Fermentación bajo condiciones reportadas por Kawasaki *et al.* [14] (a); efecto de la reducción del nivel de oxígeno disuelto (b) y control del pH durante la fermentación (c), sobre la producción y estabilidad de la enzima.

(■) biomasa; (○) pH; (□) oxígeno disuelto; (●) actividad específica.

La máxima actividad fué de 34 U/g de célula a las 18 horas de fermentación con una producción de biomasa de 3.03 g/l (Tabla 3). Sin embargo, a pesar del incremento en la actividad específica, la productividad obtenida bajo éstas condiciones de fermentación fué menor (5.67 U/l h): los resultados resultan ser más bajos como consecuencia de un proceso más largo.

Por otra parte, también se estudió el efecto del control del pH durante la fermentación con la finalidad de incrementar la productividad de la enzima. Para ello se llevó a cabo una fermentación controlando el pH a un valor de 5.5 (pH óptimo de producción de la enzima). A pesar de que no se logró un buen control del pH durante la fermentación como se puede observar en la Fig. 3c, esta variable afectó principalmente la velocidad de crecimiento de la levadura y los niveles de actividad específica. Lo anterior puede constatare en la Tabla 3 comparando los valores de velocidad de crecimiento y actividad específica obtenidos bajo las condiciones de fermentación previamente definidas (Figura 3a), y los obtenidos cuando se tiene un control sobre el pH. El valor máximo de actividad fué de 35 U/g de célula, alcanzada a las 20 horas de fermentación con una producción de biomasa de 3.38 g/l. Dichos resultados son semejantes a los obtenidos cuando se disminuye el suministro de oxígeno. Igualmente, en términos de productividad también se tiene un proceso menos eficiente. lo que puede constatare en la Tabla 3.

TABLA 3
Resumen de producción de la enzima fenilalanina amonio-lias,
por fermentación líquida de *S. parvoseus* en fermentadores de 2 y 14 l.

Fermentación	Tiempo de máxima actividad (h)	Biomasa (g/l)	Velocidad crecimiento (h^{-1})	Actividad específica (U/g célula p. s)	Productividad (U/l h)
Fermentador de 2 l.					
600 rpm; 0.30 VVM; pH 5.5, sin control durante la fermentación	16	4.16	0.42	27.80	7.23
300 rpm; 0.3 VVM; pH 5.5 sin control durante la fermentación.	18	3.03	N.D	33.71	5.67
600 rpm; 0.30 VVM ; pH controlado alrededor de 5.5	20	3.38	0.233	35.00	5.92
Fermentador de 14 l					
400 rpm; 0.5 VVM; pH 5.5, sin control durante la fermentación.	13	2.92	0.25	33.11	7.43

- La temperatura manejada en todas las fermentaciones fué de 30 °C.

- U (unidad enzimática) = una unidad enzimática se define como la cantidad de enzima que produce 1 μ mol de ácido *trans*- cinámico en un minuto, a 30 °C.

Es evidente que el objetivo es contar con un sistema de producción que permita la mayor producción de la enzima en el menor tiempo posible, siempre y cuando la actividad pueda mantenerse estable en el medio. Por esta razón se decidió producir la enzima en las condiciones de operación originalmente definidas por Kawasaki *et al.* [14], suspendiendo la aireación después de alcanzar el nivel máximo de actividad y cosechando las células inmediatamente después, para evitar en lo posible la desactivación de la enzima. Por otra parte, también se realizaron fermentaciones a nivel piloto en fermentadores de 14 l. En este caso, las condiciones de fermentación fueron de 0.5 VVM, 400 rpm a la misma temperatura y sin control de pH durante la fermentación. De esta manera fué posible alcanzar los mismos niveles de actividad obtenidos en el fermentador de 2 l. Usando este procedimiento se llevaron a cabo múltiples fermentaciones para disponer de enzima para las siguientes etapas del proyecto.

6. Purificación de la enzima fenilalanina amonio-liasa

6.1. Extracción de la enzima, mediante la ruptura celular por molienda en molino de perlas.

Para la ruptura de células y la consecuente liberación de los componentes intracelulares, existe una diversidad de técnicas a nivel laboratorio, pero sólo dos métodos mecánicos, son empleados a gran escala: el Homogenizador de alta presión basado en el diseño de Manton-Gaulin y el molino de esferas de alta velocidad, el Dyno mill tanto vertical como horizontal. En el molino, a diferencia del homogenizador, la eficiencia de ruptura depende de la concentración de células alimentadas. De cualquier forma, en ambos casos el fluido debe pasar varias veces por el equipo dependiendo de la dureza de la célula y de la ubicación de la enzima (periplásmica, citoplásmica etc.). La optimización consiste en determinar el número mínimo de pasos por el equipo, la máxima concentración de alimentación y las condiciones de ruptura (tiempo de molido o presión) para obtener la máxima extracción sin que la enzima pierda actividad por calentamiento [15]. Para llevar a cabo esta operación, se utilizaron dos equipos: un molino de laboratorio (BEAD BEATER) y un DYNOMILL de 1 l.

Se analizaron las dos principales variables en el proceso: la concentración de células y el tiempo de residencia. La concentración óptima de células se determina empíricamente para cada caso, aunque usualmente se ubica en un rango del 30-60% peso húmedo de la suspensión celular (9 - 18% base seca) [43]. Por otra parte, para la ruptura de levaduras se recomienda utilizar un diámetro promedio de perlas de 0.5 mm. Estos experimentos se realizaron en el molino de laboratorio.

6.1.1 Tiempo de residencia

Para determinar el tiempo de residencia en el proceso de extracción de la enzima, una cantidad de células con actividad de fenilalanina amonio-liasas fué resuspendida en amortiguador Tris-HCl (0.1 M pH 8.5) para obtener una suspensión celular de concentración igual a 50 g/l. Posteriormente fueron trituradas en un BEAD-BEATER durante un período de 18 minutos, tomando muestras a diferentes intervalos de tiempo con la finalidad de monitorear la liberación de la enzima. El grado de liberación, se determinó mediante la medición de actividad enzimática en el homogenado celular (suspensión de células rotas). El perfil de liberación obtenido en este experimento se presenta en la Fig. 4, donde se puede apreciar que con un tiempo de residencia de 18 minutos se logra extraer el 90% de la actividad intracelular.

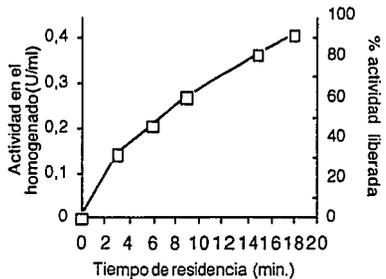


FIGURA 4. Efecto del tiempo de residencia en la liberación de la enzima fenilalanina amonio-liasas durante la molienda en molino de perlas de una suspensión celular (50 g/l), con una actividad inicial equivalente a 0.42 U/ml antes de la ruptura.

6.1.2 Efecto de la concentración de células

Determinado el tiempo de residencia se procedió a estudiar el efecto de la concentración de células en la liberación de la enzima. Para este estudio el límite superior de concentración de células fué de 150 g/l, considerando recomendaciones de la bibliografía. En la Fig 5, se presenta una comparación de la liberación de la enzima cuando la extracción se efectúa con concentraciones de biomasa de 50 g/l y 120 g/l. Como puede observarse no existe una diferencia marcada en el grado de liberación de la enzima al final del proceso (20 minutos) a pesar de que la cinética de extracción es

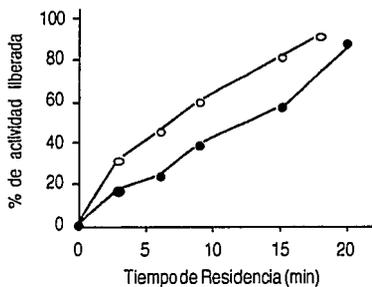


FIGURA 5. Efecto de la concentración de células en la extracción de la fenilalanina amonio-liasas. (○) 50 g/l, 0.42 U/ml de actividad inicial. (●) 120 g/l, 1.4 U/ml de actividad inicial..

diferente. Para altas concentraciones de células, pareciera existir una etapa inicial mas lenta. Sin embargo, el hecho de alcanzar rendimientos iguales indica que el proceso es independiente de esta variable, siendo posible llevarlo a cabo en este rango de concentración. Se decidió trabajar con la mayor concentración de células, pues esto permite manejar volúmenes pequeños en la siguientes etapas de purificación y en general se aumenta la productividad.

Para llevar a cabo el procesamiento de una mayor cantidad de suspensión celular (500 ml - 1000 ml) se utilizó un molino de perlas escala piloto (Dyna-mill). En el escalamiento del proceso de ruptura a escala piloto se consideraron algunas variables del proceso.

Se sabe que la velocidad de liberación de proteína por métodos mecánicos durante un proceso de ruptura sigue una cinética de primer orden. La forma integrada de la ecuación de velocidad que describe la ruptura celular en un molino de perlas es la siguiente:

$$\text{Ln} \left[\frac{R_m}{R_m - R} \right] = k t \quad (\text{EC. 1})$$

Donde:

R_m = máxima cantidad de proteína que puede ser liberada

R = cantidad de proteína liberada

K = constante de primer orden

t = tiempo de residencia

La constante de velocidad (k) representa la eficiencia de ruptura y es una función de la velocidad de agitación, concentración de células, concentración de perlas, diámetro de las perlas, el tiempo de residencia y la temperatura.

Para el escalamiento del proceso de extracción se trató de mantener constante a las siguientes variables, la concentración de suspensión celular (120 g/l), el diámetro de las esferas (~ 5 mm) y el tiempo de residencia (20 minutos) previamente determinado a nivel laboratorio. Durante el proceso se manejaron temperaturas bajas (entre 5 y 15 °C) para evitar la desnaturalización de la enzima.

La evaluación del proceso de extracción se realizó con base en dos parámetros: la eficiencia de extracción y la recuperación de la enzima al final de esta etapa. La eficiencia de extracción se reporta como el % de liberación y se define como la relación entre la actividad enzimática medida en el homogendo y la actividad inicial medida en la suspensión celular antes de la ruptura, como se presenta en la ecuación 2:

$$\% \text{ de liberación} = \frac{A_H}{A_I} \times 100 \quad (\text{EC. 2})$$

Donde: A_H = Actividad enzimática extracelular medida en el homogenado (U totales).
 A_I = Actividad enzimática intracelular medida en la suspensión celular antes de la ruptura (U totales).

La recuperación de la enzima al final de la etapa de extracción reportada como el % de recuperación, se define como la relación entre la actividad final que se obtiene en el sobrenadante (extracto celular), después de la eliminación de restos celulares por centrifugación y la actividad inicial medida en la suspensión celular, ecuación 3:

$$\% \text{ de Recuperación} = \frac{A_E}{A_I} \times 100 \quad (\text{EC. 3})$$

Donde: A_E = Actividad enzimática final medida en el extracto celular (U totales)
 A_I = Actividad enzimática intracelular, medida en la suspensión celular antes de la ruptura (U totales).

