

ESTABILIDAD OPERACIONAL DE LA ASPARTASA DE CÉLULAS DE *Bacillus cereus* INMOVILIZADAS EN ALCOHOL POLIVINÍLICO POR TRATAMIENTO CON AGENTES ENTRECruzANTES

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: uolanta@yahoo.com.mx

Palabras clave: Inmovilización de células, alcohol polivinílico (PVA), ácido L-aspartico

Introducción. El escalamiento de la biotransformación del ácido fumárico en el aminoácido L-aspartico, ha propiciado la búsqueda de metodologías de estabilización de la actividad aspartasa de células de *Bacillus cereus* que catalizan este proceso. En este sentido, la inmovilización ofrece la posibilidad de mejorar la estabilidad de los biocatalizadores, siendo un método efectivo para regímenes continuos y facilitando la recuperación de los mismos (1). La mayoría de los estudios sobre inmovilización de bacterias han usado gránulos o placas de geles suaves como el alginato, poliacrilamida y k-carragenina, que tienen una fuerza mecánica limitada, baja tolerancia a la temperatura, se disuelven a concentraciones altas de sales y tienden al lavado de células del soporte(2). Una alternativa a estos, son los soportes poliméricos sintéticos con estructuras internas formadas por redes de cadenas macromoleculares lineales separadas, que además de ser biocompatibles, se caracterizan por ser química y mecánicamente estables, por velocidades de difusión altas para sustratos y productos, por tener una mayor tolerancia a la temperatura, etc. (3).

El presente trabajo, describe el proceso de inmovilización por atrapamiento de *B. cereus* con alta actividad aspartasa, en alcohol polivinílico entrecruzado con ácido bórico y fosforilado, comparadas con las células libres mediante el estudio de la reacción aspartasa en reactores batch.

Metodología. El cultivo de *B. cereus* 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) con diferente porcentaje de hidrolizado, mezclando una porción de esta con un volumen igual de la suspensión celular. La mezcla resultante se gotea en soluciones de ácido bórico (3-5.5%) agitando de 15 –30 min para formar partículas esféricas, las cuales se separan y se enjuagan para eliminar el ácido bórico residual. Las esferas formadas se transfieren a una solución de fosfato de sodio 0.2 – 0.6M de pH 6.0 por 15 min para endurecerlas. Se separan por filtración, se lavan para determinar el porcentaje de inmovilización. Se determinó la capacidad de atrapamiento del soporte intersterificado por determinación de la proteína liberada bajo agitación en solución buffer de fosfatos 0.01M de pH 7.0, así como la sensibilidad a la adsorción del sustrato.

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, fue determinada mediante la metodología ya descrita (4) y definida como la cantidad de micromoles de sustrato transformados por miligramo de proteína por hora.

Resultados y Discusión. Las esferas de PVA con el biocatalizador, obtenidas por interesterificación con ácido bórico al 4.5% y fosfato de sodio 0.6M de pH 6-8, mostraron mejor capacidad de atrapamiento y menor sensibilidad a la adsorción. La actividad específica de las células inmovilizadas en PVA con 99% de hidrolizado, fue un 35% de la actividad específica original exhibida por las células libres, en cambio para las inmovilizadas en PVA con 86% de hidrolizado, fue de 90%; esto puede ser debido a limitaciones difusionales incrementadas por la disponibilidad de grupos OH del PVA para la esterificación, limitando los espacios intersticiales para un atrapamiento más efectivo de las células.

Conclusiones. La modificación de la estructura química del PVA por entrecruzamiento con ácido bórico y fosfatos, resultó ser una técnica adecuada para la inmovilización de células de *Bacillus cereus* con alta actividad aspartasa, ya que se aumenta la estabilidad de la enzima intracelular al ser utilizada más de 5 ciclos experimentales.

Agradecimientos. Al Sireyes-Conacyt

Bibliografía

1. Bickerstaff, G.F. (1984) Applications of immobilized enzymes to fundamental studies on enzyme structure and function, in *Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology*, vol.9 (Wiseman, A., ed), Ellis Horwood, Chichester, UK, pp. 162-201.
2. Venkata,S, Zhisong,H, Scriven,L, Schottel,J, Flickinger,M. (1999). Microstructure of a Biocatalytic Latex Coating Containing viable *Escherichia coli* Cells. *J. Coll. Inter. Sci.* 215: 244-257.
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.