



*“Obtención, caracterización y aplicación de un biocatalizador para la reducción del contenido de fenilalanina en hidrolizados proteicos”.*

---

Tesis de doctorado

**MARÍA TERESITA CASTAÑEDA**

Presentada ante la Facultad de Ingeniería de la  
Universidad Nacional de La Plata como requisito para la  
obtención del grado académico de

**DOCTOR EN INGENIERIA**

**Dirección de tesis:**

*Dr. Roque Hours*

*Dr. Carlos Mignone.*

*Emeritus Professor Dr. Osao Adachi*

**Jurados de tesis:**

*Dra. Noemí Zaritzky*

*Dr. Luis Emilio Iglesias*

*Dr. Javier Breccia*

Marzo de 2016



*A Dios y a mis seres queridos*



# Agradecimientos

---

Quisiera agradecer primeramente a Dios por acompañarme en este viaje e iluminar mi camino.

A mi padres y hermanos, los de sangre y los del corazón, por apoyarme en todas mis decisiones y alentarme a no bajar los brazos ante las dificultades.

A Martín, el amor de mi vida, mi soporte, mi alegría y la fuerza que me impulsa en cada proyecto nuevo que encaro.

A todas aquellas personas que ya no están conmigo pero marcaron mi vida y siempre vivirán en mi corazón.

A mi director Roque por confiar en mí y en especial a mi director Carlos, quien fue mi mentor y amigo durante gran parte del desarrollo de la tesis.

Al sensei, por su visión, por su amistad y su ayuda, en especial durante mi estadía de investigación en su laboratorio en Japón.

A los miembros del CINDEFI, principalmente del laboratorio 1 por bancarme todos estos años, por ayudarme cada vez que lo necesité y por tantos momentos cotidianos que no olvidaré.

Finalmente quisiera agradecer a mis amigos, dispersos en cada ciudad o país que viví, por cada palabra de aliento y por esos momentos que vale la pena recordar.

A todos ellos... Muchas Gracias!!!



# Resumen

---

En la presente tesis se aborda el estudio y desarrollo de una metodología biotecnológica novedosa para la producción de fórmulas o suplementos alternativos para pacientes con fenilcetonuria. Dicha metodología se basa en el empleo de un biocatalizador, particularmente de la enzima L-Fenilalanina amonio liasa (PAL, EC 4.3.1.25), producida a partir del cultivo de *Rhodospiridium toruloides* NBRC 0559. PAL cataliza la desaminación no oxidativa de L-Fenilalanina (L-Phe) en ácido *trans*-cinámico. Esta enzima fue aplicada para la reducción o deprivación del contenido de fenilalanina, empleando como modelo hidrolizados proteicos comerciales de diferente origen.

La metodología desarrollada consiste de una primera etapa basada en la obtención del biocatalizador. Ésta incluyó, por un lado, la optimización de los componentes del medio de cultivo a emplear, mediante diseños experimentales, con la finalidad de incrementar la actividad PAL. Seguidamente, se procedió a la recuperación del biocatalizador de dos maneras. Por un lado, se obtuvieron células conteniendo PAL, las cuales se permeabilizaron adecuadamente para funcionar como un microreactor y se caracterizaron como tal. Por otro lado, se contrastó el biocatalizador obtenido con PAL purificada, obtenida a partir de un protocolo estándar de purificación.

En una segunda etapa, se inmovilizaron las células catalíticas por inclusión en polímeros, empleando alginato de calcio. Las mismas se caracterizaron para determinar su factibilidad de uso, teniendo en cuenta su potencial aplicación industrial. A su vez, este sistema se contrastó con la enzima purificada inmovilizada por inclusión en membranas celulósicas.

Finalmente, en una tercera etapa, el biocatalizador seleccionado se empleó en el tratamiento de hidrolizados proteicos comerciales, como modelo de aplicación. A su vez, se empleó como alternativa PAL parcialmente purificada, libre en solución. De acuerdo al biocatalizador, se evaluó la necesidad del pretratamiento de los sustratos, así como también, las condiciones óptimas de operación para lograr la mayor reducción en menor tiempo.

A partir de los estudios llevados a cabo en la presente tesis, se logró demostrar la factibilidad del método propuesto, en la reducción del contenido de L-Phe en hidrolizados proteicos. Estos estudios son la base para el desarrollo de fórmulas para pacientes con fenilcetonuria, obtenidas por métodos biotecnológicos. Futuros estudios requerirán un abordaje más tecnológico a escala piloto para su transferencia a la industria local.

# Abstract

---

This thesis addresses the study and development of a novel biotechnological method for the production of alternative ingredients or formulas for PKU patients. This methodology consists in the use of a biocatalyst, particularly, the enzyme L-Phenylalanine ammonia lyase (PAL, EC 4.3.1.25) from *Rhodospiridium toruloides* NBRC 0559. PAL catalyzes the non oxidative deamination of L-Phenylalanine into *trans*-cinnamic acid. This enzyme is applied in the current thesis for the reduction or deprivation of L-phenylalanine in commercially available protein hydrolysates.

The methodology proposed consists of a first stage based on biocatalyst obtention. First, in order to enhance PAL activity, the components of the culture medium were optimized by using several experimental designs. After cultivation, the biocatalyst was obtained by two different strategies: a) catalytic cells containing PAL were recovered from culture medium and then permeabilized with the aim of using them as a microreactor; b) PAL extract obtained from cell disruption was purified using a standard protocol.

In a second stage, the catalytic cells were immobilized by inclusion into polymers, using calcium alginate. This biocatalyst was compared with purified PAL immobilized by retention into cellulose membranes. In both cases the alternatives were characterized to determine its feasibility of use given its potential industrial application.

Finally, in a third step, the selected biocatalyst was employed in the treatment of commercially available protein hydrolysates, as model of its application. As an alternative approach, partially purified PAL was evaluated for the intended propose. Under each treatment, we evaluated the need for pretreatment of substrates as well as the optimum operating conditions to achieve the highest reduction in the shortest time.

From the obtained results, discussed in this thesis, it was demonstrated the feasibility of the proposed process for the reduction of L-Phe content in protein hydrolysates. These studies are the preliminary knowledge for the generation of substitutes or formulas for patients with PKU, using a biotechnological method.

Future studies require a technological approach in a pilot scale to transfer this knowledge to local industry.

# Nomenclatura

---

## Abreviaturas

5HT	5-hidroxitriptófano
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ala	Alanina
Alg-Ca	Alginato de calcio
AN	Nitrógeno amino
ARN	Ácido ribonucleico
BH4	(6R)-L-eritro-5,6,7,8-tetrahidrobiopterina
CAA	Código alimentario argentino
CAAS	Casaminoácidos
CAH	Hidrolizado ácido de caseína
CBH	Hidrolizado de soja y caseína
CPC	Cloruro de cetilpiridinio
CTAB	Bromuro de cetiltrimetilamonio
DH	Grado de hidrólisis
DHPR	Dihidropterina reductasa
DOE	Diseño de experimentos
E	Enzima
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EI	Complejo enzima-inhibidor
EL	Extracto de levadura
EP	Complejo enzima-producto
ES	Complejo enzima-sustrato
ES <sup>‡</sup>	Complejo activado
ESI	Complejo enzima-sustrato-inhibidor
FC	Fuente de carbono
FCE	Fuente de carbono y energía
FDA	Food and drugs administration
FN	Fuente de nitrógeno
Gly	Glicina
GMP	Glicomacropéptidos

HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
I	Inhibidor
IEF	Isoelectroenfoque
L -DOPA	3, 5 - dihidroxifenilalanina
L-Ile	L-isoleucina
LNAA	Aminoácidos neutros de cadena larga
L-Phe	L-Fenilalanina
L-Tyr	L-Tirosina
mHPA	Hiperfenilalaninemia leve
MIO	3,5-dihidro-5-metilidene-4H-imidazol-4-one
NBRC	NITE Biological Resource center
P	Producto
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
PAH	L-Fenilalanina hidroxilasa
PAL	L-Fenilalanina amonio-liasa
<i>p</i> -CA	Ácido <i>p</i> -cumárico
PKU	Fenilcetonuria
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
qBH2	Dihidrobiopterina
R	Residuo de aminoácidos
RSM	Metodología de superficie respuesta
S	Sustrato
S <sup>‡</sup>	Estado transitorio de la reacción no catalizada
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes
Ser	Serina
<i>t</i> -CA	Ácido <i>t</i> -cinámico
TCA	Ácido tricloroacético
TLC	Cromatografía en capa fina
TN	Nitrógeno total
TS	Tripticasa de soja

### **Unidades**

μg	Microgramo
μl	Microlitro

$\mu\text{mol}$	Micromol
$^{\circ}\text{C}$	Grado Celsius
cm	Centímetro
Cmol	Carbono mol
cP	Centipoise
dl	Decilitro
g	Gramo
kDa	Kilo Dalton
kg	Kilogramo
l	Litro
M	Molar
mg	Miligramo
min	Minuto
ml	Mililitro
mM	Milimolar
mmol	Milimol
mU	Miliunidades enzimáticas
UE	Unidad enzimática

### **Variables**

$\varepsilon$	Coefficiente de extinción molar
$\gamma$	Grado de reducción
$\alpha$	Nivel de significancia
$\mu$	Velocidad específica de producción de biomasa
$\alpha^*$	Nivel de significancia ajustado de Sidak
$\beta_0$	Contante del modelo
$\beta_i$	Coefficiente lineal del modelo
$\beta_{ii}$	Coefficiente cuadrático del modelo
$\beta_{ij}$	Coefficiente de las interacciones del modelo
a	Factor de conversión de unidades
AE	Actividad enzimática
AER	Actividad enzimática relativa
$a_w$	Actividad acuosa

$b$	Espesor de la cubeta
$df$	Grado de libertad
DO	Densidad óptica
$e$	Residuo
$E_x$	Efecto de un factor
$f_d$	Factor de dilución
$H_{bh}$	Humedad en base húmeda
$k$	Número de factores
$K_m^*$	Constante aparente en presencia de un inhibidor
$k_{cat}$	Constante de formación de P a partir de ES en estado estacionario
$K_i$	Constante de inhibición
$K_m$	Constante de Michaelis-Menten
ME	Margen de error
N	Número de experimentos
Q	Calor
$SE$	Error estándar
SME	Margen de error simultáneo
SS	Suma de cuadrados total
$SS_{resid}$	Suma de cuadrados de los residuos
$t$	Estadístico $t$
$T_d$	Tiempo de duplicación celular
$v$	Velocidad inicial
$v_{max}^*$	Velocidad máxima aparente en presencia de un inhibidor
$V_f$	Volumen total de mezcla de reacción
$V_i$	Volumen de muestra
$v_{max}$	Velocidad máxima
$w_s$	Peso seco
$w_w$	Peso de agua
X	Biomasa
$x_i$	Factores del diseño experimental
$y$	Variable respuesta del modelo del diseño experimental
$\Delta G$	Energía libre de reacción

# Índice general

---

<b>Agradecimientos</b>	<b>V</b>
<b>Resumen</b>	<b>VII</b>
<b>Abstract</b>	<b>IX</b>
<b>Nomenclatura</b>	<b>XI</b>
<b>I. Preliminares</b>	<b>1</b>
<b>1. Prólogo</b>	<b>3</b>
1.1. Motivaciones de la tesis .....	3
1.2. Objetivos .....	5
1.3. Organización de la tesis.....	5
1.4. Aportes realizados .....	7
<b>2. Introducción general</b>	<b>11</b>
2.1. Biocatalizadores .....	11
2.1.1. Conceptos generales .....	11
2.1.2. Estructura de las enzimas .....	12
2.1.3. Clasificación y nomenclatura de las enzimas.....	13
2.1.4. Mecanismo catalítico de las enzimas .....	14
2.1.5. Cinética enzimática .....	16
2.1.5.1. Cinética enzimática con un único sustrato .....	16
2.1.5.2. Cinética enzimática con múltiples sustratos.....	20
2.1.5.3. Determinación de parámetros cinéticos .....	24
2.1.5.4. Cinética enzimática con inhibición .....	25
2.1.6. Obtención de enzimas microbianas .....	29
2.1.7. Aplicación industrial de enzimas .....	31
2.2. L-Fenilalanina-amonio liasa .....	33
2.2.1. Descripción general.....	33
2.2.2. Estructura y propiedades de PAL.....	35
2.2.3. Mecanismo de catálisis de PAL .....	36
2.2.4. Características cinéticas de PAL .....	38
2.2.5. Producción biotecnológica de PAL.....	39