En la Tabla 4 se presenta un resumen de los resultados obtenidos en la extracción de la enzima escala laboratorio y nivel piloto. Como se puede observar se logró alcanzar el mismo

TABLA 4
 Extracción de la enzima fenilalanina amonio-liasas
 de *S. parvoseus*, mediante la ruptura celular en molino de perlas

EQUIPO	Muestra	Volumen de Muestra (ml)	Concentración de células (g/l)	Actividad enzimática (U/ml)	U totales	% de liberación	% de recuperación
BEAD BEATER (laboratorio)	Suspensión celular	115	50	0.42	48.3	} 90.50	~90
	Homogenado	115	50	0.38	43.7		
	Suspensión celular	150	120	1.4	210	} 87.86	~90
	Homogenado	150	120	1.23	184.5		
*DYNO-MILL (piloto)	Suspensión celular	640	120	1.4	896	} 90.51	80.35
	Homogenado	990	120	0.82	811		
	Extracto celular	900	120	0.8	720		

* CONDICIONES DE OPERACION: Q = 15 ml /min; ϕ perlas = 0.4-0.7 mm; Tiempo de residencia = 20 minutos.

grado de liberación que a nivel laboratorio, lo cual indica que el proceso de extracción de la enzima en este equipo de ruptura es, en principio, escalable. El proceso de extracción no afecta la estabilidad de la enzima ya que es posible recuperar alrededor de 90% de la actividad inicial. De estos resultados se puede concluir entonces, que el método de extracción utilizado es apropiado para llevar a cabo este proceso.

6.2. Recuperación de la enzima a partir de extractos celulares

Dentro de las principales etapas de purificación de la fenilalanina amonio-liasa reportadas en la bibliografía, se incluye la precipitación con sales (sulfato de amonio y citrato de sodio) como una etapa de recuperación y concentración de la enzima. De estas sales, la más utilizada es el sulfato de amonio.

Para la recuperación de la enzima PAL de *S. parvoseus*, se utilizó como una primera alternativa la precipitación con sulfato de amonio y como una segunda alternativa la precipitación ácida. La evaluación de ambos métodos de recuperación fue realizada considerando el grado de purificación (veces de purificación) obtenido en la muestra tratada y el rendimiento obtenido al final del tratamiento.

Las veces de purificación se presentan como un número adimensional y es una medida del grado de pureza que se obtiene en cada etapa de purificación. Dicho número puede definirse como la relación entre la actividad específica obtenida después del tratamiento, y la actividad específica inicial del extracto celular sin tratar:

$$\text{Veces de purificación} = \frac{A.E_{Fp}}{A.E_{Ec}} \quad (\text{EC. 4})$$

Donde:

$A.E_{Fp}$ = Actividad específica medida en la fracción de enzima precipitada (U/mg proteína)

$A.E_{Ec}$ = Actividad específica medida en extracto celular (U/mg proteína)

El rendimiento es una medida de la eficiencia del método y representa el porcentaje de la actividad inicial recuperada al final del tratamiento, el cual se define como:

$$\text{Rendimiento}(\%) = \frac{A_{Fp}}{A_{Ec}} \times 100 \quad (\text{EC.5})$$

Donde:

A_{Fp} = Actividad final medida en la fracción precipitada (U totales)

A_{Ec} = Actividad inicial medida en el extracto celular (U totales)

6.2.1. Precipitación con sulfato de amonio

Para la precipitación de la enzima de *S. parvoseus*, fué necesario realizar un fraccionamiento desde un 0% a un 60% de saturación de sulfato de amonio. Se encontró que el 90% de la enzima precipita en la fracción comprendida entre el 30% y el 60% de saturación de sulfato de amonio. En la Tabla 5 se presenta un resumen de los resultados obtenidos en esta etapa, la enzima se logró purificar alrededor de 3 veces con respecto a la actividad inicial del extracto con un rendimiento del 90%.

TABLA 5
Recuperación de la enzima PAL de
S. parvoseus, mediante precipitación con sulfato de amonio.

Muestra	Volumen (ml)	Proteína (mg/ml)	Proteína Total (mg)	Actividad Enzimática (U/ml)	U totales	Actividad Específica (U/mg proteína)	Veces de purificación	Rendimiento (%)
Extracto Celular	50	4.42	221	0.293	14.65	0.066	1	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ 30%-60%	30	2.28	68.4	0.43	129	0.19	2.88	86
Muestra Dializada	30	2.06	61.8	0.44	132	0.22	3.33	90.1

6.2.2. Precipitación ácida

Durante el proceso de ruptura celular, se libera una gran parte de los pigmentos β -carotenoides que produce *S. parvoseus* como parte de su metabolismo. Dichos compuestos difícilmente pueden separarse mediante centrifugación; aun mas, no es posible separarlos durante la precipitación con sulfato de amonio. Su presencia representa un inconveniente en la cromatografía de intercambio iónico, donde interfieren con el desarrollo del proceso, resultando en una disminución en el rendimiento de esta etapa y contaminando la columna.

La precipitación ácida se utilizó como una alternativa en la recuperación de la enzima. Lo anterior con la finalidad de obtener una solución de enzima con un menor número de impurezas, que permita llevar acabo la siguiente etapa con eficiencia.

Se realizó inicialmente un barrido de pHs en forma descendente (de 8.5 hasta 4.5). Lo anterior se hizo con el fin de definir el valor de pH al cual precipita la mayor parte de proteína y otros contaminantes presentes en el extracto celular, sin precipitar a la fenilalanina amonioliasa y poder recuperarla en el sobrenadante de la solución. A pH 5.5 se logró recuperar en el sobrenadante el 100% de la actividad inicial del extracto celular (Tabla 6). Sin embargo, es de mayor relevancia el hecho de que mediante este tratamiento es posible eliminar a los compuestos de tipo carotenoide.

Tabla 6
Recuperación de la enzima PAL de
S. parvoseus mediante precipitación ácida

Muestra	Volumen (ml)	Proteína (mg/ml)	Proteína Total (mg)	Actividad Enzimática (U/ml)	U totales	Actividad Específica (U/mg prote.)	Veces de purificación	Rendimiento (%)
Extracto celular	20	5,06	101,2	0,11	2,2	0,022	1	100
Sobrenadante de la precipitación ácida	34	0,76	25,84	0,07	2,38	0,092	4,2	108,2

*La precipitación selectiva de proteínas y de otros contaminantes de la enzima fenilalanina amonio-licasa, contenida en los extractos celulares se realizó disminuyendo el pH con ácido acético (al 5%) hasta un valor de 5.5. Después de un período de contacto de 10 minutos, el pH se ajusta nuevamente a 8.5. El experimento se llevó a cabo a temperatura ambiente.

6.3. Purificación de la enzima por cromatografía de intercambio iónico

6.3.1. Cromatografía de intercambio iónico

En el primer ensayo de purificación, 50 ml de solución de enzima dializada obtenida por precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, fueron tratados en una columna de DEAE-Sephacel (1.5 x20 cm). Posteriormente, la enzima fué eluída con un gradiente de KCl, de 0-0.5 M en Tris-HCl 50 mM pH 8.5. Los resultados obtenidos en los primeros ensayos fueron poco satisfactorios según puede constatare en la Tabla 7, ya que los rendimientos de este proceso fueron bajos (alrededor del 30%) siendo la cromatografía la etapa donde mayores pérdidas de actividad se presentaron. El perfil de elución obtenido durante la cromatografía se presenta en la Fig 6.

TABLA 7
Resumen de purificación de la enzima fenilalanina amonio-licasa de *S. parvoseus*.

Etapas	Volumen (ml)	Proteína (mg/ml)	Proteína total (mg)	Actividad Enzimática (U/ml)	U totales	Actividad Específica (U/mg proteína)	Veces de purificación	Rendimiento (%)
1. Extracto celular	50	4.42	221	0.29	14.65	0.066	1	100
2. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 30-60 %	30	2.06	61.8	0.44	13.2	0.22	33.3	90.1
3. DEAE Sephacel								
F19		0.26	2.15	0.06	0.65	0.3	4.5	4.44
F20	8.3	0.37	3.07	0.27	2.24	0.73	11	15.3
F21		0.36	3	0.21	1.71	0.57	8.6	11.67
					4.6			31.42

La cromatografía de intercambio iónico se llevó a cabo en una columna de DEAE-Sephacel (1.5 x 20 cm) equilibrada con buffer Tris-HCl 50mM, pH 8.5. La enzima fué eluída con un gradiente de KCl (0 - 0.5 M), en Tris-HCl 50 mM pH8.5.

1 U = 1 μ mol de ácido *trans*-cinámico formado por minuto, a 30 °C.

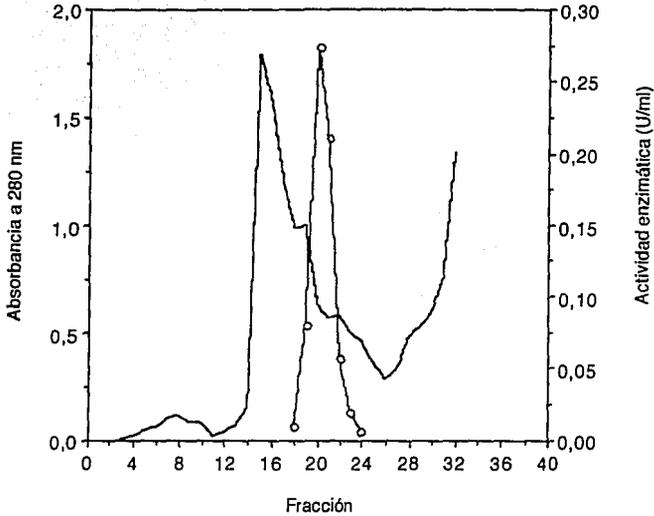


FIGURA 6. Purificación de la enzima fenilalanina amonio-liasa por cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sephacel. La cromatografía se desarrolló con un amortiguador de Tris-HCl 50mM, pH 8.5. La proteína se eluyó con un gradiente de KCl de 0-0.5 M. (—) proteína; (○) actividad enzimática.

Por otra parte, la enzima que se recupera de la columna, presenta una baja estabilidad; después de tres días de estar almacenada a 4 °C en Tris-HCl 50mM (pH 8.5), se pierde el 50 % de su actividad inicial. Estos resultados demuestran nuevamente los problemas de inestabilidad intrínseca de la enzima, los cuales se presentan desde su producción hasta, la aplicación de la misma. Aparentemente la desactivación de la enzima se debe a que esta se encuentra mucho más pura, lo cual la hace más inestable. Los resultados sugieren el planteamiento de una estrategia mediante la cual se pueda estabilizar a la enzima durante su purificación.

6.3.2. Cromatografía de intercambio iónico en presencia de glicerina

6.3.2.1. Estabilización parcial de la fenilalanina amonio-liasa

Para mejorar la estabilidad de la enzima durante el proceso de purificación se decidió estudiar la posibilidad de utilizar un agente estabilizante durante la cromatografía de intercambio iónico, etapa donde se presentan las mayores pérdidas de actividad de la enzima. Evans *et al.* [12] realizando un estudio de estabilización de la enzima PAL durante el proceso de producción de L-fenilalanina, encontraron que el alginato, el glutaraldehído y alcoholes polihídricos como la glicerina, sorbitol y polietilenglicol fueron estabilizadores efectivos de la fenilalanina amonio-liasa. De dichos agentes se seleccionó polietilenglicol (PEG), glutaraldehído y glicerina como posibles estabilizadores de la enzima.

Para estudiar el efecto estabilizante de los compuestos antes mencionados, fué necesario llevar a cabo primero un estudio sobre la desactivación de la enzima. Este ensayo se realizó en condiciones drásticas con el fin de reducir los tiempos de experimentación. Lo anterior se realizó con la finalidad de seleccionar una temperatura que acelere los procesos de desactivación de la enzima y de esta manera estudiar en tiempos cortos el efecto estabilizante del glutaraldehído, PEG y la glicerina. Para dicho experimento, la enzima del extracto celular contenida en Tris-HCl 50mM (pH 8.5) fué sometida primero a un estudio de desactivación a diferentes temperaturas de almacenamiento: 40, 50 y 60°C. Los perfiles de actividad obtenidos durante la desactivación por tratamiento térmico se muestran en la Fig 7 donde puede constatar que la enzima a 60 °C pierde prácticamente toda la actividad en dos horas. El proceso de desactivación de la enzima bajo estas condiciones de almacenamiento sigue un modelo cinético de desactivación de orden cero.

