

EXTRACCIÓN DE LA ENZIMA TIROSINFENOLIASA DE *Citrobacter freundii* PARA SU USO EN LA SÍNTESIS DE L-TIROSINA.

Gerardo J. Sosa Santillán*, Judith A. Ruiz Pérches, Erika G. Contreras Escobar, Yolanda Garza García y Jesús Rodríguez Martínez

Departamento de Biotecnología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila. Blvd. V. Carranza y José Cárdenas V., Col. República Ote. C.P. 25280, Tel. (8) 415-57, 52, Fax (8) 415-95-34, Saltillo, Coahuila. Email: gdejsosa@yahoo.com

Palabras clave: *Tirosinfenoliasa*, *C. freundii*, *L-tirosina*.

Introducción. La tirosinfenoliasa es un aminoácido de amplio uso en la industria alimentaria y farmacéutica. Este aminoácido puede ser sintetizado por la acción catalítica de la enzima tirosinfenoliasa (TFL), presente en microorganismos como *Citrobacter freundii*¹. El uso del microorganismo como biocatalizador, sin embargo, presenta problemas debido a los procesos de difusión². Debido a ello, se hace necesario el estudio de métodos que permitan extraer la enzima para mejorar la reacción de síntesis del aminoácido al trabajar con los extractos obtenidos.

Metodología. En este estudio se probaron dos métodos de extracción: exposición de las células a una solución concentrada de sacarosa; y centrifugación a una temperatura de -2°C . Las células de *C. freundii* fueron obtenidas por propagación en matraces Erlenmeyer, incubándose a 32°C por 12 horas; posteriormente las células fueron separadas por centrifugación, siendo en esta etapa donde se dio el tratamiento de centrifugación bajo condiciones de congelamiento a uno de los lotes. Los paquetes celulares obtenidos se suspendieron en buffer de fosfatos, siendo uno de los lotes colocado posteriormente en solución de sacarosa al 20% durante 10 minutos. Este último lote fue de nuevo centrifugado y el paquete celular suspendido en buffer de fosfatos. La reacción se llevó a cabo en reactores batch con 30 mL de mezcla reaccionante para síntesis de L-tirosina (fenol, piruvato y amonio)

Resultados y Discusión. La figura 1 muestra el consumo de sustrato en función del tiempo bajo las diferentes condiciones señaladas en la metodología. Puede observarse que la velocidad inicial se incrementa para las células tratadas con congelamiento o en solución de sacarosa; sin embargo, no se observa actividad enzimática cuando se utiliza el sobrenadante procedente de la centrifugación de las células tratadas con sacarosa. Esto parece ser indicativo de que ambos tratamientos logran la plasmólisis parcial de las células, pero sin lograr liberar a la enzima, aunque disminuyendo los problemas de difusión. A este respecto, cabe señalar que Kuplestkaya³ señaló que la aplicación de diferentes tratamientos (entre ellos congelamiento) no aumentó la síntesis de L-tirosina o L-DOPA al utilizar células de *C. freundii* 62 como catalizador.

Las velocidades iniciales obtenidas a partir de estas gráficas fueron de 9.4×10^{-3} , 11.18×10^{-3} y 16.82×10^{-3} moles/mg

min, para las células sin tratamiento, centrifugadas bajo congelamiento y tratadas con solución de sacarosa, respectivamente.

Conclusiones. Los resultados obtenidos en este estudio,

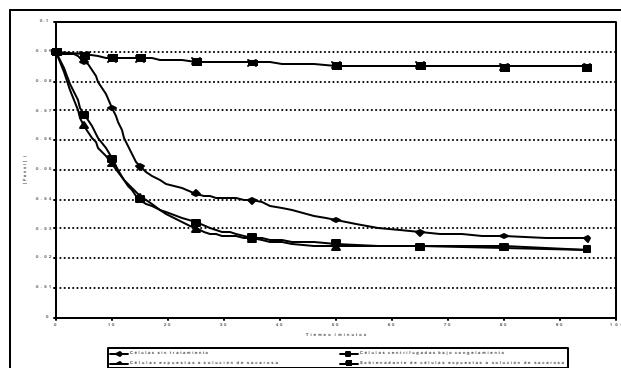


Figura 1.

muestran que los tratamientos probados no fueron efectivos para liberar la enzima tirosinfenoliasa, pero lograron aumentar la permeabilidad de la membrana celular, disminuyendo con ello los problemas de difusión de sustratos hacia el interior de las células y del producto hacia el exterior.

Agradecimiento. Este proyecto es financiado por el Departamento de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas de la U.A. de C.

Bibliografía.

1. Enei, H., H. Matsui, K. Yamashita, S. Okura and H. Yamada. 1972. Distribution of tyrosine phenol lyase in microorganisms. *Agric. Biol. Chem.* 36(11):1869-1876.
2. Karsten, W.E., R.B. Gates and R.E. Viola. 1986. Kinetics studies of L-aspartase from *Escherichia coli*: substrate activation. *Biochemistry.* 25:1299-1303.
3. Kuplestkaya, M.B. 1981. Examination of tyrosine and 3,4-DOPA, synthesis by *Citrobacter freundii* 62. *URSS Academy of Science. Applied Biochemistry and Biotechnology.* 17(2):278-283.