2.2.6. Aplicaciones de PAL .....	40
2.3. Fenilcetonuria .....	42
2.3.1. Etiología de la enfermedad .....	42
2.3.2. Clasificación .....	43
2.3.3. Sintomatología .....	44
2.3.4. Detección .....	45
2.3.5. Tratamiento .....	47
2.3.6. Nuevas alternativas terapéuticas .....	49
<b>II. Obtención del biocatalizador</b> .....	<b>53</b>
<b>3. Optimización del medio de cultivo para la producción de PAL</b> .....	<b>55</b>
3.1. Objetivos .....	55
3.2. Fundamentos .....	55
3.2.1. Nutrición microbiana .....	55
3.2.2. Medio de cultivo .....	58
3.2.2.1. Diseño del medio de cultivo .....	58
3.2.2.2. Formulación del medio de cultivo .....	59
3.2.2.3. Optimización del medio de cultivo .....	62
3.2.3. Diseño de experimentos .....	63
3.2.3.1. Definición .....	63
3.2.3.2. Diseño factorial fraccionado .....	64
3.2.3.3. Diseño factorial completo .....	65
3.2.3.4. Metodología de superficie respuesta (RSM) .....	66
3.2.3.5. Análisis de los resultados .....	67
3.2.3.6. Grado de ajuste de los modelos .....	70
3.3. Metodología .....	71
3.3.1. Mantenimiento y propagación de la cepa .....	71
3.3.2. Determinación de la actividad PAL .....	72
3.3.3. Estrategias de inducción de PAL .....	73
3.3.4. Efecto de la FCE y la FN en la actividad PAL .....	76
3.3.5. Optimización de los componentes del medio de cultivo .....	77
3.3.5.1. Diseño factorial fraccionado .....	77
3.3.5.2. Diseño factorial completo .....	79
3.3.5.3. Optimización por diseño de Doehlert .....	80

3.3.5.4. Optimización global alcanzada .....	81
3.4. Resultados y Discusión .....	82
3.4.1. Estudio de inducción de PAL.....	82
3.4.2. Efecto de la FCE y FN en la actividad PAL .....	85
3.4.2.1. Efecto de diversas FCE en la actividad PAL .....	85
3.4.2.1. Efecto de diversas FN en la actividad PAL.....	89
3.4.3. Optimización de los componentes del medio de cultivo.....	91
3.4.3.1. Diseño factorial fraccionado .....	91
3.4.3.2. Diseño factorial completo .....	94
3.4.3.3. Optimización por diseño de Doehlert.....	96
3.4.3.4. Optimización global alcanzada .....	100
<b>4. Recuperación y caracterización del biocatalizador</b> .....	<b>103</b>
4.1. Objetivos .....	103
4.2 Fundamentos .....	103
4.2.1 Diseño del bioproceso .....	103
4.2.2. Downstream del proceso .....	104
4.2.3. Recuperación del biocatalizador .....	105
4.2.3.1 Separación de las células del medio de cultivo .....	106
4.2.3.2. Disrupción celular .....	107
4.2.3.3. Permeabilización celular .....	108
4.2.3.4. Concentración del extracto enzimático .....	109
4.2.4. Purificación del biocatalizador.....	110
4.2.4.1. Cromatografía.....	112
4.2.4.2. Cristalización.....	113
4.2.4.3. Control de las etapas de purificación .....	114
4.2.5. Formulación del biocatalizador .....	114
4.3 Metodología.....	116
4.3.1. Diseño del proceso .....	116
4.3.2. Obtención y caracterización de células catalíticas .....	117
4.3.2.1. Obtención de células catalíticas .....	117
4.3.2.2. Permeabilización y conservación de células catalíticas ...	117
4.3.2.3. Caracterización de las células catalíticas .....	118
4.3.3. Obtención y caracterización de PAL purificada.....	121
4.3.3.1. Protocolo de purificación de PAL.....	121

4.3.3.2. Caracterización de PAL purificada.....	123
4.4. Resultados y Discusión.....	125
4.4.1. Caracterización de células catalíticas .....	125
4.4.1.1. Permeabilización de células conteniendo PAL.....	125
4.4.1.2. Efecto de la concentración celular en la bioconversión....	127
4.4.1.3. Cinética de bioconversión de L-Phe en <i>t</i> -CA .....	128
4.4.1.4. Efecto de la temperatura en las células catalíticas libres..	129
4.4.1.5. Estabilidad durante el almacenamiento .....	130
4.4.2. Caracterización de PAL purificada.....	132
4.4.2.1. Actividad enzimática de la enzima purificada.....	132
4.4.2.2. Efecto de la concentración del biocatalizador en <i>v</i> .....	133
4.4.2.3. Caracterización cinética de la enzima pura .....	134
4.4.2.4. Temperatura óptima de la enzima pura .....	135
<b>III. Caracterización del biocatalizador inmovilizado</b>	<b>137</b>
<b>5. Inmovilización y caracterización del biocatalizador</b>	<b>139</b>
5.1. Objetivos.....	139
5.2 Fundamentos.....	139
5.2.1. Biocatalizadores inmovilizados .....	139
5.2.2. Ventajas y desventajas de la inmovilización de enzimas .....	140
5.2.3. Métodos de inmovilización.....	142
5.2.4. Tipos de biorreactores para biocatalizadores inmovilizados .....	145
5.2.5. Efectos de la inmovilización sobre el biocatalizador.....	146
5.2.6. Antecedentes de inmovilización de PAL.....	148
5.3. Metodología .....	150
5.3.1. Inmovilización de células catalíticas .....	150
5.3.2. Caracterización de las células catalíticas inmovilizadas.....	152
5.3.2.1 Efecto de la concentración de biocatalizador .....	152
5.3.2.2 Cinética del biocatalizador inmovilizado .....	153
5.3.2.3. Efecto de la temperatura en las células inmovilizadas .....	154
5.3.2.4. Reutilización de las células catalíticas inmovilizadas .....	155
5.3.4 Conservación de las células catalíticas inmovilizadas.....	155
5.3.5 Inmovilización de PAL pura por inclusión en membrana .....	156
5.3.6. Utilización de PAL pura inmovilizada .....	157

5.3.6.1. Bioconversión en columna con recirculación .....	157
5.3.6.2. Bioconversión en tanque agitado .....	158
5.4. Resultados y Discusión .....	159
5.4.1. Células catalíticas inmovilizadas en Alg-Ca .....	159
5.4.1.1. Características del biocatalizador obtenido.....	159
5.4.1.2 Efecto de la concentración del biocatalizador.....	160
5.4.1.3 Cinética del biocatalizador inmovilizado .....	161
5.4.1.4. Efecto de la temperatura en las células inmovilizadas ....	163
5.4.1.5. Reutilización de las células catalíticas inmovilizadas.....	165
5.4.1.6. Conservación de las células catalíticas inmovilizadas.....	167
5.4.2. Enzima pura inmovilizada por inclusión en membrana .....	170
5.4.2.1. Bioconversión en columna con recirculación .....	170
5.3.6.2. Bioconversión en tanque agitado .....	172
<b>IV. Aplicación del biocatalizador</b>	<b>175</b>
<b>6. Empleo de PAL en la reducción de L-Phe en hidrolizados proteicos</b>	<b>177</b>
6.1. Objetivos .....	177
6.2 Fundamentos .....	177
6.2.1. Hidrolizados proteicos: generalidades .....	177
6.2.2. Propiedades de los hidrolizados proteicos .....	178
6.2.3. Fuentes proteicas para la obtención de hidrolizados.....	180
6.2.4. Tipos de hidrólisis proteica .....	180
6.2.5. Proceso de obtención de hidrolizados proteicos.....	182
6.2.6. Aplicaciones de los hidrolizados proteicos .....	185
6.2.7. Hidrolizados proteicos en la dieta de pacientes con PKU.....	186
6.3. Metodología.....	187
6.3.1. Empleo de PAL parcialmente purificada .....	187
6.3.1.1. Determinación de actividad en sustratos complejos .....	187
6.3.1.2. Optimización de las variables de reacción .....	188
6.3.1.3. Cinética de reacción en condiciones óptimas.....	190
6.3.1.4. Efecto de las proteasas en la bioconversión.....	191
6.3.1.5. Bioconversión de L-Phe en hidrolizados proteicos .....	192
6.3.2. Aplicación del biocatalizador inmovilizado.....	193
6.3.2.1. Pretratamiento de los sustratos proteicos .....	193

6.3.2.2. Bioconversión de L-Phe en hidrolizados proteicos .....	194
6.4. Resultados y Discusión.....	195
6.4.1. Empleo de PAL parcialmente purificada.....	195
6.4.1.1. Optimización de las variables de reacción.....	195
6.4.1.2. Cinética de reacción en condiciones óptimas .....	201
6.4.1.3. Efecto de las proteasas en la bioconversión .....	202
6.4.1.4. Bioconversión de L-Phe en hidrolizados proteicos .....	203
6.4.2. Aplicación del biocatalizador inmovilizado .....	205
6.4.2.1. Cinética de bioconversión.....	205
6.4.2.2. Bioconversión en sustratos complejos.....	206
<b>V. Conclusiones</b>	<b>209</b>
<b>7. Conclusiones y proyecciones</b>	<b>211</b>
7.1. Conclusiones generales.....	211
7.2. Conclusiones particulares .....	212
7.2. Proyecciones futuras .....	214
<b>Bibliografía</b>	<b>217</b>
<b>Anexos</b>	<b>231</b>
A1. Correlación DO <sub>660</sub> - peso seco .....	233
A2. Recuento en cámara de Neubauer .....	235
A3. Curva de calibración de glucosa .....	237
A4. Determinación de $\mu$ y T <sub>d</sub> .....	239

# Índice de figuras

---

2.1 Mecanismo de funcionamiento de los catalizadores [9] .....	11
2.2. Enzimas que requieren cofactores (a) y coenzimas (b) [8] .....	15
2.3. Diagrama energético de una reacción catalizada por enzimas [12] .....	16
2.4. Formación de producto en una reacción catalizada por enzimas [12] .....	17
2.5. Cinética de Michaelis-Menten [12] .....	19
2.6. Mecanismo secuencial ordenado [8] .....	21
2.7. Mecanismo secuencial al azar [8] .....	22
2.8. Mecanismo ping-pong [8] .....	23
2.9. Linealización de Lineweaver-Burk [12] .....	24
2.10. Inhibición competitiva [19] .....	26
2.11. Inhibición acompetitiva [19] .....	27
2.12. Inhibición no competitiva [19] .....	28
2.13. Obtención de enzimas microbianas y downstream del proceso [8] .....	31
2.14. Reacciones catalizadas por PAL (EC 4.3.1.25) .....	33
2.15. Ruta general de los fenilpropanoides [27] .....	34
2.16. Estructura tridimensional de PAL de <i>R. toruloides</i> [36] .....	35
2.17. Mecanismo de catálisis de PAL [42] .....	36
2.18. Síntesis de MIO [45] .....	37
2.19. Mecanismo propuesto para el papel de MIO en la catálisis [49] .....	37
2.20. Cultivo en medio sólido de <i>R. toruloides</i> [64] .....	40
2.21. Reacción catalizada por PAH [74] .....	42
2.22. Test de Guthrie [84] .....	46
3.1. Experimentos para diseño factorial fraccionado de tres factores [102] ....	64
3.2. Experimentos para diseño factorial completo de tres factores [102] .....	66
3.3. Diseño hexagonal de Doehlert .....	67
3.4. Interpretación gráfica de los diseños factoriales [101] .....	70
3.5. Propagación de <i>R. toruloides</i> en medio sólido .....	72
3.6. Curva de crecimiento durante inducción de PAL .....	83
3.7. Evolución de pH durante inducción de PAL .....	83