De estos resultados se seleccionó 60°C para evaluar el efecto estabilizante que tienen la glicerina 30% (v/v), el PEG 0.5 y 2 % (p/v) y el glutaraldehído al 0.5% (v/v). La concentración utilizada de cada uno de los aditivos en este experimento, fué la misma que se utilizó para los estudios de estabilidad realizados por Evans *et al.* [12].

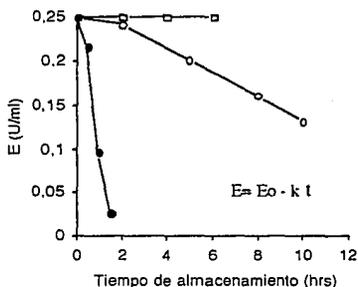


FIGURA 7. Desactivación de la enzima fenilalanina amonio-liasa bajo diferentes temperaturas de almacenamiento: (□) 40 °C, (○) 50 °C y (●) 60 °C.

En las Fig. 8 se presentan los resultados de estos estudios, demostrándose que el PEG acelera la desactivación de la fenilalanina amonio-*liasa* de *S. parvoseus*, y el glutaraldehído la desactiva prácticamente en forma instantánea. Sin embargo la glicerina, presentó un efecto positivo sobre la estabilidad de la enzima. Dicho efecto se mantiene cuando se trabaja a una concentración mayor o igual al 20%.

La desactivación de la fenilalanina amonio-*liasa* a diferentes temperaturas y en presencia de los diversos estabilizantes fué cuantificada en términos de una constante de desactivación, calculada a partir de la ecuación derivada de un modelo cinético de desactivación de orden cero. Los valores de las constantes obtenidas en cada caso se presentan en la Tabla 8, donde puede constatar que la glicerina tiene un efecto protector significativo. La vida media de la enzima a 60 °C se incrementa aproximadamente en un 50% en presencia de este efector.

De estos estudios realizados, se decidió incluir en el eluyente para la cromatografía de intercambio iónico, glicerina al 20 % como agente estabilizante con la finalidad de estabilizar a la enzima durante y después de esta etapa de purificación.

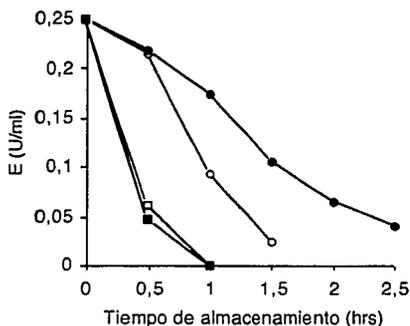


FIGURA 8. Efecto de diversos efectores en la estabilidad de la fenilalanina amonio-*liasa* durante su desactivación a 60 °C. Glicerina 30% (●); PEG 0.5% (□), 2% (▲); control, la enzima en Tris-HCl 50mM pH 8.5 (○).

TABLA 8
Efecto de algunos aditivos en la estabilidad de la enzima fenilalanina amonio-*liasa*.

Condición	Vida media t _{1/2} (h)	Constante de desactivación k (U/ml h)
En Tris-HCl 50 mM pH 8.5 a diferentes temperaturas.		
50 °C	10.16	0.0123
60 °C	0.78	0.1600
En presencia de glicerina y PEG a 60 °C.		
Glicerina al 30 %	1.4	0.0896
PEG 0.5 %	0.5	0.2500
PEG 2 %	0.5	0.2500

6.3.2.2. Cromatografía de intercambio iónico: enzima recuperada por precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

La enzima concentrada a través de precipitación con sulfato de amonio se redisolvió en una solución amortiguadora de Tris-HCl 50 mM, pH 8.5 conteniendo 20% de glicerina. Un volumen (14 ml) de la solución anterior se alimentó a una columna de DEAE-Sephacel, previamente equilibrada incluyendo glicerina como agente estabilizante. Los resultados de purificación en presencia de glicerina, se presentan en la Tabla 9, habiéndose encontrado la fenilalanina amonio-liasas en varias fracciones las cuales eluyen con un rango de concentración de 0 - 0.20 de KCl aproximadamente. El perfil de elución se muestra en la Fig 9.

TABLA 9
Resumen de purificación de la enzima PAL, en presencia de Glicerina.

Etapa	Volumen (ml)	Proteína (mg/ml)	Proteína total (mg)	Actividad enzimática (U/ml)	U totales	Actividad específica (U/mg prot.)	Veces de purificación	Rendimiento (%)
1. Extracto celular	100	2.36	236	0.27	27	0.09	1	100
2. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (30%-60%)	14	6.41	89.7	1.6	22.4	0.25	2.7	83
3. DEAE Sephacel								
F27	4.8	0.99	4.7	0.16	0.76	0.17	1.8	2.8
F28	4.8	1.05	5	0.83	3.98	0.79	8.8	14.7
F29	4.8	1.14	5.5	1.27	6.1	1.11	12	22.6
F30	4.8	1.11	5.3	0.9	4.32	0.82	9.1	16
F31	4.8	0.87	4.2	0.4	1.9	0.46	5.1	7
					17		global	63.1

La cromatografía de intercambio iónico se llevó a cabo en una columna de DEAE-Sephacel (1.5 x 20 cm) equilibrada con Tris-HCl 50mM, pH 8.5 conteniendo glicerina al 20%, como agente estabilizante. La enzima fué eluida con un gradiente de KCl (0 - 0.5 M), en Tris-HCl 50 mM pH8.5 y glicerina al 20%.

Al comparar los resultados de la Tabla 9 con la purificación reportada en la Tabla 7, se puede concluir que el uso de glicerina aumenta el rendimiento global (de 30% a 60%), recuperándose alrededor del 75% de la enzima cargada a la columna. Además un resultado paralelo, es que la enzima purificada en presencia de glicerina se mantiene estable a diferencia de lo que sucede en caso de eluir sin el efector. De hecho, no se detecta disminución en la actividad de la enzima almacenada a 4 °C en Tris-HCl 50 mM (pH 8.5) en presencia de glicerina al 20% durante un mes.

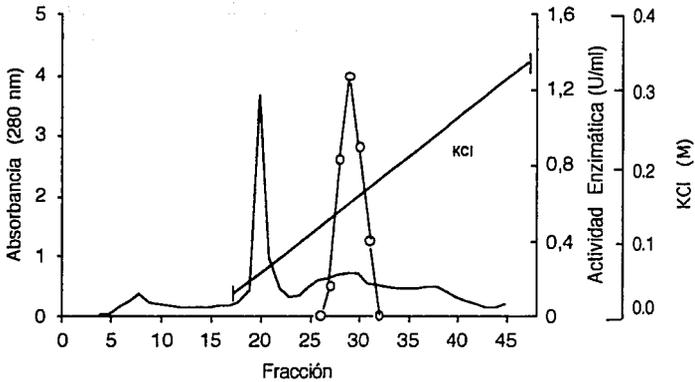


FIGURA 9. Purificación de la enzima fenilalanina amonio-lias por cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sephacel. La cromatografía se desarrolló con un amortiguador de Tris-HCl 50 mM, pH 8.5 conteniendo 20% (v/v) de glicerina. La proteína se eluyó con un gradiente de KCl de 0–0.5 M. (—) proteína; (O) actividad enzimática.

A pesar de que el proceso es eficiente en términos de recuperación de la enzima, el grado de purificación es bajo. Esto se puede observar con mayor detalle en la Fig 10, donde se presenta un análisis en gel de poliacrilamida de diferentes muestras de la enzima, así como de las fracciones que presentaron la mayor actividad enzimática. Como se puede observar, en las fracciones de mayor actividad (C (27), D (28), E (29), F(30) y G (31)) la cantidad de proteínas presentes es aún muy amplio. Para incrementar el grado de purificación de la enzima, se modificó el rango del gradiente de KCl.



FIGURA 10. Análisis de la PAL parcialmente purificada, por electroforesis (SDS-PAGE) en gel de poliacrilamida-SDS-PAGE al 10%. Enzima de la fracción 30-60% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (A), Extracto celular (B) y Cromatografía de intercambio iónico (C, D, E, F y G).

Considerando que la enzima cluye con un rango de concentración de 0.10 M a 0.20 M de KCl (Figura 6) se decidió modificar el gradiente, restringiendolo de 0-0.5 M a 0 - 0.30 M. Esta modificación incrementó el grado de resolución del sistema; el análisis de actividad en las fracciones obtenidas de la cromatografía bajo dichas condiciones, demostró que la enzima se logró purificar 32 veces con respecto a la inicial como puede constatarse en la Tabla 10. En la Fig 11 se presenta el perfil de elución de la cromatografía en DEAE-Sephacel obtenido cuando se modifica el gradiente de elución.

TABLA 10
Resumen de purificación de la enzima fenilalanina amonio-lias de *S. parareus* .

Etapa	Volumen (ml)	Proteína (mg/ml)	Proteína total (mg)	Actividad Enzimática (U/ml)	U totales	Actividad Especifica (U/mg de proteína)	Veces de purificación	Rendimiento (%)
1. Extracto celular	500	2.54	1270	0.19	95	0.073	1	100
2. (NH ₄) ₂ SO ₄ 30%-60%	65	6.43	418	1.43	92	0.22	3	96.8
3. DEAE Sephacel								
F64	3.2	ND		0.36	1.28	ND		1.34
F65	3	ND		0.53	1.6	ND		1.68
F66	3.7	ND		0.9	3.7	ND		3.89
F67	3.2	ND		1.2	3.84	ND		4.04
F68	3.5	ND		1.63	5.72	ND		6.02
F69	4	0.75	3	1.76	7.1	2.32	32	7.5
F70	7	1.04	7.3	1.67	11.67	1.6	22	12.2
F71	4.3	ND		1.33	5.73	ND		6.03
F72	4.4	ND		0.97	4.25	ND		4.47
F73	4	ND		0.53	2.13	ND		2.24
F74	4.5	ND		0.36	1.65	ND		1.73
					48.67		global →	51.14

La cromatografía de intercambio iónico, se llevó a cabo en una columna de DEAE-Sephacel (1.5x 55 cm) equilibrada con buffer Tris-HCl 50mM, pH 8.5, conteniendo glicerina al 20%, como agente estabilizante. La enzima fué eluida con un gradiente de KCl (0 - 0.3 M), en Tris-HCl 50 mM pH8.5. y glicerina al 20%.
ND = no se determinó

A pesar de los avances obtenidos en la estabilización parcial y el incremento en el grado de purificación de la enzima, los rendimientos del sistema de purificación no son atractivos para un proceso tendiente a la producción de un biocatalizador. Lo anterior se encuentra intimamente relacionado con la presencia de los compuestos carotenoides. Dichos compuestos se absorben a la resina de intercambio iónico e interfieren en el desarrollo de la cromatografía, lo cual se traduce en una pérdida de la enzima al final de este proceso. Adicionalmente la resina sufre un deterioro paulatino dada la dificultad de eliminarlo totalmente.

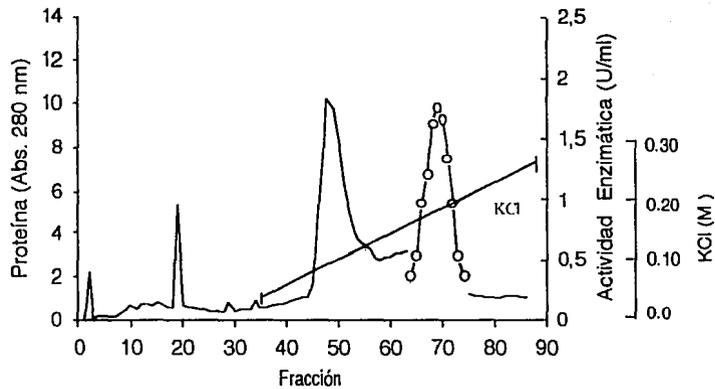


FIGURA 11. Purificación de la enzima fenilalanina amonio-liasa por cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sephacel. La cromatografía fue desarrollada en una columna (1.5 x 55 cm) con Tris-HCl 50 mM pH 8.5, conteniendo 20 % (v/v) de glicerina. La proteína fue eluida con un gradiente de KCl de 0 a 0.3 M. (—) Proteína, (○) actividad enzimática.

