



EXTRACCIÓN DE LA ENZIMA TIROSINFENOLIASA DE *C. freundii*

Gerardo de Jesús Sosa Santillán*, Judith Aracely Ruiz Pérches, Yolanda Garza García, Jesús Rodríguez Martínez.
Universidad Autónoma de Coahuila. Blvd. Venustiano Carranza esquina con José Cárdenas Valdés. Col. República
Oriente, CP 25280, Saltillo, Coahuila. Fax (844) 415-95-34, email: gdejsosa@mail.uadec.mx

Palabras clave: Tirosinfenoliasa, extracción, C. freundii

Introducción. El área de la enzimología se ha fortalecido en los últimos años al lograr profundizar en la comprensión de la esencia fisicoquímica de la catálisis biológica. Con la extracción y purificación enzimática se permite el establecimiento de los parámetros cinéticos de la reacción catalizada por una enzima en particular (1). La enzima tirosinfenoliasa (TFL) se encuentra localizada en el espacio periplásmico de la pared de *C. freundii*, por lo que es deseable realizar un tratamiento que permita la ruptura de dicha pared para liberar la enzima o bien aumentar la permeabilidad de la misma (2).

El objetivo de este trabajo fue establecer la metodología adecuada para eficientizar el proceso de obtención de un extracto crudo de la enzima TFL de células de *C. freundii* para su uso como catalizador en la síntesis de L-tirosina.

Metodología. Las células de *C. freundii* fueron propagadas de acuerdo a metodologías previamente establecidas (3). La biomasa fue tratada con ondas ultrasónicas, el empleo de altas presiones alternantes a células congeladas con el uso de una French Press, y con el empleo de soluciones hipo e hipertónicas de sacarosa con el fin de generar una presión de turgencia o una plasmólisis. En todos los casos las células tratadas fueron colocadas en contacto con mezcla reaccionante para síntesis de L-tirosina en reactores tipo batch de mezclado ideal. Se realizaron tinciones y pruebas de viabilidad en medio sólido de las células tratadas con la finalidad de observar si se logró la ruptura celular.

Resultados y discusión. Los resultados obtenidos mostraron que en ninguno de los casos se logró la ruptura celular ya que las observaciones microscópicas muestran células intactas después de los tratamientos y en las placas de agar se observa crecimiento normal. El tratamiento con sonicación no mejoró la actividad enzimática y por el contrario se observó una ligera disminución de la misma en comparación con células no tratadas. Esta disminución se debió probablemente a que las ondas provocaron la vibración de la pared sin lograr romperla, pero afectando a la enzima localizada en el periplasma. El tratamiento de las células con el uso de la French Press muestra que la actividad enzimática de las células prensadas no muestra diferencia significativa respecto a las células no tratadas. Respecto al tratamiento con soluciones hipo e hipertónicas de sacarosa se observó que si bien no se logró la ruptura celular, si se mejoró la

actividad enzimática al usar bajas concentraciones de sacarosa en el tratamiento (Cuadro 1). Esto indica que existió la plasmolización parcial de la membrana externa de la pared celular, o que alteró la permeabilidad de la misma facilitando la difusión del sustrato.

Cuadro 1. Comparación de actividades enzimáticas en el estudio de las células tratadas con soluciones de sacarosa

Tratamiento	A.E. (moles/mgxmin)
Nativas	8.93×10^{-6}
Sacarosa al 5%	1.34×10^{-5}
Sacarosa al 10%	1.15×10^{-5}
Sacarosa al 15%	1.20×10^{-5}
Tratamiento	A.E. (moles/mgxmin)
Nativas	4.51×10^{-6}
Sacarosa al 20%	5.87×10^{-6}
Sacarosa al 30%	5.35×10^{-6}
Sacarosa al 40 %	5.42×10^{-6}

Conclusiones. Las metodologías probadas en este estudio no lograron la ruptura celular y sólo en el caso del tratamiento con las soluciones de sacarosa se observó una mejoría en la actividad enzimática respecto a las células nativas, lo que sugirió una plasmolización parcial de la membrana externa. El estudio con las células tratadas mediante prensado no fue concluyente y el sonicado mostró posible daño a la enzima por la aplicación de las ondas de sonido.

Agradecimientos. Este trabajo fue realizado en parte gracias al apoyo del Consejo Estatal de Ciencias y Tecnología (COECyT) en Coahuila.

Referencias.

1. Prado B.L. *et al.* 1999. Avances en Purificación y Aplicación de Enzimas en Biotecnología. "Universidad Autónoma Metropolitana" México. pp 73-80.
2. Demidkina T.V., Myagkikh I.V., Anston A.A and Harotynyan K.H. 1989. *Crystallization and Crystal data on the tyrosin Phenol-Lyase*. Eur. Biochem.Societies. 232: 381-82.
3. Cortes P.C.J. 1992. *Obtención de L-Tirosina empleando como biocatalizador células de Citrobacter intermedium con alta actividad tirosinfenoliasa*. Tesis Maestría. Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro. México. 142 p.