3.8. Inducción de PAL en cultivo batch .....	84
3.9. Evolución del pH durante el cultivo empleando diferentes FCE .....	87
3.10. Gráfico de probabilidad semi-normal para diseño de Plackett-Burman..	93
3.11. Gráfico de probabilidad semi-normal para diseño factorial completo ....	96
3.12. Gráfico de contorno de la influencia del Mg y t en la AE de PAL .....	98
3.13. Efecto del Mg <sup>+2</sup> en la biosíntesis de PAL.....	99
3.14. Efecto del Mg <sup>+2</sup> en la estabilización de PAL .....	100
4.1. Alternativas de obtención del PAL.....	116
4.2. Cultivo sumergido de <i>R. toruloides</i> .....	117
4.3. Incubación de las muestras a temperatura variable .....	120
4.4. Protocolo de obtención de la enzima parcialmente purificada .....	121
4.5. Protocolo de obtención de la enzima purificada.....	122
4.6. Permeabilización de células conteniendo PAL .....	125
4.7. Espectrograma de <i>t</i> -CA formado .....	126
4.8. Efecto de la concentración celular en la bioconversión .....	127
4.9. Cinética de bioconversión empleando células catalíticas.....	128
4.10. Efecto de la temperatura en la estabilidad de las células catalíticas.....	129
4.11. Temperatura óptima de las células catalíticas .....	130
4.12. Cinética de pérdida de actividad durante el almacenamiento.....	131
4.13. Influencia de la concentración de PAL en la velocidad inicial .....	133
4.14. Cinética de PAL pura .....	134
4.15. Linealización de Lineweaver-Burk para PAL pura.....	135
4.16. Temperatura óptima para PAL pura .....	136
5.1. Métodos de inmovilización de biocatalizadores.....	142
5.2. Tipos de biorreactores para biocatalizadores inmovilizados [117] .....	145
5.3. Barreras difusionales del biocatalizador inmovilizado [14].....	147
5.4. Sistema de inmovilización de células catalíticas .....	150
5.5. Células catalíticas inmovilizadas en Alg-Ca .....	151
5.6. Utilización de columna con recirculación para células inmovilizadas.....	153
5.7. Ensayo de temperatura óptima para el biocatalizador inmovilizado.....	154
5.8. PAL pura inmovilizada en columna con recirculación .....	157
5.9. Efecto de la cantidad de biocatalizador inmovilizado .....	160
5.10. Cinética de reacción empleando el biocatalizador inmovilizado .....	161
5.11. Bioconversión en columna empleando el biocatalizador inmovilizado ..	162

5.12. Termoestabilidad del biocatalizador inmovilizado .....	163.
5.13. Temperatura óptima del biocatalizador inmovilizado.....	164
5.14. Reutilización del biocatalizador .....	165
5.15. Degradación del biocatalizador del sexto uso .....	166
5.16. Deshidratación del biocatalizador inmovilizado .....	167
5.17. Biocatalizador inmovilizado rehidratado .....	168
5.18. Cinética de reacción con PAL pura inmovilizada en columna .....	170
5.19. Reducción de L-Phe con PAL pura inmovilizada en columna.....	171
5.20. Cinética de reacción con PAL pura inmovilizada en tanque agitado.....	172
5.21. Reducción de L-Phe con PAL inmovilizada en tanque agitado .....	173
5.22. Efecto de la cantidad de enzima en la cinética de PAL inmovilizada ....	174
6.1. Proceso de obtención de hidrolizados proteicos .....	182
6.2. Gráfico de contorno de la influencia del CAH y PAL en la DO <sub>290</sub> .....	197
6.3. Efecto de la concentración de PAL en la DO <sub>290</sub> .....	198
6.4. Gráfico de contorno de la influencia de temperatura y pH en la DO <sub>290</sub> ....	200
6.5. Cinética de reacción de PAL en condiciones óptimas .....	201
6.6. TLC para identificar los productos de reacción .....	202
6.7. Cinética de reacción con sustratos complejos.....	205
6.8. Cromatograma de TS tratada con el biocatalizador inmovilizado .....	206
A1. Curva de calibración DO <sub>660</sub> y peso seco .....	233
A2. Cámara de Neubauer .....	235
A3. Zona de recuento de la cámara de Neubauer.....	236
A4. Curva de calibración de glucosa.....	237



# Índice de tablas

---

2.1. Métodos de linealización de la ecuación de Michaelis-Menten.....	25
2.2. Aplicaciones industriales de las enzimas .....	32
2.3. Propiedades de PAL de <i>R. toruloides</i> .....	36
2.4. Incidencia de PKU a lo largo del mundo [78,79].....	43
2.5. Guía de administración de dieta para pacientes con PKU [76].....	48
3.1. Composición estándar de los microorganismos [99] .....	60
3.2. Peso del C-mol de diferentes compuestos.....	60
3.3. Grado de reducción de algunos compuestos .....	61
3.4. Primera línea de la matriz de Plackett-Burman.....	65
3.5. Determinación del signo de las interacciones entre factores .....	68
3.6. Medio de mantenimiento de la cepa [52].....	71
3.7. Medio estándar para crecimiento de levaduras [109] .....	75
3.8. FCE testeadas para la producción de PAL.....	76
3.9. Factores y niveles a analizar en el diseño de Plackett-Burman .....	77
3.10. Matriz de Plackett-Burman para k=11 y N=12.....	78
3.11. Matriz para factorial completo 2k.....	79
3.12. Diseño hexagonal de Doehlert para [Mg <sup>+2</sup> ] vs. tiempo de cultivo. ....	80
3.13. Estudio del efecto del Mg <sup>+2</sup> en la actividad PAL.....	81
3.14. Medio complejo óptimo reportado por Yamada <i>et al.</i> [52] .....	81
3.15. Influencia de las diversas FCE en la productividad de biomasa.....	86
3.16. Influencia de diversas FCE en la actividad PAL .....	88
3.17. Influencia de diversas FN en la productividad de biomasa.....	90
3.18. Influencia de diversas FN en la actividad PAL.....	90
3.19. Datos del cultivo del diseño de Plackett Burman.....	91
3.20. Análisis de resultados del diseño de Plackett-Burman (R <sup>2</sup> = 0,904) .....	92
3.21. Algoritmo de Dong aplicado al diseño de Plackett-Burman.....	93
3.22. Datos del cultivo del diseño factorial completo .....	94
3.23. Análisis de resultados del diseño factorial completo (R <sup>2</sup> = 0,973) .....	95
3.24. Algoritmo de Dong aplicado al diseño factorial completo .....	95
3.25. Resultados obtenidos a partir de RMS .....	97

3.26. Significancia de los factores analizados por RMS ( $R^2=0,942$ ) .....	97
3.27. Coeficientes de regresión para RMS .....	98
3.28. Contraste de medio óptimo con medio de referencia .....	101
4.1. Actividad de PAL con diferente grado de pureza.....	132
5.1. Características del biocatalizador obtenido .....	159
5.2. Actividad relativa el biocatalizador deshidratado .....	168
6.1. Proteasas comerciales más comúnmente empleadas [9] .....	182
6.2. Diseño de Doehlert para optimización de CAH vs. PAL.....	189
6.3. Diseño de Doehlert para optimización de temperatura vs. pH.....	190
6.4. Hidrolizados proteicos empleados.....	192
6.5. Sustratos proteicos empleados en la bioconversión de PAL .....	194
6.6. Resultados obtenidos a partir de RMS de CAH vs. PAL .....	195
6.7. Significancia de CAH y PAL, analizados por RMS ( $R^2=0,9823$ ).....	196
6.8. Coeficientes de regresión para RMS de CAH y PAL .....	196
6.9. Resultados obtenidos a partir de RMS de temperatura vs. pH.....	198
6.10. Significancia de temperatura y pH, analizados por RMS ( $R^2=0,9842$ )..	199
6.11. Coeficientes de regresión para RMS de temperatura y pH .....	199
6.12. Mejora alcanzada mediante la optimización de la temperatura y el pH ..	200
6.13. Tratamiento con inhibidores de proteasas .....	203
6.14. Bioconversión en sustratos proteicos con PAL parcialmente purificada	204
6.15. Bioconversión en sustratos proteicos con células inmovilizadas .....	206

# Parte I

## *Preliminares*



# Capítulo 1

## Prólogo

---

### 1.1. Motivaciones.

Las anomalías congénitas, entendiéndose como tales las alteraciones estructurales o funcionales del organismo manifestadas desde el nacimiento, tienen una tasa de ocurrencia en nuestro país del 3% [1]. En las últimas décadas, dichas anomalías han adquirido interés debido a que son la mayor causa de mortalidad infantil en nuestro país, incrementándose desde un 11% en 1980 hasta el 26% en 2012 [2]. Adicionalmente, muchas de ellas pueden afectar severamente la calidad de vida de los pacientes, ya sea por secuelas físicas, mentales o psicológicas. Por estas razones, es que resulta primordial el diagnóstico precoz a fin de que el paciente pueda acceder al tratamiento oportuno, de acuerdo al caso.

Existen diversas causas que pueden ocasionar las anomalías congénitas. En forma general, estas pueden agruparse en factores genéticos, ambientales o bien combinación de ambos. Dentro de las anomalías congénitas de origen genético se encuentran las anomalías metabólicas, en las cuales el metabolismo del organismo se ve alterado funcionalmente por interrupción del proceso biológico normal.

La fenilcetonuria (PKU) es un desorden metabólico congénito de origen genético, causado por la deficiencia en el funcionamiento de la enzima fenilalanina hidroxilasa, principal responsable del metabolismo de la fenilalanina. Como consecuencia de esta alteración, la fenilalanina se acumula en el torrente sanguíneo, ocasionando un serio deterioro a nivel neurológico. Con el objetivo de evitar daños degenerativos a corto y largo plazo, los pacientes afectados deben seguir una estricta dieta, baja o libre en fenilalanina (dependiendo la severidad), la cual excluye de la dieta alimentos proteicos como la carne, pescado, huevo, lácteos e incluso algunas legumbres y cereales. Debido a que el paciente requiere proteínas para el desarrollo normal del organismo, debe suplementar la dieta con formulaciones que suministren los aminoácidos esenciales requeridos.

En Argentina nacen aproximadamente 1 de cada 10000 niños con fenilcetonuria clásica o hiperfenilalaninemias [3]. A partir del año 1986, gracias a la sanción de la ley 23413, es obligatorio la realización de pruebas de rastreo de esta patología en todos los recién nacidos [4]. Esta ley permitió el diagnóstico precoz del recién nacido, pudiendo someterlo a un tratamiento en forma inmediata y previniendo, de este modo, el avance de la enfermedad. El costo del tratamiento, entendiéndose como tal la ingesta de fórmulas y sustitutos dietarios, quedaba a cargo del paciente. Recién en el año 2007 se sancionó la ley 26279 de pesquisa neonatal la cual no sólo reglamentó la detección de esta anomalía junto con otras, sino que también obliga a las obras sociales a cubrir el abordaje terapéutico de las mismas [4]. Dicha ley fue finalmente reglamentada por el Poder Ejecutivo en el año 2014, permitiendo que los pacientes puedan acceder a reintegros por parte de las obras sociales. Sin embargo, por medio de la comunicación personal con los padres de pacientes con PKU se sabe que, a pesar de la ley, no todas las obras sociales se hacen cargo del costo total de las fórmulas y suplementos dietarios. Además, se debe tener en cuenta que existen muchas de familias de pacientes sin obra social, las cuales deben hacerse cargo del 100% de los costos del tratamiento [5]. Esta problemática se ve agravada por el hecho de que las fórmulas y tratamientos alternativos no están disponibles en la mayoría de los países subdesarrollados o en vías desarrollo, y en aquellos que si lo están, tienen costos muy elevados, perjudicando seriamente la economía familiar de los pacientes [6, 7].