6.3.2.3. Cromatografía de intercambio iónico: enzima recuperada por precipitación ácida

La enzima (60 ml) del sobrenadante de la precipitación ácida previamente dializado en una membrana tipo AMICON (H1P100-20), se trató en una columna de DEAE-Sephacel. En la Tabla 11 se presenta un resumen de los resultados obtenidos en el proceso de purificación.

TABLA 11
Resumen de purificación de la enzima fenilalanina amonio-liasas recuperada por precipitación ácida.

Eiapa	Volumen (ml)	Proteína (mg/ml)	Proteína total (mg)	Actividad Enzimática (U/ml)	U totales	Actividad Especifica (U/mg de proteína)	Veces de purificación	Rendimiento (%)
1. Extracto celular	608	4.66	2833.28	0.106	64.45	0.023	1	100
2. Sobrenadante de la precipitación ácida	624	0.84	524.16	0.104	64.89	0.123	5.38	100
3. Ultrafiltración en membrana AMICON (H1P100-20)	175	2.90	507.50	0.37	64.75	0.128	5.56	100
4. DEAE Sephacel. volumen de carga (60 ml).		2.90	174.0	0.37	22.20	0.128	5.56	100
Fraciones F119	3	0.67	2.0	0.54	1.62	0.82	35.6	
F110- F127	54	0.46	24.80	0.33	17.82	0.72	31.3	80.27

La cromatografía de intercambio iónico se llevó a cabo en una columna de DEAE-Sephacel (1.5x 55 cm) equilibrada con buffer Tris-HCl 50mM, pH 8.5, conteniendo glicerina al 20%, como agente estabilizante. La enzima fué cluída con un gradiente de KCl (0 - 0.3 M), en Tris-HCL 50 mM pH8.5 y glicerina al 20%.

Como puede observarse, mediante este procedimiento se logró aumentar el rendimiento del proceso. Adicionalmente el proceso es más sencillo de implementar y sobre todo elimina el problema de la presencia de compuestos tipo carotenoide en la fracción que entra a la columna. Además permite obtener una muestra con un menor número de proteínas contaminantes disminuyendo la carga de la siguiente etapa de purificación. En la Fig 12, se presenta el perfil de elución para la cromatografía de intercambio iónico. Un aspecto interesante es la homogeneidad que presentan la mayoría de las fracciones de mayor actividad con respecto al número de proteínas. Por otro lado, la recuperación de la enzima por precipitación ácida y la purificación por cromatografía de intercambio iónico permiten obtener a la enzima fenilalanina amonio-liasas con un alto grado de pureza, como se puede observar en la Fig 13a. Donde se presenta el perfil electroforético en gel de poliacrilamida, de la fracciones de mayor actividad obtenidas por cromatografía.

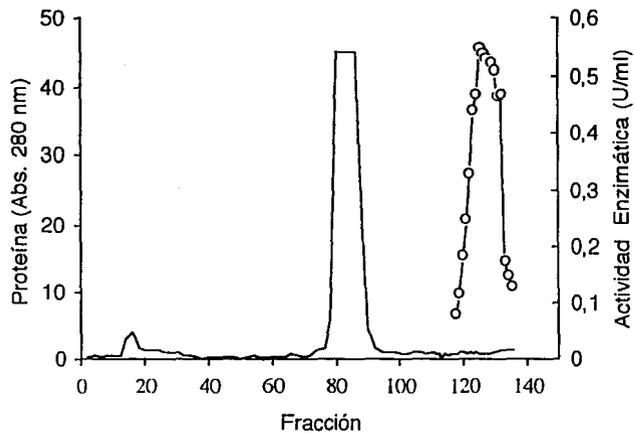


FIGURA 12. Perfil de elución y actividad enzimática en la purificación de la enzima fenilalanina amonio-liasa por intercambio iónico en una columna (1.5 x 55 cm) de DEAE-Sephacel. La proteína fue previamente sujeta a precipitación ácida y eluida con un gradiente de KCl (0-0.3 M). (—) Proteína, (○) actividad enzimática.

6.3.2.4. Análisis de la enzima por densitometría

Con la finalidad de cuantificar el grado de pureza con el cual se obtiene la fenilalanina amonio-liasas mediante el proceso antes descrito, se realizó un análisis más detallado de las fracciones obtenidas durante la cromatografía. Las muestras de enzima parcialmente purificada, fueron sometidas a un estudio de electroforesis (SDS-PAGE) en gel de poliacrilamida. En la Figura 12, se presenta el patrón de bandeo de dos de las corridas obtenidas durante la purificación de la enzima. Posteriormente el patrón de bandeo fué analizado en un analizador de imágenes (Bio Image Application, de MILLIPORE). Este sistema permite estimar entre otros parámetros, el nivel de pureza de una banda con base en la densidad óptica característica de dicha banda comparada con la densidad total. El análisis mostró que la pureza de la enzima en el ultrafiltrado es aproximadamente de un 17 % y de alrededor del 62% después de la purificación por cromatografía de intercambio iónico (Figura 13 a). Mediante algunos ajustes en el desarrollo de la cromatografía de intercambio iónico, la capacidad de resolución de la columna, carga de enzima y en el desarrollo del gradiente. La estrategia de purificación antes descrita permite obtener una solución de enzima con una actividad específica de alrededor de 1.5 U/mg de proteína con un grado de pureza cercano al 90% (Figura 13 b).

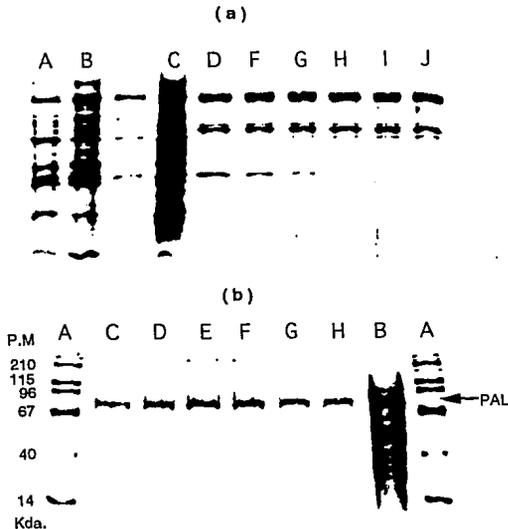


FIGURA 13. Análisis de la fenilalanina amonio-liasas parcialmente purificada, por electroforesis (SDS-PAGE) en gel de poliacrilamida al 10%.

Fig. 13a Enzima obtenida, por precipitación isoelectrica (A); ultrafiltrada (B); del extracto celular (C); purificada por cromatografía de intercambio iónico (D,F,G,H,I)

Fig. 13b Marcadores de peso molecular (A); enzima ultrafiltrada (B) y enzima parcialmente purificada por cromatografía de intercambio iónico (C,D,E,F,G,H).

6.4. Comparación relativa del proceso de purificación de la enzima de *S. pararoseus*.

Para finalizar la etapa de purificación de este trabajo de investigación, se presenta un análisis de los diferentes procesos de purificación reportados en la literatura para la enzima PAL y el desarrollado en el laboratorio previamente descrito para la enzima de *S. pararoseus*.

Es difícil hacer una comparación en términos económicos entre los diferentes procesos reportados y el proceso desarrollado en el laboratorio, por la escasa información existente y sobre todo por los diferentes objetivos buscados en cada caso. Cabe mencionar que el proceso desarrollado para la purificación de la enzima de *S. pararoseus*, fué realizado con la finalidad de obtener una solución enzimática y utilizarla en el desarrollo de un biocatalizador con la enzima inmovilizada por enlace covalente, donde es importante un elevado nivel el grado de pureza de la solución enzimática a inmovilizar.

Debido a lo anterior, se decidió realizar una comparación relativa en base a los datos de purificación reportados, tales como el grado de purificación y el rendimiento alcanzado al final del proceso, así como el número de etapas involucradas. Con este objeto se presenta un resumen donde se presentan los principales datos de purificación reportados para cada proceso (Tabla 12).

TABLA 12.
Comparación relativa de los procesos de purificación reportados para la Fenilalanina amonio-liasa y el desarrollado en el laboratorio.

Microorganismo	Actividad específica inicial (U/mg prot)	Actividad específica final (U/mg prot)	Factor de purificación	Número de etapas de purificación	Rendimiento (%)	Ref
<i>Rhodotorula glutinis</i> 0539	0.01	2.6	260	4	28	25
<i>Rhodotorula glutinis</i> ATCC 15385	0.022	1.07	48	6	17	28
<i>Rhizoctonia solani</i>	0.003	0.68	227	4	17.9	49
<i>Streptomyces verticillatus</i> ATCC 13495	0.0005	0.0201	40	5	9	50
<i>Sporobolomyces pararoseus</i>	0.003	1.310	436	6	47	51
<i>Sporidiobolus pararoseus</i> NRRL-Y 5484. (Este trabajo)	0.023	0.72	31	2	80	

En cuanto al número y características de las etapas involucradas en los diferentes procesos de purificación, es evidente que el proceso de purificación propuesto en este trabajo resulta bastante práctico y atractivo desde el punto de vista económico, pues sólo involucra una sola etapa de recuperación (la precipitación ácida) previa a la purificación por cromatografía. En cambio, los procesos analizados incluyen como mínimo 4 etapas de recuperación de la enzima, lo que sin duda repercute en el costo del proceso.

Con respecto a la actividad específica de la mezcla de fracciones obtenidas con el proceso de purificación desarrollado en este trabajo, resulta baja comparada con la de algunas otras fuentes (Tabla 2). Sin embargo, esto es un punto que no depende estrictamente del proceso de purificación sino de la fuente misma. En este sentido cabe mencionar que de acuerdo al análisis electroforético de la enzima parcialmente purificada, el grado de purificación obtenido mediante dicho proceso es bastante aceptable (ver resultados y discusión). Aunado a lo anterior, el proceso permite obtener un alto grado de recuperación de la enzima: aproximadamente el doble con respecto a los obtenidos con los demás procesos. Lo anterior permite suponer que mediante la optimización del proceso en general, es posible lograr mejores resultados, y de esta manera hacerlo más competitivo.

En términos generales, el proceso de purificación desarrollado en el laboratorio resulta interesante principalmente por el método de recuperación de la enzima. Debido a que es rápido, de fácil control y no afecta la estabilidad de la enzima. Otra de las ventajas que presenta, es que puede ser aplicado directamente al homogenado celular (obtenido después de la extracción de la enzima) y de esta manera evitar un paso de centrifugación en el proceso.

Finalmente, podemos concluir que mediante el proceso de purificación desarrollado fué posible obtener una solución de la fenilalanina amonio-liasa con las características apropiadas (estabilidad, pureza) para ser inmovilizada por enlace covalente.

7. Caracterización cinética y fisicoquímica de la enzima parcialmente purificada

Las propiedades cinéticas y fisicoquímicas de la enzima PAL de *S. pararoeseus* han sido previamente determinadas en células completas [14]; a continuación, se describe la caracterización de la enzima soluble, parcialmente purificada.

