

EFFECTO DEL Mg⁺² EN LA ACTIVIDAD DE L-FENILALANINA AMONIO-LIASA PRODUCIDA POR *Rhodospiridium toruloides*

Castañeda, M. Teresita¹; Adachi, Osao²; Hours, Roque A¹.; Mignone, Carlos F¹.

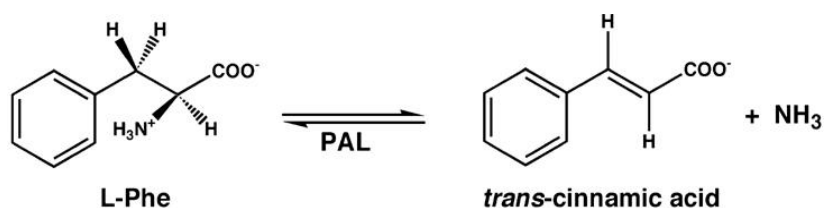
¹Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI; UNLP, CONICET La Plata). Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. 47 y 115, (B1900ASH) La Plata, Argentina.

e-mail: castaneda@biotec.quimica.unlp.edu.ar

²Department of Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Yamaguchi University, Yamaguchi 753-8515 Japan.

Introducción

La enzima L-Fenilalanina amonio liasa (PAL, EC 4.3.1.25) cataliza la desaminación de L-fenilalanina en ácido *t*-cinámico (*t*-CA).



PAL fue aislada por primera vez en plantas superiores, en las cuales se la asocia a mecanismos de defensa. Más tarde, se encontró que algunas especies del género *Rhodotorula*, en especial *Rhodotorula glutinis* NBRC 0559 (luego renombrada como *Rhodospiridium toruloides*) tenían la capacidad de producir PAL en un medio conteniendo fenilalanina como inductor. Muy poco se ha estudiado sobre la influencia de los componentes del medio de cultivo, en la actividad PAL.

El objetivo de este trabajo fue determinar los componentes del medio de cultivo que influyen en la actividad PAL, a fin de lograr un medio de cultivo óptimo para ser empleado en su producción.

Metodología

Para ensayar la influencia de los componentes del medio de cultivo, se empleó un medio basal para crecimiento de levaduras, al cual se le adicionó 5 g/l de L-fenilalanina como inductor de PAL y 1 g/l L-isoleucina como estabilizador de PAL. Los medios a ensayar se inocularon con cultivos frescos de *R. toruloides* a razón de 1,5 x 10⁷ UFC/ml, en cultivo batch. La incubación se llevó a cabo en condiciones aeróbicas en shaker a 200 rpm y 30°C. La actividad de PAL fue medida espectrofotométricamente monitoreando la producción de ácido cinámico a 290 nm, mediante método modificado de Yamada *et al.* (1981). La mezcla de reacción contiene: 1 mg/ml de biomasa, 25 mM de L-fenilalanina, 25 mM de Tris-HCl buffer (pH = 8,5) y 0,005 % de CPC. La reacción se llevó a cabo a 30°C por 10 min. Una unidad de PAL se define como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μmol de ácido *t*-cinámico por minuto, por ml de cultivo. La actividad específica se expresó en términos de unidades enzimáticas por mg de células secas.

En principio se llevó a cabo un diseño multifactorial incompleto por método de Plackett Burman, con los siguientes factores a analizar: pH, K⁺, Mg⁺², Ca⁺², Cu⁺², Fe⁺³, Zn⁺², Mn⁺², Peptona, L-Isoleucina y Extracto de levadura, variando los niveles entre la ausencia (b - b) y el doble del nivel basal (b x 2). Para el análisis de los resultados se empleó un método robusto basado en el algoritmo de Dong, el cual resulta muy riguroso a la hora de elegir los factores significativos.

A partir de los resultados del análisis multifactorial incompleto, se llevó a cabo un diseño factorial completo, para evaluar los factores resultantes significativos y las iteraciones entre ellos.

El factor resultante significativo a partir del análisis factorial completo, fue evaluado en el tiempo empleando un diseño hexagonal de Doehlert, para determinar las concentraciones óptimas de dicho factor.

Una vez determinadas dichas concentraciones, se validó el modelo variando las concentraciones del factor para un tiempo de cultivo determinado.

Resultados

A partir del análisis multifactorial incompleto se pudo determinar que los valores probablemente significativos eran Mg^{+2} y Mn^{+2} . El extracto de levadura se encontró muy cercano al límite de significancia, con lo cual se lo incluyó en el diseño. Estos tres factores se analizaron mediante un diseño factorial completo, el cual determinó que solamente el Mg^{+2} era significativo en la actividad PAL, siendo los demás factores e iteraciones no significativos.

A partir de allí se evaluaron concentraciones crecientes desde un nivel basal de 0,3 mM hasta un nivel 10 veces superior, a diferentes tiempos de cultivo, mediante un diseño hexagonal de Doehlert. Este arrojó que las concentraciones óptimas de Mg^{+2} se encontraban entre 6 y 7 veces el nivel basal para un tiempo de cultivo aproximado de 20 h. Mediante la validación del modelo se pudo observar que no se logran incrementos significativos para concentraciones superiores a 1,8 mM de Mg^{+2} .

Conclusión

A partir de este trabajo se puede concluir que el Mg^{+2} es el único componente del medio de cultivo analizado que influye significativamente en la actividad de PAL, observando un incremento de la misma hasta concentraciones de 1,8 mM de Mg^{+2} en el medio de cultivo. Se ha evidenciado también un aumento en los niveles de biomasa obtenidos a las concentraciones ensayadas. Respecto a la actividad PAL, algunos autores sugieren que el rol del Mg^{+2} estaría en la estabilización específica de una conformación más activa de la enzima.

Referencias

Yamada S., Nabe K., Izuo N., Nakamichi K., Chibata I. (1981). Production of L-Phenylalanine from trans-Cinnamic Acid with *Rhodotorula glutinis* Containing L-Phenylalanine Ammonia-Lyase Activity. Applied and Environmental Microbiology 42:773-778.