Entre las empresas farmacéuticas más importantes que comercializan fórmulas para pacientes con PKU en nuestro país se encuentran Nutricia Bago y B'life. Ambas cuentan con una serie de productos especialmente formulados para PKU, los cuales se fabrican en el exterior y se fraccionan y comercializan en nuestro país. La escasa o nula producción nacional de fórmulas o sustitutos, sumado a los elevados costos de las mismas, requieren el abordaje de soluciones más prácticas, económicas y fácilmente aplicables en las industrias locales.

En función de lo expresado anteriormente, la motivación de la siguiente tesis fue desarrollar una metodología biotecnológica para la producción de sustitutos dietarios para pacientes con PKU. Este desarrollo deberá estar dirigido a su potencial aplicación en la industria local, por ende debe priorizarse la factibilidad técnica y económica de dicha metodología.

## 1.2. Objetivos.

En base a la motivación antes descrita, el objetivo general de la presente tesis es desarrollar y caracterizar un biocatalizador conteniendo L-Fenilalanina amonio liasa (PAL), obtenida a partir de *Rhodospiridium toruloides*, con la finalidad de emplearlo en la reducción del contenido de L-fenilalanina en hidrolizados proteicos.

A partir de este objetivo general, se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Optimizar la producción de la enzima, variando los componentes del medio de cultivo.
- Obtener y caracterizar el biocatalizador, consistente en células catalíticas permeabilizadas, y utilizar la enzima purificada como referencia.
- Inmovilizar el biocatalizador obtenido, caracterizarlo y contrastarlo con sistemas convencionales de inmovilización de la enzima pura.
- Aplicar el biocatalizador obtenido y, alternativamente la enzima parcialmente purificada, en la reducción del contenido de L-fenilalanina en hidrolizados proteicos.

## 1.3. Organización de la tesis.

Como se expresa en el título de la presente tesis, existen tres pilares fundamentales para el desarrollo y empleo de un biocatalizador: la obtención del mismo, su caracterización y su aplicación para los fines previamente descritos. Partiendo de estos tres ejes, la presente tesis se estructura en cinco partes. La Parte I se trata de capítulos preliminares en los cuales se presentará la tesis y a su vez se desarrollará el “estado del arte” para el abordaje general de la misma. En la Parte II se describirá la obtención del biocatalizador, entendiéndose como tal la producción, mantenimiento y adaptación de la enzima para su uso práctico. Seguidamente pasaremos a la Parte III donde se analizarán dos tecnologías de inmovilización, se caracterizarán ambos sistemas y se optará por la tecnología más apta para los fines propuestos. Luego, en la Parte IV se aplicará dicho biocatalizador en la reducción de L- fenilalanina en hidrolizados proteicos de diversa naturaleza. Finalmente, la Parte V de la tesis abordará las conclusiones

generales y particulares de cada pilar del trabajo, junto con las proyecciones del mismo.

Habiendo dicho esto, se presenta en detalle la organización de la presente tesis:

#### **I. PRELIMINARES**

- **Capítulo 1. Prólogo:** se describen las motivaciones de la tesis, los objetivos generales y específicos, la organización estructural de la tesis y los aportes científicos realizados a partir de la misma.
- **Capítulo 2. Introducción general:** se introducen los conceptos generales que hacen al “estado del arte” de la temática propuesta.

#### **II. OBTENCIÓN DEL BIOCATALIZADOR**

- **Capítulo 3. Optimización del medio de cultivo para la producción de PAL:** Se analiza la influencia de la fuente de carbono y nitrógeno, así como también la de los macro y micronutrientes en la actividad PAL, empleando diseños experimentales.
- **Capítulo 4. Recuperación y caracterización del biocatalizador:** Se describen dos técnicas de recuperación del biocatalizador para su posterior uso. Una de ellas es el empleo de la célula permeabilizada como soporte de la enzima y la otra, es la extracción y purificación de la enzima deseada.

#### **III. CARACTERIZACIÓN DEL BIOCATALIZADOR INMOVILIZADO**

- **Capítulo 5. Inmovilización y caracterización del biocatalizador:** Se desarrollan técnicas de inmovilización para la células catalíticas y la enzima purificada, y ambas técnicas se caracterizan en función de su aplicación. Finalmente, se determina el biocatalizador más apto para su potencial aplicación industrial.

#### **IV. APLICACIÓN DEL BIOCATALIZADOR**

- **Capítulo 6. Empleo de PAL en la reducción de L-Phe en hidrolizados proteicos:** Se estudia la factibilidad de uso de PAL parcialmente purificada para la reducción de L-fenilalanina en hidrolizados proteicos. Esto incluye la optimización de las

condiciones de reacción empleando sustratos complejos. Finalmente, se describe la utilización de células catalíticas inmovilizadas en la reducción del contenido de L-Phe en hidrolizados proteicos y se analizan los resultados obtenidos.

## V. CONCLUSIONES

- **Capítulo 7. Conclusiones y proyecciones:** Se presentan las conclusiones del trabajo realizado y las proyecciones pertinentes.

### 1.4. Aportes realizados.

El principal aporte de esta tesis es la utilización de un método biotecnológico simple para la producción de hidrolizados proteicos reducidos en fenilalanina. Si bien la enzima utilizada (PAL) ha sido ampliamente estudiada en la búsqueda de tratamientos clínicos para aliviar y/o curar la enfermedad, nuestra aplicación resulta novedosa ya que constituye el primer aporte exitoso de empleo de PAL para la producción de sustitutos proteicos de origen natural. Este enfoque tiene especial significado para nuestro país, donde los costos de importación de las fórmulas existente son elevados, tornándose prioritaria la búsqueda de alternativas a las mismas, las cuales puedan plasmarse en el contexto económico actual.

El trabajo realizado durante el desarrollo de la tesis dio lugar a 1 trabajo publicado en revista internacional con referato, 1 trabajo en redacción para su publicación en revista internacional con referato y 11 presentaciones en eventos científicos nacionales e internacionales. Las mismas se detallan a continuación:

- Castañeda, M. T.; Adachi, O.; Hours, R. A. (2015). Reduction of L-Phenylalanine in Protein Hydrolysates using L-Phenylalanine Ammonia-lyase from *Rhodospiridium toruloides*. *J. Ind. Microb. Biotechnol*, 42 (10): 1299-1307.
- Castañeda, M. T.; Adachi, O.; Hours, R. A. (2016). Characterization of an immobilized biocatalyst containing L-phenylalanine ammonia lyase used for L-phenylalanine reduction in protein hydrolysates”. En redacción.
- Castañeda, María T.; Villagarcía, Hernán; Hours Roque A.; Mignone, Carlos F. (2012). Influencia de diferentes fuentes de carbono en la producción de Fenilalanina amonio liasa (PAL) Empleando

*Rhodospiridium toruloides*. 2do. Simposio Argentino de Procesos Biotecnológicos (SAProBio). ISBN 978-950-34-0845-2.

- Castañeda, María T.; Hours Roque A.; Adachi, Osao (2012). Inmovilización de células catalíticas con actividad Fenilalanina amonio liasa en matriz de Alg-Ca. 2do. Simposio Argentino de Procesos Biotecnológicos (SAProBio). ISBN 978-950-34-0845-2.
- Castañeda, María T.; Villagarcía, Hernán; Hours Roque A.; Mignone, Carlos F. (2012). Influencia de diferentes fuentes de nitrógeno en la producción de Fenilalanina amonio liasa (PAL) empleando *Rhodospiridium toruloides*. V Encuentro Regional de Biocatálisis y Biotransformaciones. ISBN 978-987-28696-0-1.
- Castañeda, María T.; Adachi, Osao; Mignone, Carlos F.; Hours Roque A. (2013). Reduction of L-phe content in protein hydrolysates using phenylalanine ammonia-lyase. XIV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CYTAL). ISBN 978-987-22165-5-9.
- María Castañeda; Sebastián Cavalitto; Roque Hours; Carlos Mignone (2013). Optimización de medio de cultivo para la producción de Fenilalanina amonio liasa empleando *Rhodospiridium toruloides*. VIII Encuentro Latinoamericano y del Caribe de Biotecnología (REDBIO).
- María Castañeda; Roque Hours; Carlos Mignone (2013). Inducción de Fenilalanina amonio-liasa en cultivo batch empleando *Rhodospiridium toruloides*. VIII Encuentro Latinoamericano y del Caribe de Biotecnología (REDBIO).
- Castañeda, M. Teresita; Adachi, Osao; Hours, Roque A (2014). Optimización de las condiciones de reacción de Fenilalanina amonio liasa empleando un hidrolizado de proteína como substrato modelo. 3° Simposio Argentino de Procesos Biotecnológicos (SAProBio). ISBN 978-987-657-967-4.
- Castañeda, M. Teresita; Adachi, Osao; Hours, Roque A; Mignone, Carlos F. (2014). Efecto del  $Mg^{+2}$  en la actividad de L- Fenilalanina amonio-liasa producida por *Rhodospiridium toruloides*. 3° Simposio Argentino de Procesos Biotecnológicos (SAProBio). ISBN 978-987-657-967-4.

- Castañeda, M. T.; Adachi, O.; Hours, R. A. (2015). Caracterización de células catalíticas de *Rhodospiridium toruloides* conteniendo L-fenilalanina amonio liasa. *4° Congreso Latinoamericano de Ingeniería y Ciencias Aplicadas a la Industria (CLICAP)*. ISBN 978-987-575-119-4.
- Castañeda, M. T.; Adachi, O.; Hours, R. A. (2015). Caracterización y empleo de un biocatalizador inmovilizado para la reducción del contenido de L-fenilalanina en casaminoácidos. *4° Congreso Latinoamericano de Ingeniería y Ciencias Aplicadas a la Industria (CLICAP)*. ISBN 978-987-575-119-4.
- Castañeda, M. T.; Adachi, O.; Hours, R. A. (2015). Uso de L-fenilalanina amonio liasa de *Rhodospiridium toruloides* inmovilizada por entrapamiento en membranas celulósicas. *4° Congreso Latinoamericano de Ingeniería y Ciencias Aplicadas a la Industria (CLICAP)*. ISBN 978-987-575-119-4.



# Capítulo 2

## Introducción general

---

### 2.1. Biocatalizadores

#### 2.1.1. Conceptos generales

Muchas de las reacciones químicas presentes en la naturaleza requieren de catalizadores para poder aumentar la velocidad a la que ocurren espontáneamente. Los catalizadores pueden definirse como moléculas que aumentan la velocidad de una reacción termodinámicamente favorable, mediante la disminución de la barrera energética de dicha reacción [8]. En la Figura 2.1 puede observarse un esquema simplificado del mecanismo de funcionamiento de los catalizadores. El catalizador interactúa con los sustratos (A y B) formando un complejo transitorio el cual reduce significativamente la energía de activación de la reacción ( $\Delta G$ ), para luego dar lugar a los productos (P y Q) previo a la liberación del catalizador, el cual no se ve afectado durante la reacción.

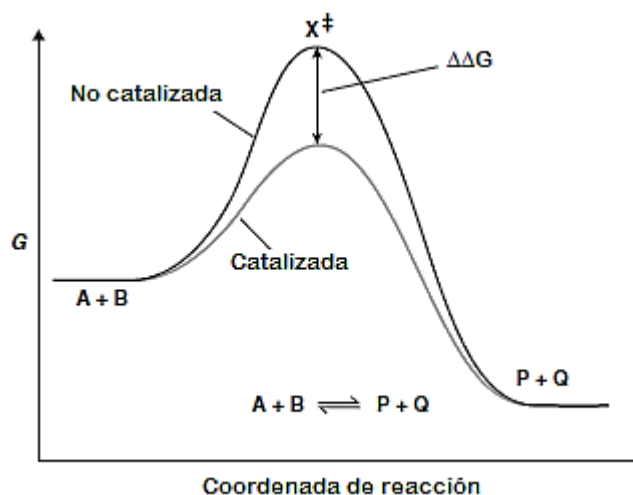


Figura 2.1. Mecanismo de funcionamiento de los catalizadores [9].