7.1 pH y Temperatura óptimos de reacción

Con la finalidad de determinar el valor de pH óptimo para la reacción de desaminación catalizada por la enzima, se determinó la actividad bajo diferentes condiciones de pH en un rango de 7 a 10.5. En la Figura 14, se presenta el perfil de actividad de la enzima soluble en función del pH de la solución.

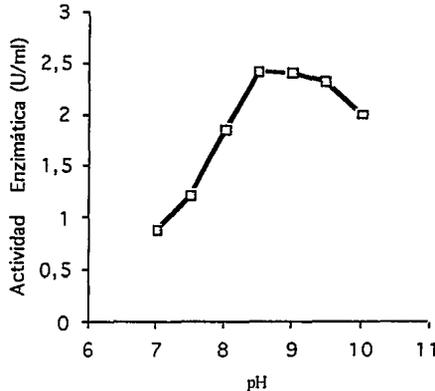


FIGURA 14. Efecto del pH en la actividad de la enzima fenilalanina amonioniasa. Los ensayos se llevaron a cabo en Tris-HCl 50 mM, con 0.0074 U/ml de enzima y 5 mM de fenilalanina.

La mayor actividad de la enzima se obtiene en medio alcalino. El pH óptimo de reacción encontrado para enzima soluble se encuentra en el rango de 8.5 a 9.0 semejante al determinado en células completas (8.8).

Para determinar la temperatura óptima de reacción de la enzima soluble, se determinó la actividad de la enzima en un rango de temperatura de 30 a 75 °C. En la Figura 15 se presenta el perfil de actividad en función de la temperatura, donde puede observarse que la temperatura óptima se encuentra alrededor de los 65 °C. Dicho parámetro fué diferente a lo reportado para la enzima de células completas (50 - 55 °C) lo que resulta interesante desde el punto de vista de su aplicación industrial.

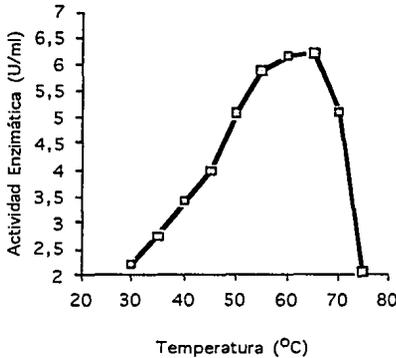


FIGURA 15. Efecto de la temperatura en la velocidad de reacción de la enzima fenilalanina amonio-liasas parcialmente purificada. En el ensayo se utilizaron 0.0074 U/ml de enzima, fenilalanina 4.2 mM en Tris-HCl 50 mM pH 8.5.

Por otra parte se calculó la energía de activación a partir de los datos de actividad y temperatura de acuerdo a la gráfica de Arrhenius (Figura 16) obteniéndose un valor de 7809 cal/mol.

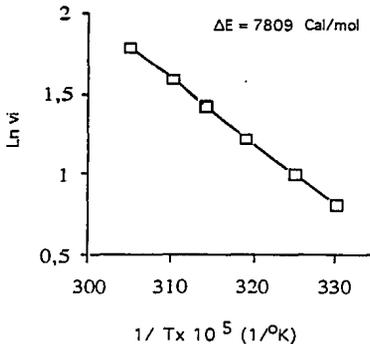


FIGURA 16. Representación gráfica de la ecuación de Arrhenius para la enzima fenilalanina amonio-liasas de la levadura *S. parvoseus*.

7.2 Parámetros cinéticos

En la caracterización cinética de la enzima se efectuó primeramente la medición de velocidades de reacción a diferentes concentraciones de sustrato; posteriormente se hizo el procesamiento de los datos experimentales y el ajuste al modelo cinético de Michaelis-Menten.

Para la evaluación de los parámetros cinéticos K_m y V_{max} del modelo de Michaelis-Menten, se fijó una concentración de enzima parcialmente purificada de 0.01123 mg/ml en el medio de reacción y se utilizó un intervalo de concentración de fenilalanina que va de 0.10 mM a 10 mM. Aunque la temperatura optima de reacción fué de 65 °C, los parámetros cinéticos fueron determinados a 30°C y 40°C por los problemas de estabilidad de la enzima. Se evaluaron las diferentes velocidades de reacción en los experimentos y se refirieron a la cantidad de enzima presente (U/mg de proteína). En la Tabla 13 se presentan los valores de velocidad inicial de la enzima fenilalanina amonio-liasa a diferentes concentraciones de sustrato.

TABLA 13
Velocidades de reacción de la fenilalanina amonioliasa, a diferentes concentraciones de fenilalanina*.

S* (mM)	Vo ($\mu\text{mol} / \text{min} \cdot \text{mg}$ proteína)	
	30 °C	40 °C
0.1	0.333	0.394
0.25	0.515	0.745
0.5	0.707	1.038
0.75	0.873	1.264
1	0.971	1.526
1.5	1.104	1.675
2	1.163	1.781
4	1.434	2.162
6	1.45	2.461
10	1.536	2.627

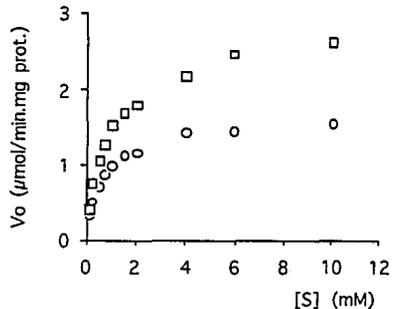


FIGURA 17. Gráfica de la cinética de la enzima fenilalanina amonio-liasa correspondiente a los datos de la Tabla 13. (O) 30 °C y (□) 40 °C

En la Figura 17 se presenta el efecto de la concentración de sustrato en la velocidad de reacción inicial de la enzima fenilalanina amonio-liasa. Como puede observarse los datos experimentales describen una cinética de tipo Michaelis-Menten.

Los datos experimentales de la Tabla 13 se presentan en la Fig 18, se procesaron con el fin de obtener los parámetros cinéticos a través de la linearización de los datos, de acuerdo a la ecuación de Lineaweaver-Burk: $1/v = K_m/V_{max} (1/[S]) + 1/V_{max}$.

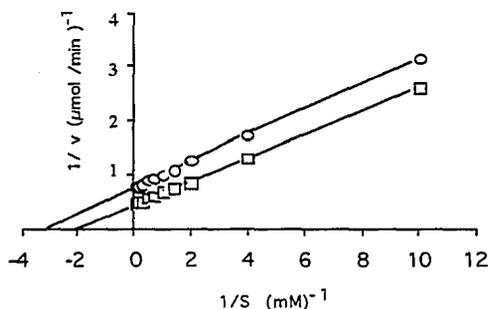


FIGURA 18. Gráfica de linearización de la ecuación de Michaelis-Menten según el modelo de Lineaweaver Burk. (O) 30 °C y (□) 40 °C

Los valores para V_{max} y K_m son respectivamente: $1.320 \mu\text{mol}/\text{min mg}$ proteína y 0.3142 mM a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ y $2.266 \mu\text{mol}/\text{min mg}$ proteína y 0.485 mM a $40 \text{ }^\circ\text{C}$; dichos valores se encuentran en el mismo orden de magnitud que los reportados para la enzima de algunas otras fuentes (Tabla 2). En la Tabla 14, se presenta un resumen de los resultados obtenidos sobre la caracterización fisicoquímica y cinética de la enzima fenilalanina amonio-liasa parcialmente purificada, así como los reportados para la enzima de células completas.

TABLA 14
Constantes cinéticas de la enzima fenilalanina amonio-liasa de *S. paraseus*.

Enzima	pH óptimo de reacción	Temperatura óptima de reacción	Km (mM)		Energía de activación (ΔE)
			30 °C	40 °C	
PAL de <i>S. paraseus</i> parcialmente purificada	8.5-9.0	65 °C	0.3142	0.4850	7809 cal/mol
PAL de Células completas de <i>S. paraseus</i> .*	8.8	50 - 55 °C		0.484	6870 cal/mol

* [14]

8. Inmovilización de la enzima fenilalanina amonio-liasa

Con la finalidad de incrementar la estabilidad y vida operacional de la enzima fenilalanina amonio-liasa de *S. parvoseus* y poder usarla como catalizador en procesos continuos, se decidió inmovilizarla por enlace covalente a dos soporte enzimáticos: sílica porosa activada con glutaraldehído (Spherosil), y EUPERGIT C una resina oxirano-acrítica, ambos reportados para la inmovilización de enzimas [39,44].

8.1. Inmovilización en sílica porosa (Spherosil).

El área específica de la sílica, es un parámetro importante a considerar para la inmovilización con este tipo de soporte enzimático; para muchas enzimas, el área específica óptima se encuentra en un rango de 30-100 m²/g. A mayor área específica de superficie, se tienen tamaños de poro más pequeños y por lo tanto existe un tamaño límite a partir del cual se presentan problemas difusionales importantes tanto en el proceso mismo de inmovilización como en el proceso de conversión del sustrato. [39]

La fenilalanina amonio-liasa fué inmovilizada en sílica de diferentes porosidades. La inmovilización de la enzima se llevó a cabo de acuerdo al procedimiento descrito en materiales y métodos en presencia de glicerina al 20 % como agente estabilizante. Para cada caso, 100 mg de sílica se pusieron en contacto con 8 ml de una preparación de enzima parcialmente purificada conteniendo 0.125 U/ml.

Los parámetros evaluados en éste método de inmovilización fueron: la actividad de la enzima inmovilizada al soporte reportada como actividad específica (U/gramo de catalizador base seca), la carga de proteína, la eficiencia específica de inmovilización y la eficiencia global de inmovilización.

La eficiencia específica de inmovilización representa la actividad que expresa la enzima unida al soporte y representa el % de la actividad que desaparece del medio de reacción después de un período de inmovilización. Dicho parámetro se calculó con la siguiente ecuación:

$$\text{Eficiencia específica (\%)} = \frac{AES}{ATS} \times 100 \quad \text{EC. 6}$$

Donde:

AES = actividad enzimática medida experimentalmente en el soporte después de la inmovilización (U totales).

ATS = actividad enzimática teóricamente inmovilizada, basada en la desaparición de enzima del sobrenadante (U totales).

La eficiencia global de inmovilización representa el % de la actividad inicial (que se enfrenta al soporte) que se expresa en forma inmovilizada y se calcula con la siguiente ecuación:

$$\text{Eficiencia global (\%)} = \frac{A_{\text{soporte}}}{A_{\text{inicial}}} \times 100 \quad \text{EC. 7}$$

Donde:

A_{soporte} = actividad enzimática medida experimentalmente en el soporte después de la inmovilización (U totales).

A_{inicial} = actividad enzimática que se enfrenta al soporte (U totales).

En la Figura 19 se presentan los resultados obtenidos de la inmovilización utilizando sílicas de diferente área específica (6, 122 y 445 m^2/g). Donde se puede constatar que para la inmovilización de la enzima fenilalanina amonio-liasa se requiere de una sílica de baja área específica.

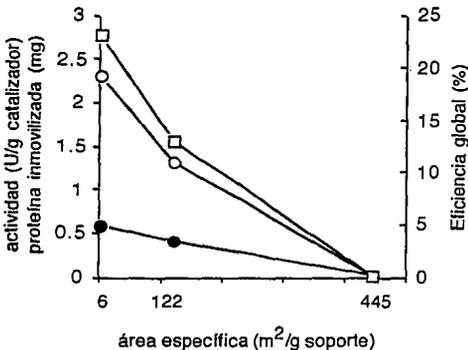


FIGURA 19. Efecto del área específica, sobre la expresión y actividad de la enzima fenilalanina amonio-liasa inmovilizada. (○) actividad del catalizador; (●) proteína inmovilizada y (□) % de expresión de la enzima inmovilizada.

