

CINÉTICA Y DECLINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ASPARTASA DE CÉLULAS DE *Enterobacter cloacae* INMOVILIZADAS PARA LA BIOTRANSFORMACIÓN CONTINUA DE ÁCIDO FUMÁRICO EN L-ASPÁRTICO

Yolanda Garza G, Alma I. Soria Ortiz y Jesús Rodríguez M.

Departamento de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila
Blvd. V. Carranza y J. Cárdenas Valdés, Saltillo, Coah. CP 25000, Tel: (844) 415 57 52, Fax: 415 95 34

Email: ygarza@mail.uadec.mx , uolanta@yahoo.com.mx

Palabras clave: inmovilización, ácido L-aspártico, Enterobacter cloacae

Introducción. La determinación del mecanismo cinético de las reacciones enzimáticas catalizadas por células de microorganismos, es un problema complejo; sin embargo, estos procesos tienen un interés muy significativo debido a que en la célula, generalmente la estabilidad de las enzimas es más alta que en estado aislado y el catalizador puede trabajar durante largo tiempo; esto se ve fortalecido mediante su inmovilización en soportes de diferente naturaleza en los que las limitaciones en la difusión sobre la transferencia de masa de sustratos y productos deben reducirse al máximo para que haya un libre tránsito de estos a través de la matriz del agente inmovilizante(4).

En el presente trabajo se establecieron parámetros cinéticos del proceso continuo de obtención del aminoácido L-aspártico utilizando un reactor en columna empacado con células de *Enterobacter cloacae* inmovilizadas en carragenina, además de revisar la estabilidad de la aspartasa en este sistema.

Metodología. La biomasa de *E. cloacae* se obtuvo por propagación en medio líquido con inductor, después de 12h de incubación a 30°C (3). Se inmovilizó en carragenina al 5%, formando sistemas de esferas con células atrapadas por gelación ionotrópica y por transición de fase inducida por temperatura(2). Con las esferas obtenidas, se empacó un reactor en columna de vidrio de 60 cm de longitud con diez puertos distribuidos a distintas alturas; se estudiaron diferentes velocidades de alimentación del sustrato (fumarato de amonio), así como variaciones en la concentración (0.1 – 1.0M, todos a un pH de 8.0) y la temperatura (20, 25, 30, 33 y 37°C); se determinó la actividad del biocatalizador a diferentes alturas de la columna; además de la eficiencia de biotransformación considerando la carga volumétrica del reactor.

Resultados y discusión. La caracterización de todo el espectro cinético de la síntesis continua del ácido L-aspártico en el reactor en columna, arrojó los siguientes datos: la reacción aspartasa se describió por una cinética de primer orden, el valor de la cte (k), fue de 1.44 min⁻¹. La concentración de sustrato puede manejarse de 0.5 a 1.0M sin afectar la estabilidad del biocatalizador, La temperatura óptima del proceso (30-37°C), se estableció

al considerar que la actividad del biocatalizador en un momento dado de trabajo de la columna ($W = 2-8.5 \times 10^{-2}$ mmoles.min.cm⁻³), no depende de la temperatura cuando es evaluada en un mismo puerto, sino que está influenciada por la altura de la columna; el contenido de proteína celular fue de 8 mg.cm³. A velocidades de alimentación de 0.4 – 0.75 ml/min, se logró de 90-100% de bioconversión del sustrato, disminuyendo sólo entre un 20-30% a velocidades de flujo mayores (1.0-1.5 ml/min); se obtuvo una Km del proceso de 0.7 M. De los datos obtenidos se determinó una actividad enzimática específica de las células de *E. cloacae* de 2.99×10^{-5} mmoles.mg⁻¹.seg⁻¹. producción de 80-100 g de ácido L-aspártico/día de trabajo de la columna. La estabilidad de la actividad aspartasa, se mantuvo sin variación las primeras 800 h de trabajo de la columna; posteriormente disminuyó un 25% las siguientes 600 h .

Conclusiones. El sistema de células inmovilizadas empleado, permitió trabajar con el mismo biocatalizador por más de 60 días; el valor de Km aparente, se incrementa más de cinco veces de lo reportado para la enzima aspartasa libre(1), lo que consideramos que puede deberse a cambios en la velocidad de permeación del sustrato o producto a través de la matriz del gel.

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. Garza, Y., Rodríguez, M., Hernández, C., Rodríguez, J. (2000). Optimization of Aspartateammonialyase by *Bacillus cereus* Cells. *J. Ind. Microbiol and Biotechnol*, 25: 225-228.
4. Zueva N.N., Yakovleva V.I., Veryovkin A.N., Avsiuk I.V., Aren A.K., Berezin I.V. (1985). A comparative study on the aspartase activity and its stability in *Escherichia coli* cells immobilized in PAAG and carrageenan. *Prikl. Biokhim Mikrobiol*. T.XXI No. 3, Moscow, Russ. Pp: 334-340