Los catalizadores que actúan específicamente en reacciones bioquímicas, es decir en reacciones intervinientes en el metabolismo de seres vivos, se conocen como biocatalizadores. Dentro de esta categoría se encuentran los biocatalizadores de origen proteico, conocidos como enzimas. Las enzimas son proteínas de elevado peso molecular y altamente específicas. En los organismos vivos intervienen en reacciones metabólicas de forma óptima para luego ser liberadas sin alteración funcional. Esto permite que la enzima pueda emplearse en sucesivas reacciones, lo que las hace uno de los catalizadores más eficientes de la naturaleza.

Desde los inicios de la enzimología aplicada existen amplias controversias sobre si las enzimas aisladas de los organismos vivos pueden actuar como biocatalizadores de la misma forma que actúan en el organismo de origen [10]. Sin embargo, hasta la actualidad, las enzimas han logrado aislarse, purificarse, inmovilizarse y emplearse exitosamente en diversos procesos tecnológico, convirtiéndose en un área de especial interés para la industria en general.

### **2.1.2. Estructura de las enzimas**

Todas aquellas propiedades que hacen de las enzimas un catalizador altamente eficiente derivan de su estructura [8]. Las enzimas tienen naturaleza proteica y por ende presentan las estructuras básicas de las proteínas. La estructura más elemental de las enzimas es la estructura primaria, la cual consiste en la unión secuencial de aminoácidos por enlace peptídico entre el grupo carboxilo de un aminoácido y el grupo amino del siguiente. La secuencia con la cual se unen los aminoácidos, así como la naturaleza de los residuos (R), definen las características y el “comportamiento” de las enzimas [8]. Los aminoácidos próximos en la cadena polipeptídica pueden interactuar mediante enlaces puentes de hidrógeno entre los grupos amidas dando lugar a dos tipos de conformaciones espaciales, conocidas como estructura secundaria:  $\alpha$  hélice (la más predominante en enzimas) y  $\beta$  lámina. Además de estas interacciones entre aminoácidos próximos, también tienen lugar interacciones entre los R de aminoácidos produciendo un plegamiento adicional de las configuraciones nombradas. Estos plegamientos resultan en una estructura tridimensional más compleja, denominada estructura terciaria. Las interacciones entre dichos R pueden ser muy diversas comprendiendo: enlaces

puentes disulfuro, interacciones iónicas, fuerzas de Van der Waals, puente de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, etc. Como resultado de estos enlaces, en un ambiente hidrofílico, la superficie de la proteína es rica en R de aminoácidos polares, mientras que los R hidrofóbicos quedan principalmente agrupados en el interior de la macromolécula, en tanto que lo inverso ocurre en un entorno hidrofóbico.

Algunas enzimas pueden contar con una estructura cuaternaria constituida por varias cadenas polipeptídicas, conformando subunidades, las cuales pueden tener o no la misma función catalítica dentro de este complejo.

La funcionalidad biológica de las enzimas depende de su estructura nativa, la cual se basa en la estructura tridimensional más estable de la proteína bajo condiciones fisiológicas. Si bien la estructura tridimensional de la enzima está determinada genéticamente, estará condicionada por el medio en que se encuentran. Este hecho reviste importancia a la hora de trabajar con enzimas, ya que el medio que las rodea puede diferir al entorno original donde fueron sintetizadas, con lo cual deben tomarse las precauciones para evitar pérdidas de funcionalidad [8].

Finalmente, es importante mencionar que algunas enzimas pueden conjugarse con diferentes macromoléculas como carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos, etc., o bien con iones metálicos. Dichas enzimas se denominan holoenzimas y la parte no proteica conjugada se conoce como grupo prostético.

### **2.1.3. Clasificación y nomenclatura de las enzimas**

Las enzimas pueden identificarse, de acuerdo a la Comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología molecular (IUBMB), con un número compuesto por cuatro dígitos [8]:

1° dígito: Identifica a las enzimas por la familia o categoría a la cual pertenecen.

2° dígito: Indica el subgrupo dentro de la familia, el cual está relacionado con la tipología del grupo químico sobre el cual actúa.

3° dígito: Se refiere a la subclase dentro del subgrupo, el cual identifica el grupo químico específico que interviene en la reacción.

4° dígito: Se trata de un número correlativo que las identifica dentro de la subclase.

En cuanto a la clasificación de las enzimas, pueden distinguirse 6 categorías generales [11]:

- **Oxidoreductasas:** Esta categoría incluye a todas las enzimas que catalizan reacciones de óxido-reducción, que consisten en transferencia de electrones, hidrógeno u oxígeno. El nombre sistemático de estas enzimas está conformado por: “donor:aceptor oxidoreductasa”.
- **Transferasas:** Esta categoría incluye a todas las enzimas que catalizan la transferencia de un grupo químico específico, como puede ser metil, acil amino, glicosil, o fosfato, desde un compuesto a otro. El nombre sistemático de estas enzimas está conformado por: “donor:aceptor grupo transferido-transferasa”.
- **Hidrolasas:** Esta categoría incluye a todas las enzimas que catalizan la escisión hidrolítica principalmente de los grupos C—O, C—N y C—C. El nombre sistemático de estas enzimas está conformado por: “sustrato hidroxilasa”.
- **Liasas:** Esta categoría incluye a todas las enzimas que catalizan la escisión no hidrolítica y no oxidativa de los grupos C—O, C—N y C—C, dando lugar a un doble enlace en los productos. El nombre sistemático de estas enzimas está conformado por: “sustrato prefijo-liasa”.
- **Isomerasas:** Esta categoría incluye a todas las enzimas que catalizan el reacomodamiento geométrico o estructural dentro de la molécula, sin cambiar la composición atómica del producto. El nombre sistemático de estas enzimas está conformado por: “sustrato prefijo-isomerasa”.
- **Ligasas:** Esta categoría incluye a todas las enzimas que catalizan la unión covalente entre dos moléculas. El nombre sistemático de estas enzimas está conformado por: “X:Y ligasa”.

#### **2.1.4. Mecanismo catalítico de las enzimas**

El mecanismo por el cual una enzima cataliza una reacción comienza con la interacción de la enzima (E) con el sustrato (S). Esta interacción tiene lugar en un sitio muy específico de la enzima, denominado sitio activo. El sitio activo de la

enzima es un pequeño espacio tridimensional de la proteína constituido por unos pocos R de aminoácidos donde se lleva a cabo propiamente la catálisis, sirviendo el resto de la enzima como soporte del sitio activo [12]. Existen diferentes teorías acerca de cómo interacciona el sustrato con el sitio activo para conformar el complejo transitorio enzima-sustrato. De acuerdo al modelo de llave-cerradura, el sitio activo de la enzima tiene una geometría espacial tal que el sustrato con una geometría complementaria encaja perfectamente en el mismo. Por otro lado, el modelo de ajuste inducido sugiere que el sustrato induce un cambio en la conformación del sitio activo de la enzima luego de hacer contacto con la misma. Este último explicaría la posibilidad de que una enzima pueda emplear como sustrato compuestos químicamente similares [8].

Algunas enzimas, a su vez, requieren de ciertos compuestos para llevar a cabo la catálisis. Estos compuestos se conocen como cofactores y coenzimas. La diferencia entre éstos se ilustra en la Figura 2.2. Los cofactores son iones metálicos que se unen fuertemente a la enzima en forma reversible, con lo cual no se disocian durante la reacción y no sufren alteración alguna, mientras que el término coenzima está asociado a pequeñas moléculas orgánicas que se unen también reversiblemente a la enzima pero durante la reacción, sin formar parte de su estructura.

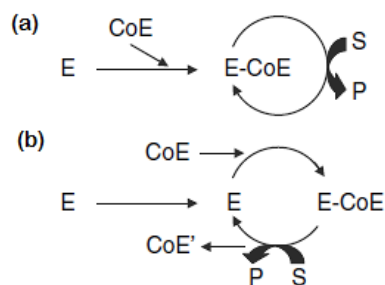


Figura 2.2. Enzimas que requieren cofactores (a) y coenzimas (b) [8].

Independientemente del mecanismo por el cual se une el S con la E, se ha demostrado la presencia de un estado transitorio o intermediario denominado complejo enzima-sustrato (ES) [13]. La energía asociada a la formación de este complejo (ES) impulsa la formación del complejo activado ( $ES^\ddagger$ ), el cual está asociado a una menor energía libre que el estado transitorio de la reacción sin catalizar ( $S^\ddagger$ ) (Figura 2.3). Seguidamente, la reacción prosigue con la formación

del complejo enzima-producto (EP), el cual es el intermediario previo a la liberación de P y E.

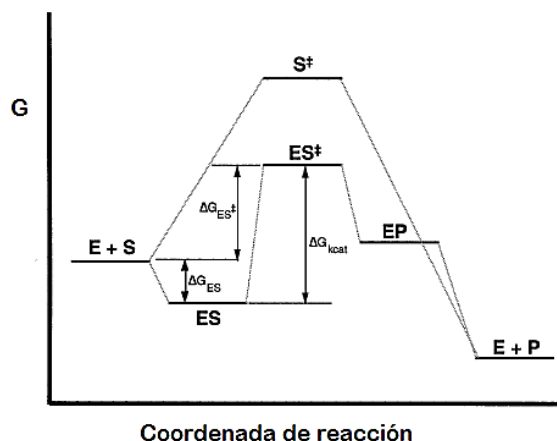


Figura 2.3. Diagrama energético de una reacción catalizada por enzimas [12].

## 2.1.5. Cinética enzimática

### 2.1.5.1. Cinética enzimática con un único sustrato

Para determinar la velocidad a la que una reacción catalizada por enzimas ocurre, se planteará primeramente el caso más simple, en el cual hay un único S que produce un único P (2.1).



Para poder encontrar una ecuación que describa la cinética de esta reacción, se requiere hacer ciertas consideraciones [14]:

- La concentración total de enzima se mantiene constante durante toda la reacción, esto es:  $[E_0] = [ES] + [E]$ .
- La cantidad de enzima es muy pequeña en comparación con la cantidad de sustrato, esto implicaría que es despreciable la cantidad de sustrato formando parte del complejo ES.
- La concentración de producto es baja, por lo que se puede despreciar cualquier efecto de inhibición por producto.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, existen diversos abordajes, los más conocidos son los de Michaelis-Menten [15] y Briggs-Haldane [16]. Ambos llegan a expresiones similares pero parten de diferentes premisas. En el caso de Michaelis-Menten se asume que la velocidad de formación de P es mucho menor que la velocidad reversible de ES, o sea  $k_2 \ll k_{-1}$  (2.1), por ende la formación de P

determina la velocidad de reacción. Por otro lado, Briggs-Haldane proponen que el cambio de la concentración de ES respecto al tiempo es insignificante ( $dES/dt=0$ ).

Para encontrar una ecuación que describa la velocidad de reacción, se emplearán ambas suposiciones [17]:

El primer paso es determinar la velocidad de producción y desaparición del complejo ES. De acuerdo a (2.1) podemos expresar ambas velocidades, de la siguiente manera:

$$\frac{dES}{dt} = k_1[E][S]_0 \quad (2.2)$$

$$-\frac{dES}{dt} = k_{-1}[ES] + k_2[ES] \quad (2.3)$$

En estado estacionario  $dES/dt = -dES/dt$  [16], entonces:

$$k_1[E][S]_0 = (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (2.4)$$

Reordenando:

$$\frac{[E][S]_0}{[ES]} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = K_m \quad (2.5)$$

Sin embargo como  $k_2 \ll k_{-1}$  [15], entonces:

$$K_M = \frac{k_{-1}}{k_1} \quad (2.6)$$

La constante  $K_m$  se denomina constante de Michaelis-Menten.

Por otro lado, la velocidad de reacción  $v$  es la velocidad inicial de producción de producto, la cual es lineal en los primeros estadios de la reacción (Figura 2.4).