Al analizar la Fig 19 y Tabla 15 donde se presenta un resumen de los resultados obtenidos en este experimento, se desprenden las siguientes conclusiones: a) el soporte más adecuado es el de menor área específica, pues permite obtener 2.3 U/g catalizador; b) Al incrementar el área a 122 m^2/g se inmoviliza menos proteína pero más enzima, lo que puede deberse a diferencias en el tamaño de estas (la enzima puede inmovilizarse en el interior de la partícula pero las proteínas contaminantes no). Sin embargo la eficiencia específica es muy baja, pues la enzima inmovilizada al interior no es activa probablemente por algún bloqueo del sitio activo.

TABLA 15
Efecto del área específica en la inmovilización de la fenilalanina
amonio-liasa en sílica porosa

Área Específica (m ² /g)	Proteína Inmovilizada ^a (mg) (%)		Actividad teórica inmovilizada ^b (U/totales) (%)		Actividad Específica (U/g catalizador)	Eficiencia específica (%)	Eficiencia global (%)
6	0.58	44.6	0.24	24.0	2.3	95.8	23.0
122	0.40	30.7	0.46	46.0	1.3	28.2	13.0
445	N.D		0	0	0	0	0

En todos los casos se utilizaron 100 mg de sílica: se enfrentaron con 1 Unidad total equivalente a 1.3 mg de proteína.

a) Diferencia de concentración de proteína en el sobrenadante;

b) Calculada a partir de la actividad que desaparece del sobrenadante después de la inmovilización.

La reacción se llevó a cabo en un volumen de 8 ml

En un segundo experimento se estudió el efecto que tiene la carga de enzima sobre la actividad de la enzima inmovilizada y la eficiencia específica de inmovilización, inmovilizando a la enzima en sílica porosa de 6 m²/g de área específica. Como se puede observar en la Tabla 16 la concentración de proteína y la carga de enzima son dos variables importantes que afectan la actividad específica del catalizador y la eficiencia global de inmovilización. Es importante resaltar que éste método de inmovilización bajo las mejores condiciones ensayadas no afecta significativamente la estabilidad de la enzima y que la actividad no inmovilizada puede ser reutilizada en una segunda reacción de inmovilización, como lo muestra la alta eficiencia específica (95.8 %).

TABLA 16
Efecto de la concentración de proteína en la inmovilización de la fenilalanina
amonio-liasa en sílica porosa (6 m²/g)

Proteína (mg)	Actividad inicial (U totales)	Actividad Específica (U/mg proteína)	Proteína Inmovilizada ^a (mg) (%)		Actividad teórica inmovilizada ^b (U/totales) (%)		Actividad Específica (U/g catalizador)	Eficiencia específica (%)	Eficiencia global (%)
0.3	0.31	1.05	0.24	80.0	0.16	51.6	0.06	37.5	19.0
0.5	0.52	1.05	0.23	46.0	0.19	36.5	1.14	60.0	22.0
1.3	1	0.77	0.58	44.6	0.24	24.0	2.3	95.8	23.0

En todos los casos se utilizaron 100 mg de sílica

a) Diferencia de concentración de proteína en el sobrenadante

b) Calculada a partir de la actividad que desaparece del sobrenadante después de la inmovilización.

La reacción se llevó a cabo en un volumen de 8 ml.

8.2. Inmovilización en una resina oxirano-acrífica (EUPERGIT C)

Uno de los parámetros de mayor importancia en el acoplamiento de proteínas con la resina oxirano acrílica (EUPERGIT C) es la concentración de fosfatos en el medio de reacción. La literatura reporta que para la inmovilización de la enzima penicilino acilasa en VA-Epoxi BIO-SINTH, soporte enzimático que presenta el mismo grupo espaciador que EUPERGIT C, la concentración y el pH del amortiguador de fosfatos que se emplea durante el acoplamiento de la enzima influyen sobre la actividad específica del catalizador obtenido [45]. A más bajas concentraciones de fosfatos (0.5 M), la actividad del catalizador de penicilino acilasa depende fuertemente del pH, mientras que a concentraciones altas (1.5 M) se vuelve independiente. En la técnica de inmovilización con EUPERGIT C se recomienda llevar a cabo la reacción de inmovilización en amortiguador de fosfatos 1M, pH 8 y a temperatura ambiente. Con la finalidad de encontrar las mejores condiciones para el acoplamiento de la fenilalanina amonio-liasa a la resina epoxiacrílica, se estudió el efecto de la concentración de fosfatos en la actividad y expresión de la enzima inmovilizada. La enzima fenilalanina amonio-liasa fué inmovilizada a diferentes concentraciones de fosfatos y en presencia de glicerina al 20% como agente estabilizante. En cada caso se utilizaron 100 mg de EUPERGIT C de 24-48 m²/g de área específica. Los resultados obtenidos se presentan en la Fig 20, donde se puede observar que los mejores resultados de actividad específica y eficiencia global se obtienen cuando se trabaja con una concentración de fosfatos 0.5 M durante la inmovilización de la enzima.

Un resumen más detallado de estos resultados se presenta en la Tabla 17. En esta se puede constatar que a concentraciones de fosfatos menor o mayor a 0.5 M se obtienen catalizadores con una menor actividad específica, lo cual demuestra la importancia que tiene la concentración del amortiguador de fosfatos (ó fuerza iónica) en la eficiencia global de inmovilización y actividad de la enzima fenilalanina amonio-liasa inmovilizada.

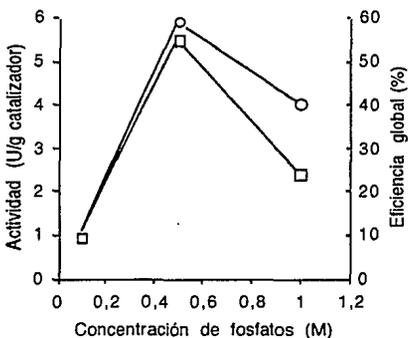


FIGURA 20. Efecto de la concentración de fosfatos en la actividad específica de la enzima fenilalanina amonio-liasa inmovilizada en EUPERGIT C. (○) actividad del catalizador; (□) eficiencia global.

TABLA 17
Inmovilización de la fenilalanina amonio-*liasa* por enlace covalente
en una resina oxirano-acrítica

Concentración de Fosfatos (M)	Proteína (mg)	Actividad inicial (U)	Proteína Inmovilizada ^a (mg)	Proteína Inmovilizada ^a (%)	Actividad teórica inmovilizada ^b (Utotales) (%)	Actividad Especifica (U/g soporte)	Eficiencia especifica (%)	Eficiencia global (%)	
0.1	1.3	1	0.87	67.0	0.37	37.0	0.96	26.0	9.6
0.5	1.3	1	1.0	77.0	0.76	76.0	5.48	72.1	54.8
0.5	1.8	1.7	1.35	75.0	1.20	70.6	5.88	49.0	34.6
1	1.8	1.7	0.80	44.0	0.91	53.5	4.04	44.4	23.7

En todos los casos se utilizaron 100 mg de EUPERGIT C.

a) Diferencia de concentración de proteína en el sobrenadante

b) Calculada a partir de la actividad que desaparece del sobrenadante despues de la inmovilización.

La reacción se llevó a cabo en un volumen de 8 ml.

En este método de inmovilización, la actividad específica del catalizador es independiente de la carga de enzima utilizada en la reacción de acoplamiento. Lo anterior se estudió cuando se enfrentaron 1U y 1.7 U con 100 mg de soporte respectivamente, utilizando la misma concentración de fosfato en el medio de reacción (Tabla 17).

Sin duda alguna para el caso particular de la inmovilización de fenilalanina amonio-*liasa* en EUPERGIT C, la concentración del amortiguador de fosfatos utilizada para la inmovilización es un parámetro importante a considerar en este método.

8.3. Estabilidad de la enzima inmovilizada

8.3.1. Estabilidad operacional

Los catalizadores de la enzima fenilalanina amonio-liasas, obtenidos por inmovilización en Spherosil y EUPERGIT C, fueron sometidos a un estudio de estabilidad operacional. Se realizaron 15 reacciones en lotes de 25 minutos a 30 °C con ambos catalizadores. Después de cada lote de reacción, el catalizador fué lavado con suficiente Tris-HCl 0.1 M, pH 8.5 antes de iniciar un nuevo lote de reacción. Los resultados obtenidos de este estudio se presentan en la Figura 21.

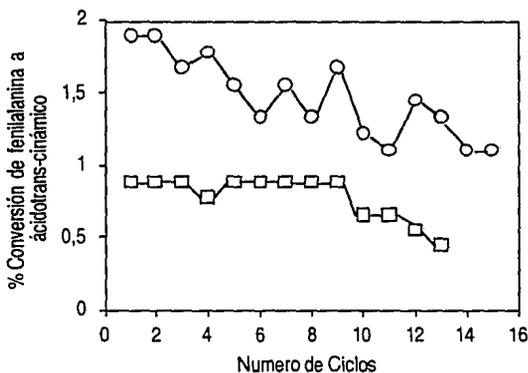


FIGURA 21. Estabilidad operacional de los biocatalizadores de PAL. Se desarrollaron 15 lotes de reacción (de 25 minutos) con 1.25 % (p/v) de fenilalanina en Tris-HCl 0.1 M pH 8.5, a 30 °C. (○) enzima inmovilizada en EUPERGIT C, 0,03 g peso húmedo y 1.895 U/g de actividad específica; (□) enzima inmovilizada en Spherosil, 0.0596 g peso húmedo y 0.450 U/g catalizador.

En esta figura se puede observar que la fenilalanina amonio-liasas inmovilizada en EUPERGIT C, a partir del segundo lote de reacción se desactiva gradualmente y alcanza la vida media a los 15 lotes (5.40 horas de reacción). Por el contrario la enzima inmovilizada en sílica porosa, mantiene el mismo grado de conversión durante los primeros 9 lotes, y posteriormente comienza a desactivarse. El modelo de desactivación de la enzima inmovilizada en Spherosil no es claro, ya que después de mantener el mismo grado de conversión durante 3.75 h. sufre una desactivación drástica en los siguientes 25 minutos de reacción. Es pro-

bable que dicha caída de actividad se deba a la presencia de un contaminante (no identificado, de tipo microbiano) en la mezcla de reacción o durante el lavado del soporte. Sin embargo, si analizamos la estabilidad operacional de la enzima inmovilizada durante los primeros ciclos de reacción, podemos suponer que el enlace a la sílica porosa (Spherosil) le confiere una mayor estabilidad a la fenilalanina amonio-liasa que al EUPERGIT C.

8.3.2. Estabilidad en almacenamiento.

Se estudió el efecto del almacenamiento en la estabilidad de la enzima inmovilizada coincidiendo con los resultados obtenidos previamente. En la Fig. 22 se describe gráficamente el cambio de actividad de la enzima inmovilizada durante su almacenamiento a 4 °C y en presencia de glicerina.

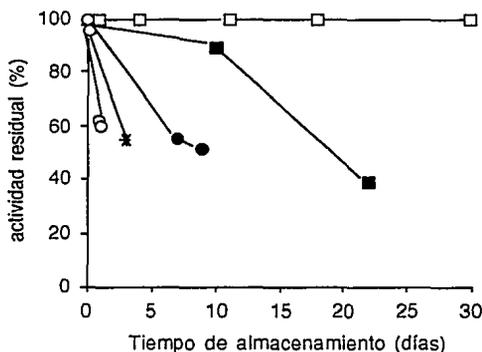


FIGURA 22. Estabilidad de la enzima fenilalanina amonio-liasa de *S. parvoseus* durante el almacenamiento a 4 °C. (●) células completas; (#) enzima purificada; (□) enzima purificada en presencia de glicerina al 20%; (■) enzima inmovilizada en sílica, en presencia de glicerina al 20%; (○) enzima inmovilizada en EUPERGIT C, en presencia de glicerina al 20%.

