



ESTUDIO SOBRE LA INMOVILIZACIÓN DE CÉLULAS DE *Citrobacter freundii* CON ALTA ACTIVIDAD TIROSINFENOLIASA (TFL) EN ALCOHOL POLIVINILICO (PVA) MEDIANTE AGENTES ENTRECruzANTES Y SU USO EN LA BIOSÍNTESIS DE L-TIROSINA.

Adriana García-Briones, Gerardo de Jesús Sosa-Santillán*, Yolanda Garza-García, Jesús Rodríguez-Martínez.
Departamento de Biotecnología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila.
Blvd. V. Carranza y J. Cárdenas Valdez S/N, Col. República Ote. Fax (844)415 95 34 *gdejsosa@mail.uadec.mx

Palabras clave: Tirosofenoliasa, inmovilización, alcohol polivinílico.

Introducción. La enzima Tirosofenoliasa (TFL), producida en altos niveles por *Citrobacter freundii* (1), cataliza la degradación de L-Tirosina a fenol, piruvato y amonio, en una reacción reversible, donde el equilibrio tiende hacia la dirección de síntesis del aminoácido. Células de *Citrobacter freundii* son inmovilizadas por atrapamiento en una matriz polimérica porosa de alcohol polivinílico (PVA) mediante un proceso de gelificación en el cual se utiliza ácido bórico como agente entrecruzante. El objetivo del presente trabajo fue optimizar el proceso de gelificación del alcohol polivinílico para su uso como soporte en la inmovilización de células de *Citrobacter freundii* con alta actividad tirosofenoliasa.

Metodología. La pureza y actividad de las células se controló mediante resiembras periódicas. Como biocatalizador se emplearon células completas, por lo que se cuantificó la proteína celular total por el método de Peterson. La reacción se realizó en reactores de mezclado ideal tipo batch a 35°C y pH de 8.5; conteniendo 3.5 mL de suspensión celular y 30 mL de mezcla reaccionante compuesta de fenol (C₆H₅OH) 0.09 M, acetato de amonio (CH₃COONH₄) 0.45 M y piruvato de sodio (CH₃COCOONa) 0.12 M, el seguimiento de la reacción se hizo midiendo, espectrofotométricamente a 268 nm, el cambio en la concentración de fenol en función del tiempo. La inmovilización se realizó preparando una mezcla con PVA y el biocatalizador, la cual fue goteada en ácido bórico, las esferas así formadas se dejaron reposar 15 minutos, se enjuagaron en agua destilada y enseguida se pasaron a una solución de fosfato de sodio, dejando reposar por el mismo tiempo y volviendo a enjuagar, después las esferas se incubaron en el sustrato por 15 minutos, se escurrieron y colocaron en el reactor para los estudios cinéticos. Las concentraciones de los reactivos empleados en el proceso de inmovilización variaron en cada ensayo, para determinar las condiciones más efectivas para la reacción.

Resultados y discusión. La técnica de inmovilización aplicada a *C. freundii* no ha sido efectiva hasta el momento; los porcentajes de inmovilización alcanzados son bajos, por lo tanto en los estudios cinéticos que se han realizado, el consumo de sustrato de las células inmovilizadas es menor en comparación con las células nativas. Un problema recurrente en este proceso de gelificación es la aglomeración de las esferas, pero puede

solucionarse adicionando alginato de sodio al PVA y goteando en la solución de ácido bórico a pH 7 ajustado con hidróxido de calcio (2).

Cuadro 1. Porcentajes de inmovilización obtenidos a diferentes concentraciones de alcohol polivinílico y ácido bórico

Condiciones del proceso de inmovilización	% de Inmovilización
PVA 10.5 % y ácido bórico 4.5 %	60.2%
PVA 11 % y ácido bórico 4.5 %	50.5%
PVA 11.5 % y ácido bórico 4.5 %	45.3%
PVA 10.5 % y ácido bórico 4 %	28.2%
PVA 10.5 % y ácido bórico 5 %	43.3%

Cuadro 2. Actividad enzimática (AE) y porcentaje de actividad de las células tratadas a diferentes condiciones de inmovilización

Condiciones de inmovilización	AE (molesmg ⁻¹ min ⁻¹)	%
Células nativas	5.25e-06	100%
PVA 10.5 % y ácido bórico 4.5 %	2.23e-06	42.5%
PVA 11 % y ácido bórico 4.5 %	1.34e-06	25.5%
PVA 11.5 % y ácido bórico 4.5 %	1.21e-06	23%
PVA 10.5 % y ácido bórico 4 %	1.24e-06	23.6%
PVA 10.5 % y ácido bórico 5 %	1.22e-06	23.2%

Conclusiones. Los porcentajes de inmovilización alcanzados no han sido superiores al 60.2%, por eso es recomendable seguir probando diferentes condiciones del proceso. La actividad enzimática de las células inmovilizadas no ha alcanzado los valores presentados en las células nativas. Con los ensayos realizados hasta el momento se determinó que la técnica de inmovilización de *C. freundii* por atrapamiento mediante PVA entrecruzado con ácido bórico, no es efectiva para la reacción de síntesis de L-tirosina catalizada por TFL. La aglomeración de las esferas de PVA provoca problemas de difusión pero puede solucionarse al adicionar alginato de sodio, presentando así una alternativa que podría mejorar los valores obtenidos, en actividad enzimática y porcentaje de inmovilización.

Bibliografía.

1. Demidkina, T, Barbolina, M y Faleev, N. (2002). Threonine-124 and phenylalanine-448 in *Citrobacter freundii* tyrosine phenol-lyase are necessary for activity with L-tyrosine. *Biochem. J.* vol (363): 745-752.
2. Hertzberg, S, Moen, E y Vogelsang, C. (1995). Mixed photo-cross-linked polyvinyl alcohol and calcium.alginate gels for cell entrapment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* vol (43):10-17.