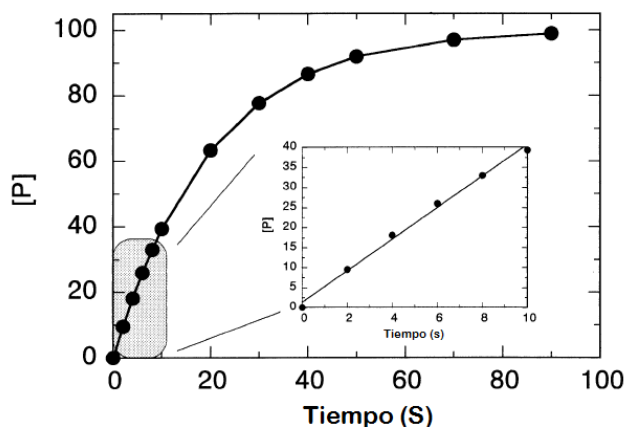


Figura 2.4. Formación de producto en una reacción catalizada por enzimas [12].

Por lo anteriormente dicho,  $v$  se define como:

$$v = \frac{dP}{dt} = k_2 [ES] \quad (2.7)$$

A su vez, sabemos de (2.5) que:

$$[ES] = \frac{[E][S]_0}{K_m} \quad (2.8)$$

La concentración total de enzima  $[E_0]$  es fácilmente medible, no así la concentración libre de enzima  $[E]$ . Ambas se relacionan de la siguiente manera:

$[E] = [E_0] - [ES]$ . Reemplazando en (2.8):

$$[ES] = \frac{([E_0] - [ES])[S]_0}{K_m} \quad (2.9)$$

Reordenando la ecuación (2.9), tenemos:

$$[ES] = \frac{[E_0][S]_0}{K_m + [S]_0} \quad (2.10)$$

Reemplazando (2.10) en (2.7), tenemos:

$$v = \frac{k_2 [E_0][S]_0}{K_m + [S]_0} \quad (2.11)$$

La constante  $k_2$  se conoce como  $k_{cat}$  y cuando se cumple que  $[ES] = [E_0]$ ,  $v = v_{max}$ . De lo dicho anteriormente, resulta que:

$$v_{max} = k_{cat} [E_0] \quad (2.12)$$

Reemplazando (2.12) en (2.11), nos queda la expresión de velocidad de la siguiente manera:

$$v = \frac{v_{max}[S]_0}{K_m + [S]_0} \quad (2.13)$$

A partir de la ecuación (2.13) podemos inferir que a bajas concentraciones de sustrato ( $S \leq 0.05K_m$ ), la reacción es de primer orden, mientras que a concentraciones elevadas de sustrato ( $S \geq 100K_m$ ) la reacción es de orden cero, con lo cual la velocidad no dependerá de la concentración de sustrato y el sistema se dice que está saturado [17].

Por otro lado, si  $K_m$  es igual a  $[S]$ , reemplazando en la ecuación (2.13) tenemos:

$$v = \frac{v_{max}[S]}{[S] + K_m} \quad (2.14)$$

$$v = \frac{v_{max}}{2} \quad (2.15)$$

A partir de la ecuación (2.15) podemos decir que  $K_m$  es la concentración de S para la cual  $v$  es la mitad de  $v_{max}$  (Figura 2.5).

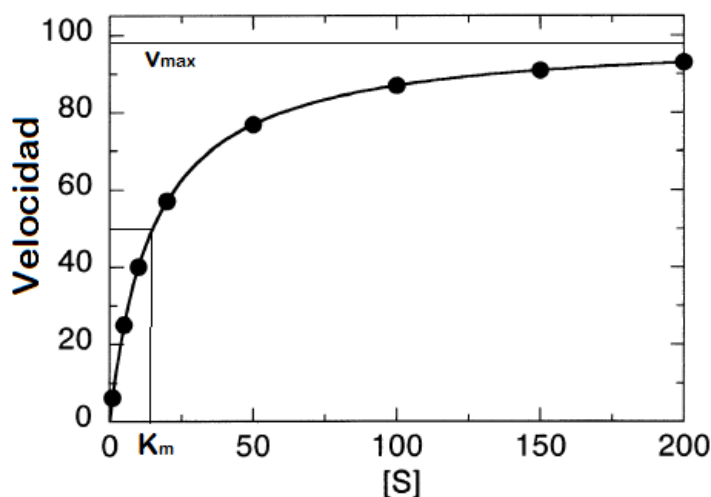


Figura 2.5. Cinética de Michaelis-Menten [12].

Los parámetros cinéticos  $K_m$  y  $k_{cat}$  brindan información sobre la afinidad de una enzima respecto a un sustrato determinado [12]. Por un lado, la constante  $K_m$  es un parámetro característico de las enzimas, que puede variar empleando diferentes sustratos y modificando algunos parámetros de reacción como la temperatura, el pH, etc. Por otro lado,  $k_{cat}$  es también conocido como *número de recambio* y se define como la cantidad de moléculas de producto formado, por molécula de enzima por unidad de tiempo. De acuerdo a la ecuación (2.12):

$$k_{cat} = \frac{v_{max}}{[E_0]} \quad (2.16)$$

A partir de (2.16) podemos concluir que a una concentración de enzima dada y en condiciones saturantes de sustrato,  $k_{cat}$  representa la máxima velocidad a la cual puede transcurrir la reacción catalizada.

El cociente  $k_{cat}/K_m$  es el mejor índice de la eficiencia enzimática y es conocido también como constante de especificidad [9]. Esta constante permite comparar diversas enzimas, la misma enzima con diversos sustratos e incluso la eficiencia de la enzima en una reacción reversible. Una mayor constante de

especificidad implica un mayor número de recambio (elevada  $k_{cat}$ ) y mayor afinidad por el sustrato (menor  $K_m$ ). El valor máximo teórico al que puede llegar la constante de especificidad se denomina límite de difusión y se interpreta como la situación en la cual todas las moléculas de sustratos colisionan eficientemente con las moléculas de la enzima, de modo tal que la velocidad de formación de producto no se encuentra limitada por la velocidad de reacción, sino por la velocidad de difusión.

### 2.1.5.2. Cinética enzimática con múltiples sustratos

Hasta ahora se ha planteado el caso de la catálisis de una reacción con un único sustrato y un único producto. Sin embargo, la mayoría de las reacciones catalizadas involucran más de un sustrato y la formación de más de un producto [12]. En estos casos se emplea una nomenclatura especial para referirse a los diferentes tipos de reacción:

- Reacción con un sustrato y un producto ( $S \rightarrow P$ ): Uni-Uni.
- Reacción con dos sustratos y un producto ( $S_1 + S_2 \rightarrow P$ ): Bi-Uni.
- Reacción con dos sustratos y dos productos ( $S_1 + S_2 \rightarrow P_1 + P_2$ ): Bi-Bi.
- Reacción con un sustrato y dos productos ( $S \rightarrow P_1 + P_2$ ): Uni-Bi.
- Reacción con tres sustratos y dos productos ( $S_1 + S_2 + S_2 \rightarrow P_1 + P_2$ ): Ter-Bi.
- Etc.

Los modelos cinéticos que describen este tipo de reacciones dependen del mecanismo de reacción propuesto. Por ejemplo, planteamos la siguiente ecuación Bi-Bi [8]:



Existen diferentes mecanismos mediante los cuales A y B dan lugar a los productos Y y Z, en una reacción catalizada por E [18]. Por un lado, es posible plantear que los sustratos A y B se combinan con E, previo a la formación de los productos, este tipo de mecanismo se conoce como *mecanismo secuencial*. De acuerdo a si importa o no el orden en el que se combinan los sustratos con la enzima, el mecanismo secuencial puede ser *ordenado* o al azar. Por otro lado, se conoce como *mecanismo ping-pong* al mecanismo en el que, a diferencia del secuencial, un producto puede formarse previo a que todos los sustratos estén

ligados a la enzima. Esto último implica que existen diferentes conformaciones de la enzima a medida que avanza la reacción [8].

A continuación se detalla cada mecanismo en particular con su correspondiente cinética:

- Mecanismo secuencial ordenado: El sustrato A se combina con la enzima E formando el complejo EA. Recién entonces el sustrato B puede combinarse con la enzima formando el subsecuente complejo EAB para liberar luego los productos Y y Z (Figura 2.6).

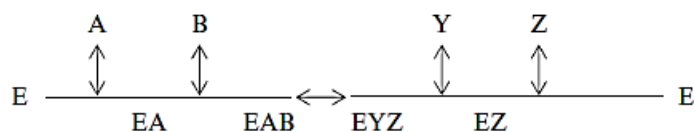


Figura 2.6. Mecanismo secuencial ordenado [8].

Las correspondientes ecuaciones son:



A partir de (2.18) y (2.19), se pueden calcular  $k_A$  y  $k_{AB}$  de la siguiente manera:

$$k_A = \frac{[A][E]}{[EA]} \quad (2.21)$$

$$k_{AB} = \frac{[EA][B]}{[EAB]} \quad (2.22)$$

Por otro lado, sabemos por lo expuesto anteriormente, que:

$$v = k_{cat} [EAB] \quad (2.23)$$

$$[E_0] = [E] + [EA] + [EAB] \quad (2.24)$$

Además recordando la relación entre la velocidad máxima y  $k_{cat}$  (2.12), podemos derivar la ecuación de la velocidad de reacción. Luego, la cinética que corresponde a este mecanismo es la siguiente [19]:

$$v = \frac{v_{max}[A][B]}{k_{AB}k_A + k_{AB}[A] + [A][B]} \quad (2.25)$$

- Mecanismo secuencial al azar: Tanto el sustrato A como el B pueden ligarse primero a la enzima, por lo tanto ambos complejos son posibles EA o EB. Luego, el sustrato B o A respectivamente se combinarán con la enzima formando el subsecuente complejo EAB para liberar luego los productos Y y Z (Figura 2.7).

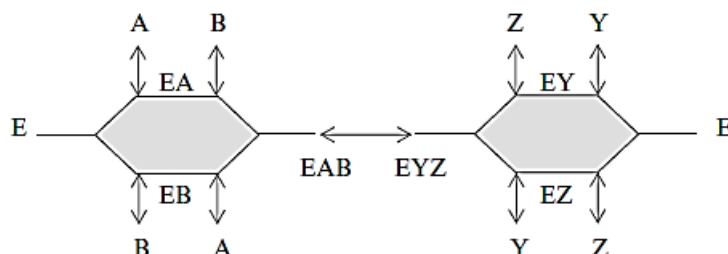
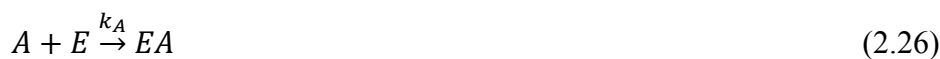


Figura 2.7. Mecanismo secuencial al azar [8].

Las correspondientes ecuaciones son:



A partir de (2.26), (2.27), (2.28) y (2.29), se pueden calcular  $k_A$ ,  $k_{AB}$ ,  $k_B$  y  $k_{BA}$ , de la siguiente manera:

$$k_A = \frac{[A][E]}{[EA]} \quad (2.31)$$

$$k_{AB} = \frac{[EA][B]}{[EAB]} \quad (2.32)$$

$$k_B = \frac{[B][E]}{[EB]} \quad (2.33)$$

$$k_{BA} = \frac{[EB][A]}{[EAB]} \quad (2.34)$$

Por otro lado, sabemos por lo expuesto anteriormente, que:

$$v = k_{cat} [EAB] \quad (2.35)$$

$$[E_0] = [E] + [EA] + [EB] + [EAB] \quad (2.36)$$

Además recordando la relación entre la velocidad máxima y  $k_{cat}$  (2.12), podemos derivar la ecuación de la velocidad de reacción. Luego, la cinética que corresponde a este mecanismo es la siguiente:

$$v = \frac{v_{max}[A][B]}{k_{AB}k_A + k_{AB}[A] + k_{BA}[B] + [A][B]} \quad (2.37)$$

- Mecanismo ping-pong: El sustrato A se combina con la enzima E formando el complejo EA. A partir de allí puede liberarse el producto Y y la enzima E' con una configuración diferente. E' puede ahora unirse al sustrato B para dar lugar al complejo E'B y luego liberar el producto Z y la enzima E en su estado original (Figura 2.8).