Estos resultados confirman la hipótesis sobre la mayor estabilidad que se obtiene con el derivado de fenilalanina amonio-liasa en el soporte de sílica (Spherosil). La vida media de los catalizadores en almacenamiento, calculada a partir de la Fig. 22, es aproximadamente de 50 horas para la enzima inmovilizada en EUPERGIT C, y de 470 horas para la enzima inmovilizada en Spherosil. Sin embargo, a pesar de haber logrado expresar la actividad de la enzima en ambos soportes enzimáticos, no se logró estabilizarla totalmente mediante el proceso de inmovilización.

9. Catalizadores enzimáticos con actividad de fenilalanina amonio-liasa

De los estudios de inmovilización realizados, fué posible obtener dos catalizadores con actividad de fenilalanina amonio-liasa, mediante la unión covalente a dos soportes comerciales (Spherosil y EUPERGIT C). A continuación se presenta un análisis de los catalizadores obtenidos bajo las condiciones de inmovilización probadas.

9.1. Estudio comparativo de los catalizadores

La comparación de los catalizadores está basada en términos de: proteína inmovilizada (mg de enzima parcialmente purificada/gramo de soporte), eficiencia global de inmovilización, la actividad específica, estabilidad al almacenamiento y operacional del catalizador y finalmente el costo del soporte. En la Tabla 18 se presenta un resumen de algunas de las propiedades de los catalizadores.

TABLA 18
Propiedades de los catalizadores enzimáticos de fenilalanina amonio-liasa

SOPORTE ENZIMATICO	Proteína inmovilizada (mg/g soporte)	Eficiencia específica (%)	Eficiencia Global (%)	Actividad Específica (U/ g catalizador)	t _{1/2} (hr) operacional ¹	t _{1/2} (hr) en almacenamiento ²	Costo
SPHEROSIL	5.83	95.8	23	2.3	5.4	470	Regular
EUPERGIT C	10 - 13.5	72.1	54.8	5.48	6.25	50	Alto

1) Valores experimentales; 2) Extrapolados de la figura 22

En términos generales el EUPERGIT C resultó ser más eficiente que el Spherosil: la capacidad de retención de proteína por gramo de soporte, la eficiencia global de inmovilización y la actividad específica del catalizador. En particular se alcanza una actividad específica de 5.48 U/g de catalizador, 50 % más alta que en el caso de Spherosil. De las variables anteriormente analizadas se tiene en todos los casos alrededor de un 50% más de eficiencia comparado con los resultados obtenidos con el Spherosil. Sin embargo, el objetivo principal que se busca con el proceso de inmovilización es la estabilización de la enzima. En este sentido el Spherosil resultó ser el más apropiado, ya que de los resultados de estabilidad al almacenamiento de los catalizadores, resulta claro que éste último le confiere una mayor estabilidad a la enzima. Con respecto a la estabilidad durante el proceso de conversión, la enzima inmovilizada en Spherosil fué también más estable en los primeros ciclos de reacción durante el estudio de estabilidad operacional realizado. Sin embargo, como ya se comentó

anteriormente, esta se desactiva por alguna razón, pero aparentemente ajena al proceso de inmovilización. Otra ventaja del método de inmovilización en sílica es que la eficiencia específica, es decir el grado de expresión de la enzima inmovilizada, es mayor al obtenido con el EUPERGIT C. Finalmente comparando los costos de ambos soportes la sílica porosa (SPHEROSIL) es de mayor disponibilidad que la resina oxirano-acrílica EUPERGIT C.

9.2. Aplicaciones potenciales de la enzima inmovilizada

9.2.1. Producción de productos con bajo contenido de fenilalanina

Una de las reacciones de interés principal de la fenilalanina amonio-liasa es la desaminación de fenilalanina para la producción de alimentos bajo en el contenido de fenilalanina. Para este caso en particular, se pretende incorporar la enzima en forma inmovilizada a un proceso donde el sustrato es una proteína hidrolizada obtenida por el tratamiento enzimático de caseína. Kawasaki, *et al.* [14] simularon el tratamiento de hidrolizados de caseína, en términos de conversión de fenilalanina y tirosina con la fenilalanina amonio-liasa de *Sporidiobolus pararoseus*. Los resultados de la simulación indican que para una reducción del 90% de fenilalanina del hidrolizado en un tiempo de reacción razonable (3-4 horas), se requieren de 0.5 U/ml de actividad enzimática debido a la presencia de tirosina.

En la Tabla 19, se presenta un resumen de la carga enzimática de los diferentes catalizadores de fenilalanina amonio-liasa necesaria para alcanzar el mismo grado de conversión de fenilalanina presente en un hidrolizado de caseína. Como se puede observar, el utilizar como catalizador la fenilalanina amonio-liasa de la cepa *S. pararoseus* en el proceso antes descrito, implica cargas elevadas en el reactor tanto de células inmovilizadas como de enzima inmovilizada (en EUPERGIT C y Spherosil).

TABLA 19.
Cantidad de soporte requerido para la desaminación de fenilalanina presente en hidrolizados de caseína con la enzima inmovilizada.

CATALIZADORES	Actividad Específica (U/ g soporte)	Carga de Soporte (g catalizador //)
Células inmovilizadas por atrapamiento en agar*	4.95	101
Enzima inmovilizada en SPHEROSIL	2.3	217.4
Enzima inmovilizada en EUPERGIT C	5.48	91.2

* Catalizador que teóricamente podría obtenerse, por el atrapamiento de células permeabilizadas en agar; suponiendo que no se tienen problemas difusionales.

Lo anterior se debe en gran parte a que la velocidad de conversión de esta enzima es baja. Por otra parte es necesario considerar que a pesar de que se cuenta con una enzima más estable, ésta es sin embargo desactivada durante la operación, lo que ocasionaría un incremento en el tiempo de reacción.

9.2.2. Síntesis de fenilalanina a partir de ácido *trans*- cinámico y amonio

La síntesis del aminoácido armático L-fenilalanina vía fenilalanina amonio-liasa es otra de las alternativas de uso para la aplicación de los catalizadores de la enzima inmovilizada. Omdorff *et al.* [41] reportan que para este proceso utilizando células libres de *R. graminis* GX6000 (cepa mutante), se requiere de aproximadamente 800 U/l de actividad para alcanzar un título de 50 g/l de L-fenilalanina (86% de conversión) en un tiempo aproximado de 88 h. La actividad residual de las células después de 90 hr de reacción, fué de 35 a 40 %, de la actividad inicial. Como se puede observar, los requerimientos del catalizador para este proceso comparados con el proceso de desaminación del aminoácido son mayores, en términos de actividad y estabilidad para llevar a cabo la reacción de síntesis.

9.2.3. Cuantificación de fenilalanina y tirosina

Otra de las aplicaciones de la enzima inmovilizada sería en la cuantificación de fenilalanina y tirosina, aprovechando que la enzima posee actividad sobre ambos aminoácidos. El método propuesto por Ron-Sen, *et al.* [9] espectrofotométrico para la cuantificación simultánea de fenilalanina y tirosina en plasma via fenilalanina amonio-liasa, requiere solamente de 25 μ l de plasma previamente heparinizado y 0.02 unidades de actividad, el procedimiento se lleva a cabo en un período de 20 minutos. Lo anterior nos hace pensar en la posibilidad de utilizar nuestros catalizadores en este método de cuantificación, ya que los requerimientos de la reacción en cuanto a la actividad y tiempo necesarios para llevar a cabo dicha reacción se ajustan a las propiedades que presentan nuestros catalizadores. Para esta aplicación, existe la posibilidad de diseñar un biosensor con la enzima inmovilizada e integrarlo a un sistema de detección.

CONCLUSIONES

Se establecieron las condiciones preliminares de cultivo y el tiempo de fermentación para la producción de fenilalanina amonio-*liasa* de *S. parvoseus*. A nivel laboratorio las mejores condiciones en fermentador de 2 l fueron: 600 rpm, 0.30 VVM de aireación, pH inicial de 5.5 sin control durante la fermentación y 30 °C de temperatura. A escala piloto la producción se llevó a cabo en fermentadores de 14 l bajo las siguientes condiciones de cultivo: 400 rpm, 0.5 VVM a la misma temperatura y sin control de pH durante la fermentación. El tiempo de fermentación fué de 16 h y 13 h respectivamente, suspendiendo la aireación después de alcanzar el nivel máximo de actividad y cosechando las células inmediatamente después, para evitar en lo posible la desactivación de la enzima. De esta manera fué posible alcanzar los mismos niveles de actividad obtenidos a nivel de matraz (alrededor de 30 U/g célula).

Se desarrolló un proceso para la purificación parcial de la enzima fenilalanina amonio-*liasa* que involucra tres operaciones: extracción de la enzima por molienda de células en molino de perlas, recuperación de la enzima a partir del extracto celular por precipitación ácida y purificación por cromatografía de intercambio iónico. La ruptura celular se realizó en molino de perlas Tipo DYNO-MILL utilizando una concentración celular de 120 g/l y tiempo de residencia de 20 minutos. Bajo estas condiciones se recuperó el 90% de la actividad intracelular, sin afectar la estabilidad de la enzima.

Se propone a la precipitación ácida como una alternativa a los procesos existentes para la recuperación de la enzima a partir del extracto celular. Dicho procedimiento presentó varias ventajas con respecto a la precipitación con sales: es un método rápido, no afecta la estabilidad de la enzima (se recupera el 100% de la actividad al final del tratamiento) y se obtiene una solución de enzima con un menor número de impurezas libre de pigmentos carotenoides. Esto último es importante cuando la fuente de enzima produce como parte de su metabolismo compuestos carotenoides, la cual es común en algunas levaduras productoras de fenilalanina amonio-*liasa*.

La cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sephacel como una etapa de alta resolución en el proceso de purificación, se desarrolló en presencia de glicerina al 20% como agente estabilizante de la enzima. Mediante esta técnica la fenilalanina amonio-*liasa* fué aislada de manera eficiente con un alto grado de pureza (alrededor del 90%) y un rendimiento del 80% superior al de los procesos reportados en la literatura (17 al 48 %).

La fenilalanina amonio-liasa fué estabilizada durante y después de la cromatografía de intercambio iónico mediante el uso de glicerina al 20%, este alcohol polihídrico mostró un efecto positivo sobre la estabilidad de la enzima. Cuando la enzima parcialmente purificada se almacena a 4 °C en una solución amortiguadora de Tris-HCl presenta una vida media de 3 días, mientras que en presencia de glicerina al 20 % y almacenada bajo las mismas condiciones retiene el 100% de su actividad durante un mes. Mediante el proceso de purificación desarrollado fué posible obtener una solución enzimática de fenilalanina amonio-liasa con la características apropiadas (estabilidad y pureza) para ser inmovilizada por enlace covalente.

La enzima fenilalanina amonio-liasa de *S. parvoseus* parcialmente purificada fué caracterizada desde el punto de vista cinético y fisicoquímico. El pH y temperatura óptimos de reacción fueron: pH 8.5 a 9.0 y 65 °C respectivamente. Los estudio cinéticos de la enzima demostraron que la reacción obedece el modelo de Michaelis-Menten. Las constantes cinéticas K_m y V_{max} calculadas a partir de los datos de velocidad inicial de acuerdo a la ecuación de Lineaweaver-Burk son: 1.32 $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ de proteína y 0.3142 mM a 30 °C, y 2.266 $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ de proteína y 0.485 mM a 40°C, respectivamente.

