



EL TIEMPO DE RETENCION (TR) COMO FACTOR DE EFICIENCIA DE BIOTRANSFORMACION DEL ACIDO FUMARICO EN ACIDO L-ASPARTICO, EN UN REACTOR EMPACADO CON CELULAS DE *Bacillus cereus* INMOVILIZADAS EN PVA.

Karina Leos B., Irma Guzmán A., Julio C. Mata B., Jesús Rodríguez Mtz., Yolanda Garza G.
Universidad Autónoma de Coahuila. Departamento de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas.
Blvd. V. Carranza y José Cárdenas Valdés s/n, Saltillo, Coah.Tel: (844)4155752. *leos_karina@hotmail.com.

Palabras clave: Biotransformación, inmovilización, aspártico

Introducción. La utilización de métodos microbiológicos-enzimáticos para la síntesis de diferentes sustancias entre ellos aminoácidos, ha sido ampliamente estudiada; particularmente, el desarrollo de soportes y métodos de inmovilización para los procesos continuos. Los resultados que se obtienen de los reactores de flujo continuo, varían en función de si las partículas sólidas están suspendidas o depositadas en el fondo del reactor o si están en recirculación, etc; debido a esto, los tiempos de obtención de productos son también diferentes. El transporte que ocurre en la fase fluida que se está moviendo entre las partículas sólidas, tiene lugar en condiciones diversas. El empleo de células completas en calidad de biocatalizadores, contribuye a solucionar el problema de la inestabilidad de las enzimas, pero no tienen un manejo sencillo en procesos de cinéticas continuas por los problemas de difusión de sustrato y producto mencionados. En el presente trabajo, se propuso incrementar la eficiencia de un proceso continuo de biotransformación del ácido fumárico en el aminoácido L-aspártico utilizando un reactor empacado con células de *Bacillus cereus* inmovilizadas en alcohol polivinílico (PVA) gelificado con agentes entrecruzantes (2).

Metodología. Las células de *B.cereus* con alta actividad aspartasa, se propagaron en medio líquido de composición definida y se incubaron a 37°C, bajo agitación a 250 rpm por 6 h para obtener biomasa, la cual se separó por centrifugación y se cuantificó la proteína celular total por el método de Peterson (1). Como sustrato, se utilizó una solución de fumarato de amonio 1M. El proceso de inmovilización de las células bacterianas, se llevó a cabo preparando una solución acuosa de PVA al 10% se agregó la biomasa se mezcló hasta homogeneizar, y posteriormente se goteó en ácido bórico para la gelificación. Con las células inmovilizadas se empacó un reactor con las siguientes características: volumen total: 1250ml, fase hídrica: 440ml., volumen que ocupan las esferas: 810ml, distancia entre cada puerto: 4cm, altura total: 52cm, y 5 puertos para monitoreo de la reacción aspartasa. El sustrato fue alimentado por flujo ascendente, monitoreándose su consumo a lo largo de la columna por espectrofotometría a 240nm. Se estudiaron 14 tiempos de residencia del sustrato (24, 15, 10, 7.5, 5, 4, 3, 2, 1.47, 1.30, 1.0.75, 0.5, 0.25h.), para definir el tiempo óptimo de retención. Se determinó la actividad enzimática específica aspartasa en cada puerto, así como el porcentaje de biotransformación del sustrato y la eficiencia del trabajo de la columna mediante la actividad lineal del biocatalizador.

Resultados y discusión. El análisis general de los resultados obtenidos con respecto a la disminución de la concentración de sustrato durante el proceso de biotransformación a los diferentes tiempos de residencia estudiados, mostró que más del 50% del fumarato, es transformado prácticamente en el primer puerto a tiempos de residencia mayores y que a partir de las 4 h de residencia del sustrato, su transformación ocurre de manera un poco más gradual en cada puerto monitoreado a lo largo de la columna. La determinación de actividad enzimática específica de las células libres, fue de 5.0×10^{-1} mmoles/mg.min, y de las células inmovilizadas, de 4.0×10^{-1} mmoles/mg.min. Se obtuvo un 90% de transformación del fumarato en ácido L-aspártico en 30 min. de residencia del sustrato en el reactor en columna. La actividad enzimática específica disminuyó en un 40% después de seis meses de operación. En la tabla 1, se expresan algunos datos obtenidos de la biotransformación del sustrato en cada puerto del reactor

TR, h	P1	P2	P3	P4	P5
24	0.4334	0.3136	0.2624	0.1839	0.1288
15	0.4644	0.3541	0.2992	0.1631	0.1206
10	0.6044	0.49	0.2516	0.152	0.1031
4	0.7271	0.507	0.3895	0.28	0.2033
0.5	0.8091	0.513	0.357	0.158	0.0943
0.25	0.8579	0.5075	0.4118	0.4011	0.3506

Tabla. 1. Concentración(M) de fumarato de amonio en los puertos de la columna, a diferentes TR, para la obtención del ácido L-aspártico con células de *B. cereus* inmovilizadas en PVA,

Conclusiones. A un TR del sustrato de 30 min., con una vel. de alimentación de 14 ml. min^{-1} , se logró que el reactor en columna trabajara de manera más eficiente ya que la transformación del sustrato se observa a todo lo largo de la columna, incrementándose la actividad lineal del biocatalizador, ya que a mayores TR del sustrato, la transformación en el primer puerto es de casi un 60%.

Bibliografía.

- Peterson GL (1977) A. Simplification of the protein assay method of Lowry et al Vich is more generally applicable. Anal.Biochem 83:346.
- Mauricio Benavides J.E. (2003). "Estabilidad operacional de la aspartasa de células de *Bacillus cereus* y *Enterobacter cloacae* inmovilizadas en alcohol polivinílico por tratamiento con agentes entrecruzantes". Tesis de Maestría. UAdeCoahuila.