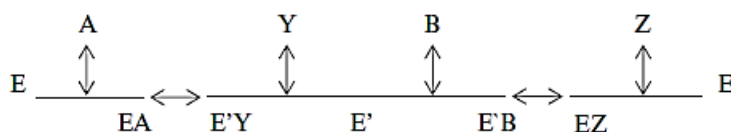


Figura 2.8. Mecanismo ping-pong [8].

Las correspondientes ecuaciones son:



A partir de (2.38) y (2.40) se pueden calcular  $k_A$ , y  $k_B$ , de la siguiente manera:

$$k_A = \frac{[A][E]}{[EA]} \quad (2.42)$$

$$k_B = \frac{[B][E']}{[EB]} \quad (2.43)$$

Por otro lado, sabemos por lo expuesto anteriormente, que:

$$[E_0] = [E] + [EA] + [E'B] + [E'] \quad (2.44)$$

A partir de estas ecuaciones, la velocidad de reacción general para un mecanismo ping-pong, es la siguiente:

$$v = \frac{v_{max}[A][B]}{\alpha k_A[B] + k_B[A] + [A][B] (1 + \alpha)} \quad (2.45)$$

Donde  $\alpha = k_{B'}/k_A$ .

### 2.1.5.3. Determinación de parámetros cinéticos

La representación de Michaelis-Menten, en la cual se representa la velocidad de formación de P, en función de la concentración de S, permite observar a simple vista si existe una correlación de los datos obtenidos con el modelo de Michaelis-Menten. A menos que se utilice un software específico para determinar las constantes cinéticas por medio de ajuste no lineal de la curva de Michaelis-Menten, este tipo de representación no es útil a la hora de calcular con precisión las variables cinéticas, tales como  $K_m$  o  $v_{max}$ . Para ello se han empleado a lo largo de la historia diferentes ecuaciones que surgen de la linealización de la ecuación de Michaelis-Menten [12]. Las más utilizada es la linealización de Lineweaver-Burk [20]. Ésta se basa en obtener el recíproco de la ecuación de Michaelis-Menten (2.13), dando una ecuación que representa  $1/v$  en función de  $1/S$ .

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{max}} \frac{1}{S} + \frac{1}{v_{max}} \quad (2.46)$$

Mediante la ecuación (2.46) se puede determinar el valor de  $v_{max}$  por medio de la ordenada al origen y  $K_m$  por la pendiente de la recta.

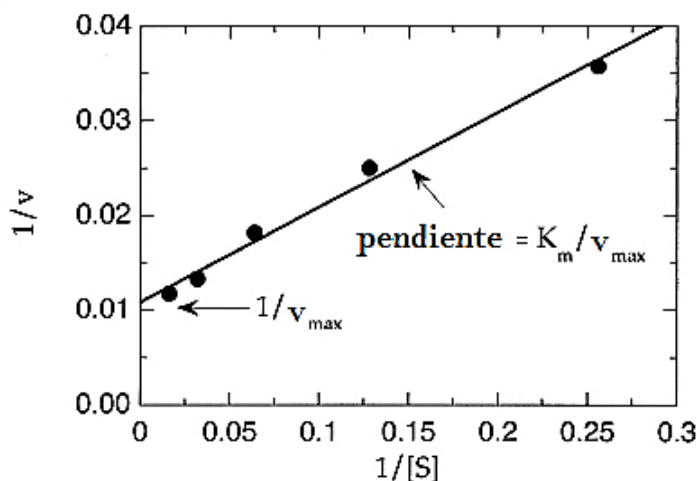


Figura 2.9. Linealización de Lineweaver-Burk [12].

Este tipo de representación depende mucho de la exactitud de los valores experimentales y por ende puede acarrear un error en la determinación de los parámetros cinéticos. Sin embargo continúa siendo uno de los métodos de más empleados para estos fines [12].

Otros métodos de linealización para la determinación de las constantes cinéticas se presentan en la Tabla 2.1:

Tabla 2.1. Métodos de linealización de la ecuación de Michaelis-Menten.

<i>Método gráfico</i>	<i>Ecuación</i>	<i>Ordenada</i>	<i>Abscisa</i>
Lineweaver-Burk	$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{max}} \frac{1}{S} + \frac{1}{v_{max}}$	$\frac{1}{v}$	$\frac{1}{S}$
Langmuir	$\frac{S}{v} = \frac{K_m}{v_{max}} + \frac{S}{v_{max}}$	$\frac{S}{v}$	$S$
Eadie-Hofstee	$v = v_{max} - K_m \frac{v}{S}$	$v$	$\frac{v}{S}$
Hanes-Wolff	$\frac{S}{v} = S \frac{1}{v_{max}} + \frac{K_m}{v_{max}}$	$\frac{S}{v}$	$S$

#### 2.1.5.4. Cinética enzimática con inhibición

Se conocen como *moduladores* aquellas sustancias que se combinan con la enzima, modificando su comportamiento cinético, ya sea aumentando su actividad (*modulador positivo*) o disminuyéndola (*modulador negativo*). Una sustancia inhibidora es por definición un modulador negativo, y por lo tanto, disminuye el potencial catalítico de la enzima [8, 14]. La inhibición a su vez puede ser *reversible*, cuando la ausencia del inhibidor provoca la restitución de la actividad catalítica de la enzima, o bien *irreversible* cuando el inhibidor se une covalentemente a la E alterando su estructura y consecuentemente su potencial catalítico, de forma definitiva.

En cuanto a los inhibidores reversibles, éstos se clasifican de acuerdo a la etapa en la cual el inhibidor (I) interacciona con la enzima. De este modo, los I reversibles se clasifican en competitivos, acompetitivos y no competitivos (mixtos). El modelo cinético se verá de este modo modificado, de la siguiente manera:

- **Inhibidores competitivos:** son aquellos que interfieren en la primera etapa de la catálisis, que es la unión del S con la E. Los inhibidores competitivos son sustancias estructuralmente semejantes al sustrato que pueden unirse reversiblemente con el sitio activo de la enzima y, de este modo, compiten con el sustrato y disminuyen consecuentemente la velocidad de reacción. El inhibidor resulta inalterado por la enzima, por lo cual su efecto es simplemente el bloqueo del sitio activo de la misma. En este tipo de

inhibición la velocidad máxima de reacción no se ve alterada, no así el  $K_m$ , el cual se incrementa debido a que se requiere aumentar la concentración de sustrato para contrarrestar el efecto inhibitor [9].

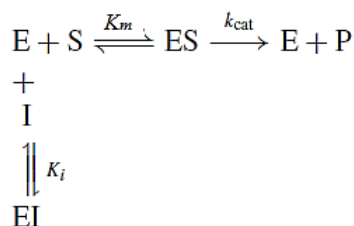


Figura 2.10. Inhibición competitiva [19].

A partir de la figura (2.10) y de la ecuación (2.7), se puede derivar la expresión de velocidad para una reacción en presencia de un inhibidor competitivo.

$$K_m = \frac{[S][E]}{[ES]} \tag{2.47}$$

$$K_i = \frac{[I][E]}{[EI]} \tag{2.48}$$

$$[E_0] = [E] + [EI] + [ES] \tag{2.49}$$

Luego,

$$v = \frac{v_{max}[S]}{K_m(1 + I/K_i) + [S]} \tag{2.50}$$

Podemos definir así las constantes aparentes  $K_m^*$  y  $v_{max}^*$ , que corresponden al valor de  $K_m$  y  $v_{max}$  en presencia de un inhibidor competitivo, como:

$$K_m^* = K_m \alpha^* \tag{2.51}$$

$$v_{max}^* = v_{max} \tag{2.52}$$

Donde  $\alpha^*$  es igual a:

$$\alpha^* = (1 + I/K_i) \tag{2.53}$$

Luego,

$$v = \frac{v_{max}[S]}{K_m \alpha^* + [S]} \tag{2.54}$$

$$v = \frac{v_{max}^*[S]}{K_m^* + [S]} \tag{2.55}$$

A partir de la ecuación (2.51), (2.52) y (2.53) se puede ver que a medida que aumenta la concentración del inhibidor competitivo, aumenta el valor de  $\alpha^*$  y por lo tanto aumenta el valor de la constante aparente ( $K_m^*$ ), respecto a la reacción sin inhibición (2.13). Por otro lado, como el valor de  $v_{max}^*$  no se ve afectado por  $\alpha^*$ ,  $v_{max}$  se mantendrá constante independientemente de la concentración del inhibidor.

- Inhibidores acompetitivos: Estos inhibidores reversibles no tienen afinidad por la enzima libre, sin embargo presentan afinidad por el complejo ES. El inhibidor de esta forma puede unirse al complejo ES formando el complejo inactivo ESI (Figura 2.11). Este tipo de inhibición produce una disminución de la  $v_{max}$  de reacción y del valor de  $K_m$ .

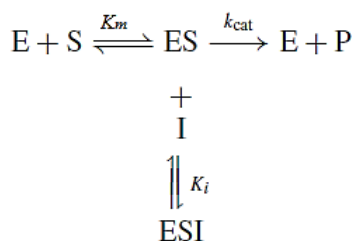


Figura 2.11. Inhibición acompetitiva [19].

A partir de la figura (2.11) y de la ecuación (2.7), se puede derivar la expresión de velocidad para una reacción en presencia de un inhibidor acompetitivo.

$$K_m = \frac{[S][E]}{[ES]} \tag{2.56}$$

$$K_i = \frac{[I][ES]}{[ESI]} \tag{2.57}$$

$$[E_0] = [E] + [ESI] + [ES] \tag{2.58}$$

Luego,

$$v = \frac{[S] v_{max}/(1 + I/K_i)}{K_m/(1 + I/K_i) + [S]} \tag{2.59}$$

Podemos definir así las constantes aparentes  $K_m^*$  y  $v_{max}^*$ , que corresponden al valor de  $K_m$  y  $v_{max}$  en presencia de un inhibidor acompetitivo, como:

$$K_m^* = K_m/\alpha^* \tag{2.60}$$

$$v_{max}^* = v_{max}/\alpha^* \tag{2.61}$$

$\alpha^*$  fue previamente definida en la ecuación (2.53).

Luego,

$$v = \frac{v_{max}/\alpha^* [S]}{K_m/\alpha^* + [S]} \tag{2.62}$$

A partir de la ecuación (2.60), (2.61) y (2.53) se puede ver que a medida que aumenta la concentración del inhibidor acompetitivo, aumenta el valor de  $\alpha^*$  y por lo tanto disminuye el valor de la constante aparente ( $K_m^*$ ), respecto a la reacción sin inhibición (2.13). Lo mismo ocurre  $v_{max}^*$ , la cual se ve afectada de la misma manera por  $\alpha^*$ .

- Inhibidores no competitivos: Estos inhibidores reversibles mixtos pueden unirse tanto a la enzima como al complejo ES, formando los complejos EI y ESI (Figura 2.12). En ambos casos la unión se lleva a cabo fuera del sitio activo, lo que implica que la constante de afinidad por el sustrato ( $K_m$ ) no se modifica, no así  $v_{max}$  que cual disminuye como resultado de la alteración que se produce en la estructura de la enzima.

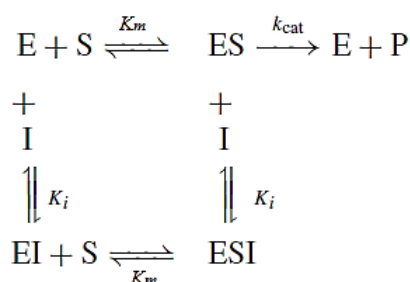


Figura 2.12. Inhibición no competitiva [19].