La enzima parcialmente purificada se inmovilizó por enlace covalente a dos soportes enzimáticos: EUPERGIT C y Spherosil, obteniéndose en ambos casos catalizadores con actividad de fenilalanina amonio-liasa. Cuando se almacena a 4 °C y en presencia de glicerina (20%) la enzima inmovilizada en EUPERGIT C presenta una vida media de 2 días y en Spherosil de 20 días. Esta vida media es baja comparada con la enzima libre parcialmente purificada y almacenada bajo las mismas condiciones. Comparando los dos soportes enzimáticos el Spherosil le confiere una mayor estabilidad a la enzima tanto en almacenamiento como en operación. De acuerdo a las propiedades generales de los catalizadores obtenidos, en términos de actividad específica y estabilidad operacional; la aplicación más viable sería en la cuantificación de fenilalanina y tirosina.

Como conclusión general se puede afirmar que se cumplieron los objetivos iniciales del proyecto, aportando un nuevo proceso rápido y efectivo para la purificación de la enzima fenilalanina amonio-liasa. La estabilidad de la enzima sigue siendo un cuello de botella. Se abren perspectivas alentadoras en el uso del biocatalizador de la fenilalanina amonio-liasa inmovilizada por enlace covalente, en el área del diagnóstico de fenilalanina y tirosina.

BIBLIOGRAFIA

1. HAMILTON, B.K., HSIAO, H.Y., SWANN, W.E., ANDERSON, D.M. and DELENTE, J.J. (1985). Manufacture of L-amino acids with bioreactors. *Trends in Biotechnology* . Vol. 3 (3): 64-68.
2. HOSKINGS, J.A., STARR, D.J.T. and STERN, J. (1980). Enzymatic control of phenylalanine intake in phenylketonuria. *The Lancet* . 1(8165): 392-394.
3. KLEIN, M.D and LANGER, R. (1986). Immobilized enzymes in clinical medicine: an emerging approach to new drug therapies. (1986). *TIBTECH* . July :179-185.
4. 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* . Vol. 141(1): 165-170.
5. BOURGET, L. and CHANG, M.S T. (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.
6. AMBRUS, C.M., SHARMA, S.D., HORVATH, C., KALGHATGI, K., ANTHONE, S., AMBRUS, J.L., COOLEY, C., and MIRAND, E.A. (1983). In vivo safety of hollow fiber enzyme-reactors with immobilized phenylalanine ammonia-lyase in a large animal model for phenylketonuria. *The J. Pharmacol. Exp. Ther.* Vol. 224(3): 598-602.
7. AMBRUS, C.M., AMBRUS, J.L., HORVATH, C., PEDERSEN, H., SHARMA, S., and KANT, C. (1978). Phenylalanine depletion for the management of phenylketonuria: use of enzyme reactors with immobilized enzymes. *Science*. Vol. 201: 837-839.
8. ABELL C.W., HODGINGS, D.S. and STITH W.S. (1973). An in vivo evaluation of the chemotherapeutic potency of phenylalanine ammonia-lyase. *CANCER RESEARCH* . Vol. 33: 2529-2532.
9. RONG-SEN, S. and CREED, W.A. (1977). Phenylketonuria: A new method for the simultaneous determination of plasma phenylalanine and tyrosine. *Science*. Vol. 197: 665-667.
10. 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* . Vol. 42(5): 773-778.
11. EVANS, C.T., HANNA, K., PAYNE, C., CONRAD D. and MISAWA, M. (1986). Biotransformation of *trans*-cinnamic acid to L-phenylalanine: optimization of reaction conditions using whole yeast cell. *Enzyme Microbiol. Technol.* Vol. 9:417-421.
12. EVANS, C.T., CONRAD, D, HANNA, K. PETERSON, W., CHONA, C. and MISAWA, M. (1987). Novel stabilization of phenylalanine ammonia-lyase catalyst during bioconversion of *trans*-cinnamic acid to L-phenylalanine. *App. Microb. Biotechnol.* Vol. 25: 399-405.

13. LOPEZ-BAJONERO, L.J., LARA-CALDERON, P., GALVEZ-MARISCAL, A., VELAZQUEZ-ARELLANO, A. and LOPEZ-MUNGUIA, A. (1991). Enzymatic production of a low-phenylalanine product from skim milk powder and caseinate. *J. of Food Sci.* Vol. 56(4): 938-942.
14. KAWASAKI, W.S., HERNANDEZ-VELAZCO, F.G., and LOPEZ-MUNGUIA, A. (1992). Phenylalanine ammonia-lyase from *Sporidiobolus pararoseus* and *Rhodospiridium toruloides* : application for phenylalanine and tyrosine deamination. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* . Vol. 8: 406-410.
15. GARCIA, G.M., QUINTERO R.R., y LOPEZ-MUNGUIA C.A. (1993). Biotecnología Alimentaria. *Editorial Limusa* . 103-124.
16. TAYLOR, R. (1993). Expanding Applications in the Food Industry for Immobilized Enzymes. *Genetic Engineering News* Vol. 13 (3): 5
17. WARD, O.P. and MOO-YOUNG M. (1988). Thermostable enzymes. *Biotech. Adv.* , Vol. 6: 39-69
18. JAENICKE, R. (1991). Protein stability and molecular adaptation to extreme conditions . *Eur. J. Biochem.* , Vol 202: 715-728.
19. KRISTJANSSON, M.M. and KINSELLA, J.E. (1991). Protein and enzyme stability: Structural, thermodynamic, and experimental aspects. *Adv. Food Nutr. Res.* , Vol. 35: 237-316.
20. MOZHAEV, V.V. and MARTINEK K. (1984). Structure-stability relationships in proteins: new approaches to stabilizing enzymes. *Enzyme Microb. Technol.* Vol. 6: 50-59.
21. MONSAN, P. and COMBES, D. (1988). Enzyme stabilization by immobilization. *Methods Enzymol.* Vol. 137: 584-598.
22. DIXON, M. and WEBB, E.C. (1979). *Enzymes*. 3rd Edn. (London: Longman), 229,265.
23. ØRUM, H. and RASMUSSEN, F.O. (1992). Expression in *E. coli* of the gene encoding phenylalanine ammonia-lyase from *Rhodospiridium toruloides* . *Appl. Microbiol. Biotechnol.* Vol. 36:745-748.
24. ABELL C.W and SHEN R. (1987). Phenylalanine ammonia -lyase from the Yeast *Rhodotorula glutinis* . *Methods in Enzymology* . Vol. 142:242-251.
25. HODGINS S.D. (1971). Yeast Phenylalanine Ammonia-lyase: Purification, properties, and the identification of catalytically essential dehydroalanine. *J. Biol. Chem.* Vol. 246: 2977-2985.
26. OGATA, K., UCHIYAMA, K., YAMADA, H. and TOCHIKURA, T. (1967). Metabolism of Aromatic Amino acid in Microorganisms. Part. II. Properties of Phenylalanine Ammonio-lyase of *Rhodotorula* . *Agr. Biol. Chem.* , Vol. 31(5): 600-606.
27. PARKHURST, R.J. and HODGINS, S.D. (1972). Yeast phenylalanine ammonia-lyase. Properties of the Enzyme from *Sporobolomyces pararoseus* and its catalytic site. *Archives of Biochemistry and Biophysics* . Vol.152: 597-605.
28. 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*. *Biochemistr. J.* Vol. 149: 65-72.

29. EVANS, T.C., HANNA, K., CONRAD, D., PETERSON, W. and MISAWA, M. (1987). Production of phenylalanine ammonia-lyase (PAL): isolation and evaluation of yeast strains suitable for commercial production of L-phenylalanine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* Vol. 25:406-414.
30. KUPLETSKAYA, M.B. and DOL'NIKOVA G.A. (1992). Phenylalanine ammonia-lyase activity in pigmented yeasts and mycelial fungi. *Appl. Biochem. Microbiol.* Vol. 28(iss 1): 39-42.
31. HAVIR, A.E. and HANSON, R.K. (1968). L-Phenylalanine ammonia-lyase. II. Mechanism and Kinetic Properties of the Enzyme from potato tubers. *Biochemistry.* Vol. 7(5): 1904-1914.
32. 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.* Vol. 150: 1287-1291.
33. WIEDER, J.K.; PABSUK, C.N., Es, V.T. and F. DAVIS, F.F. (1979). Some properties of polyethylene glycol: Phenylalanine ammonia-lyase adducts. *The Journal of Biological Chemistry.* Vol. 254 (24): 12579-12587.
34. VELAZQUEZ, R. R.E. (1991). Caracterización de un alimento bajo en fenilalanina. TESIS. Facultad de Química, UNAM.
35. GILBERT, J.H. and TULLY, M. (1985). Protection of phenylalanine ammonia-lyase from proteolytic attack. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* Vol. 131(2): 557-563.
36. BRADFORD, M.M. *Analyt. Biochem.* (1976). Vol. 72:248.
37. BÜNTEMEYER, K., KRÖNER, K.H., HUSTEDT, H. and DECKWER, D.W. (1989). Process for large-scale recovery of Intracellular Yeast Invertase Based on Heat- and pH-Shift Treatment. *Process Biochemistry.* 212-216.
38. LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature.* Vol. 227: 680.
39. LOPEZ, A. and MONSAN, P. (1980). Dextran synthesis by immobilized dextran sucrose. *Biochimie.* Vol. 62: 323-329.
40. RHOM PHARMA GMBH. Eupergit PCA. (1983). Information Brochure.
41. NAKAMICHI, K., NABE, K., YAMADA, S. and CHIBATA, I. (1983). Induction and stabilization of L-phenylalanine ammonia-lyase activity in *Rhodotorula glutinis*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* Vol. 18: 158-162.
42. ORNDORFF, S.A., COSTANTINO, N., STEWART, D. and DURHAM, R.D. (1988). Strain improvement of *Rhodotorula glutinis* for production of a novel L-phenylalanine ammonia-lyase. *Applied and Environmental Microbiology.* Vol. 54(4): 996-1002.
43. GJURSTROM, E. (1985). *Biotechnology: Fermentation and Downstream Processing.* Chem. Eng. 126-158.
44. ERARSLAN, A. and GÜRAY, A. (1991). Kinetic Investigation of Penicillin G Acylase from a mutant strain of *Escherichia coli* ATCC11105 Immobilized on oxirane-acrylic beads. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* Vol. 51: 181-195.

45. K. BURG, O. MAUZ, S. NOETZEL and K. SAUBER. (1988). New Synthetic Carriers for Enzyme Coupling. *Die Angewandte Makromolekulare Chemie*. Vol 157: 105-121.
46. YOUNG M.R. and NEISH A.C. (1966). Properties of the ammonia-lyases deaminating phenylalanine and related compounds in *Triticum aestivum* and *Pteridium aquilinum*. *Phytochemistry*. Vol. 5:1121-1132.
47. BEZANSON G.S., DESATY D. EMES A.V and VINING L.C. (1970). Biosynthesis of cinamide and Detección of Fenilalanine Ammonia-lyase en *Streptomyces verticillatus*. *Canadian Journal of Microbiology*. Vo. 16: 147-151.
48. MARUSHI 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*. Vol. 146: 1013-1019.
49. KALGHATGI, K. and SUBBA RAO, P. (1975). Microbial L-Phenylalanine Ammonia-lyase. Purification Subunit Structure and Kinetics Properties of the Enzyme from *Rhizoctonia solani*. *Biochemistry. J.* Vol. 149:65-72.
50. EMES A. and VINING L.C. (1970). Partial purification and properties of L-phenylalanine ammonia-lyase from *Streptomyces verticillatus*. *Canadian Journal of Biochemistry*. Vol. 48: 622.
51. PARKHURST, R.J. and HODGINS, S.D. (1972). Phenylalanine and Tyrosin ammonia-lyase activity in *Sporobolomyces pararoseus*. *Phytochemistry*. Vol. 10:2997-3000.