

COMPARACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DE BIOTRANSFORMACIÓN DE ACIDO FUMÁRICO EN L-ASPÁRTICO POR CÉLULAS CON ALTA ACTIVIDAD ASPARTASA INMOVILIZADAS EN ALCOHOL POLIVINÍLICO POR DOS TECNICAS DE GELIFICACIÓN

Yolanda Garza G., Juan Enrique Mauricio B., Miriam P. Luévanos E., Jesús Rodríguez M.

Departamento de Biotecnología -Fac. de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila. Blvd. V. Carranza y J.Cárdenas Valdés. Saltillo, Coah, CP 25000. Email: ygarza@mail.uadec.mx, uolanta@yahoo.com.mx

Palabras clave: *Inmovilización, PVA, ácido L-aspartico*

Introducción. La biotransformación del ácido fumárico en el aminoácido L-aspartico, ha sido realizada favorablemente mediante células con actividad aspartasa inmovilizadas, para su empleo en procesos continuos de biotransformación a escala industrial (1). La importancia del soporte de inmovilización empleado radica en su capacidad para retener las células en su interior, permitir la difusión del sustrato y producto a través de él, resistencia, estabilidad y economía (2); esto ha propiciado la comparación de metodologías de inmovilización, así como el empleo de diferentes soportes naturales y sintéticos que benefician al proceso de interés. El alcohol polivinílico (PVA) posee propiedades de gelificación que comprenden estructuras internas formadas por redes de cadenas macromoleculares, las cuales además de ser biocompatibles, se caracterizan por ser química y mecánicamente estables y tener una mayor tolerancia a la temperatura en comparación con otros soportes naturales usados para estos propósitos (3).

El presente trabajo, describe la efectividad de biotransformación de procesos comparativo de inmovilización por atrapamiento de células de *Bacillus cereus* y *Enterobacter cloacae* con alta actividad aspartasa, en alcohol polivinílico gelificado por dos técnicas diferentes de entrecruzamiento entrecruzado con ácido bórico mediante el estudio de la reacción aspartasa en reactores batch discontinuos.

Metodología. El cultivo de *B. cereus* y *E. cloacae* con actividad aspartasa, fue realizado de acuerdo a la metodología previamente descrita (4). El atrapamiento de las células fue realizado en PVA al 10% (w/v) superhidrolizado tratado por dos técnicas de gelificación por entrecruzamiento: en una se adiciona el PVA con una mezcla con un volumen igual de la suspensión celular. La mezcla resultante se gotea en soluciones de H_3BO_3 (3-5.5%) agitando de 15 -30 min. Las esferas formadas se transfieren a una solución de Na_2HPO_4 0.2-0.6 M de pH 6.0 por 15 min para endurecerlas. Se separan por filtración y se lavan para determinar el porcentaje de inmovilización. En la otra técnica se adiciona el PVA con 1% de alginato de sodio, se mezcla con la suspensión celular y la mezcla resultante se gotea en H_3BO_3 3.5-5.5% regulado a pH 7 con $Ca(OH)_2$ 0.01M, agitando por 15-30 minutos para formar partículas esféricas, las cuales después se enjuagan para eliminar el ácido bórico residual. En ambos casos se determinó la capacidad de atrapamiento del soporte interesterificado por determinación de la proteína liberada

Como sustrato de esta reacción, se utilizó fumarato de amonio 0.5 - 1.0M, pH 8.0 y una T de 37°C. La actividad enzimática

aspartasa en reactores batch, discontinuos fue determinada mediante la metodología ya descrita (4).

Resultados y Discusión. Las esferas de PVA con el biocatalizador, obtenidas por las dos técnicas mencionadas, mostraron eficiencias de biotransformación del ácido fumárico en ácido L-aspartico cercanas al 90% por 10 periodos de uso continuo en reactores batch para las dos cepas empleadas. Estudios posteriores mostraron que para periodos mas largos de uso continuo de células de *B. cereus* resulta mas conveniente la inmovilización en el sistema PVA-alginato de calcio, mientras que para células de *E. cloacae* el sistema PVA-ácido bórico fosforilado es mas favorable. La actividad específica de las células inmovilizadas de *Bacillus cereus* por ambas técnicas, fue superior al 45 % de la actividad específica original exhibida por las células libres, con porcentajes de inmovilización superiores al 70 % después de 16 ciclos continuos de biotransformación, mientras que para *Enterobacter cloacae* la actividad específica fue superior al 60% de la exhibida por las células libres, con porcentajes de inmovilización superiores al 60 % después de 20 ciclos continuos de biotransformación.

Conclusiones. Para su aplicación en procesos continuos por periodos de tiempo prolongados, la gelificación del PVA adicionado con alginato por entrecruzamiento con ácido bórico-Ca, resultó ser una técnica adecuada inmovilizar células de *B. cereus* con actividad aspartasa; mientras que la modificación de la estructura química del PVA por entrecruzamiento con ácido bórico y fosfatos, fue más adecuada para inmovilizar células de *E. cloacae* con actividad aspartasa.

Agradecimientos. Al Sireyes-Conacyt

Bibliografía

1. Chibata, I, Tosa, T., Sato, T (1986). Continuous Production of L-aspartic acid: Improvement of productivity by both development of immobilization method and construction of New *Escherichia coli* Strain". *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **13**: 231-240.
2. Bickerstaff, G. F. (1997). *Immobilization of enzymes and cells*. Methods in Biotechnology. USA. **1**: 1-5.
3. Cantarella, M., Alfani, F., Cantarella, L., Gallifuoco, A. (1997). Entrapment of Enzymes and Cells in Poly (2-hydroxyethyl Methacrylate) Supports. En: *Immobilization of Enzymes and Cells*. Bickerstaff, G. Humana Press, USA. 67-76.
4. Garza, Y., Rodríguez, M., Hernández, C., Rodríguez, J. (2000). Optimization of Aspartateammonialyase by *Bacillus cereus* Cells. *J. Ind. Microbiol and Biotechnol*, **25**: 225-228.