A partir de la figura (2.12) y de la ecuación (2.7), se puede derivar la expresión de velocidad para una reacción en presencia de un inhibidor no competitivo.

$$K_m = \frac{[S][E]}{[ES]} = \frac{[EI][S]}{[ESI]} \tag{2.63}$$

$$K_i = \frac{[I][E]}{[EI]} = \frac{[ES][I]}{[ESI]} \tag{2.64}$$

$$[E_0] = [E] + [ES] + [EI] + [ESI] \tag{2.65}$$

Luego,

$$v = \frac{[S] v_{\max}/(1 + I/K_i)}{K_m + [S]} \quad (2.66)$$

Podemos definir así las constantes aparentes  $K_m^*$  y  $v_{\max}^*$ , que corresponden al valor de  $K_m$  y  $v_{\max}$  en presencia de un inhibidor no competitivo, como:

$$K_m^* = K_m \quad (2.67)$$

$$v_{\max}^* = v_{\max}/\alpha^* \quad (2.68)$$

$\alpha^*$  fue previamente definida en la ecuación (2.53).

Luego,

$$v = \frac{v_{\max}/\alpha^* [S]}{K_m + [S]} \quad (2.69)$$

A partir de las ecuaciones (2.67), (2.68) y (2.53) se puede ver que a medida que aumenta la concentración del inhibidor no competitivo, aumenta el valor de  $\alpha^*$  y, por lo tanto, disminuye el valor de la velocidad máxima aparente ( $v_{\max}^*$ ), respecto a la reacción sin inhibición (2.13). Por otro lado, la constante aparente  $K_m^*$  no es afectada por el factor  $\alpha^*$  y por lo tanto, permanece constante.

### 2.1.6. Obtención de enzimas microbianas

A lo largo de la historia las enzimas se han aislado de fuentes naturales (vegetal, animal y microbiano) para su empleo en diferentes procesos químicos y bioquímicos. A partir de la década del '60 las enzimas microbianas (principalmente amilasas y proteasas) comenzaron a reemplazar gran parte de las enzimas de origen vegetal y animal [8]. En la década del '70, con la introducción de la ingeniería genética y la biología molecular, se lograron obtener microorganismos recombinantes, los cuales aumentaron la productividad y por ende, disminuyeron los costos de los biocatalizadores microbianos [10]. Actualmente, la industria de enzimas microbianas representa aproximadamente un 90% del mercado de biocatalizadores [8]. Esto es consecuencia de algunas propiedades de los microorganismos que los diferencian de las demás fuentes: tienen un metabolismo muy vigoroso, son versátiles y fáciles de propagar a gran escala, son fácilmente manipulables ya sea genéticamente o mediante cambios en su medio ambiente, sus requerimientos nutricionales son simples y no

estacionales, etc. Esto hace que la producción de enzimas a partir de microorganismos sea relativamente simple, barata y confiable [8].

El proceso para la producción de enzimas microbianas depende de la escala a la que se trabaje. Esta puede variar desde escala de laboratorio (para algunas enzimas muy específicas) a escala industrial para la producción de enzimas de uso masivo, las cuales se consideran hoy en día commodities [8]. Otro factor a tener en cuenta es la pureza requerida, ya que no es lo mismo un producto de grado farmacéutico que una enzima para uso doméstico. Por último, debe considerarse la fuente natural de la enzima, o sea el tipo de microorganismo que la sintetiza y fundamentalmente si se trata de una enzima *intracelular* (si es retenida dentro de la células) o *extracelular*, ya que de ello dependerán las operaciones unitarias que conformarán el proceso.

El diseño de un bioproceso para la producción de enzimas incluye una serie de etapas previas al proceso de síntesis, las cuales se conocen como *Upstream* y etapas posteriores o de separación conocidas como *Downstream* [21]. En el upstream del proceso se incluyen operaciones como la formulación y preparación del medio del cultivo, la esterilización del medio del cultivo y del biorreactor, la calibración de los sensores y el mantenimiento y propagación del inóculo a emplear. Posterior a estas operaciones se encuentra el proceso fermentativo o de síntesis enzimática propiamente dicho, el cual incluye el cultivo y propagación del microorganismo en biorreactores para la producción e inducción de la enzima. Finalmente, se encuentran las operaciones que constituyen el downstream del proceso (Figura 2.13), las cuales pueden dividirse en:

- Operaciones tendientes a la recuperación de la enzima: consisten en las operaciones de recuperación del extracto crudo que contiene la enzima, frecuentemente por operaciones de separación sólido-líquido, sumado a diferentes operaciones dependiendo si la enzima es intracelular o extracelular. Si la enzima es intracelular requerirá de operaciones de ruptura y separación, mientras que si es extracelular requerirá de separaciones seguidas de operaciones de concentración del extracto.
- Operaciones de purificación de la enzima: consisten en las operaciones necesarias para eliminar los compuestos indeseados a fin de purificar la enzima, ej. precipitación, filtración, cromatografía, etc.

- Operaciones destinadas a la formulación de la enzima: corresponde a las operaciones necesarias para la presentación final de la enzima, puede incluir procesos de estandarización, estabilización, deshidratación, etc.

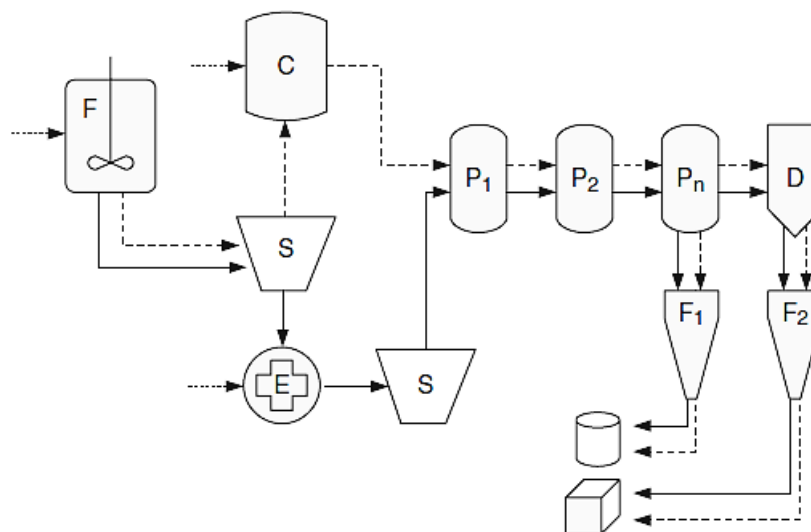


Figura 2.13. Obtención de enzimas microbianas y downstream del proceso [8].

F: fermentación, S: separación sólido-líquido, E: extracción, C: concentración, Pi: purificación, D: secado, Fi: formulación.

### 2.1.7. Aplicación industrial de enzimas

El empleo indirecto de enzimas en la manufactura y conservación de los alimentos se remonta al antiguo Egipto, donde las mismas intervenían en el proceso de obtención de bebidas alcohólicas. Sin embargo, no fue hasta el siglo '18 que comenzaron a aislarse y estudiarse desde un punto de vista más científico [10]. Con el avance de la biotecnología se ha logrado mayor eficiencia en la búsqueda, obtención y purificación de las enzimas, permitiendo su aplicación en diversas industrias [22]. Algunas de las aplicaciones actuales se resumen en la Tabla 2.2.

A la hora de escoger un catalizador para su aplicación industrial, existen una serie de características que hacen a las enzimas más eficientes que los catalizadores químicos. Entre las principales ventajas que surgen de la utilización de enzimas está su elevada especificidad, tanto que permite discriminar entre partes similares de las moléculas (regioespecificidad) e incluso entre isómeros ópticos de una misma molécula (estereoespecificidad) [8, 10, 23]. Otra ventaja importante de las enzimas respecto a los catalizadores químicos es su capacidad de trabajar en condiciones de reacción (temperatura, pH, presión, etc.) suaves, con

lo cual el consumo energético es bajo y el equipamiento necesario no requiere materiales y aspectos constructivos especiales, lo cual resulta favorable para su aplicación industrial [8, 9]. Finalmente es importante destacar que las enzimas, a diferencia de muchos catalizadores, son inalteradas por el proceso que catalizan pudiendo emplearse sucesivas veces [8], no son tóxicas para el ser humano si se usan correctamente [10], son biodegradables [8], etc. En contraste, las enzimas presentan algunos inconvenientes o desventajas a la hora de emplearlas. Si bien tienen una alta actividad en condiciones moderadas de operación, la mayoría son muy lábiles en condiciones de elevada temperatura o pH extremos, inestables en presencia de solventes no acuosos, pueden ser degradadas por proteasas o inactivas en presencia de algunos inhibidores [8, 10, 23]. Además, algunas enzimas y sus coenzimas son costosas o difíciles de conseguir en grandes cantidades [10, 23]. Finalmente es necesario tener en cuenta que si bien muchas enzimas están presente en nuestros alimentos cotidianos, algunas pueden causar alergias cuando son ingeridas o inhaladas [10].

Tabla 2.2. Aplicaciones industriales de las enzimas.

<i>Aplicación</i>	<i>Industria</i>
Enzimas como producto final	Detergentes
	Farmacéutica
	Pienso para animales
	Analítica
Enzimas como coadyuvantes	Textil
	Cuero
	Pulpa y papel
	Azucarera
Enzimas para la producción de alimentos y bebidas	Café
	Láctea
	Cervecera
	Vinos y jugos
	Cárnica
	Panadera
	Aceites

## 2.2. L-Fenilalanina-amonio liasa

### 2.2.1. Descripción general

Con el nombre de L-Fenilalanina amonio liasa se conoce a una serie de enzimas que difieren en su clasificación de acuerdo al sustrato sobre el que están actuando. De este modo, L-Fenilalanina amonio liasa (PAL, EC 4.3.1.24) es la enzima que actúa únicamente en la bioconversión de L-fenilalanina en ácido *trans*-cinámico y amoníaco, mientras que L-Fenilalanina amonio liasa (PAL, EC 4.3.1.25) puede catalizar tanto la bioconversión de L-fenilalanina (L-Phe) en ácido *t*-cinámico (*t*-CA) y amoníaco como la bioconversión de L-tirosina (L-Tyr) en ácido *p*-cumárico (*p*-CA) y amoníaco [24] (Figura 2.14).

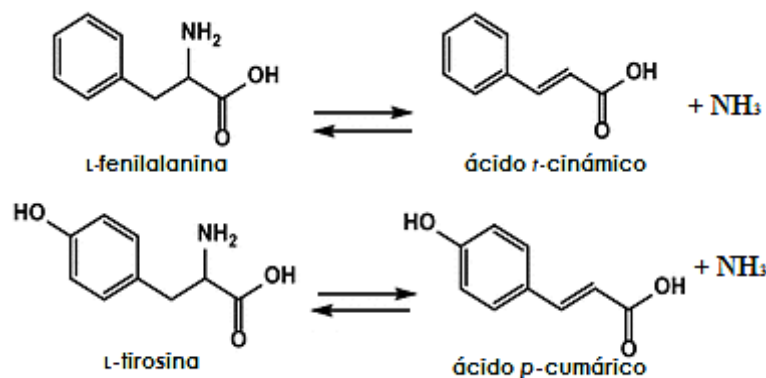


Figura 2.14. Reacciones catalizadas por PAL (EC 4.3.1.25).

PAL se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, principalmente en plantas superiores y microorganismos. En las plantas superiores, PAL es la enzima clave en la ruta de los fenilpropanoides (Figura 2.15), la cual da lugar a una amplia gama de metabolitos secundarios, entre ellos: flavonoides, isoflavonoides, resverstrol, cumarinas, estilbenos, antocianinas, lignina, etc. [25]. El desarrollo de la ruta de los fenilpropanoides, y junto a ella la síntesis de PAL en plantas, tiene su origen en hace 500 millones de años, cuando las primeras plantas aparecieron en la tierra. Las mismas estaban sometidas a un gran estrés por parte del medioambiente, particularmente a la radiación UV y al ataque microbiano [26]. Los metabolitos derivados de esta ruta, han demostrado tener características biológicas muy prometedoras, tales como pigmentación (antocianinas), protección UV (apigenina), actividad antitumoral (luteolina, apigenina), acción antimicrobiana (1-metoxificifolinol, licorisoflavan A, 6,8-difenilgenisteina), acción antiinflamatoria y protección neurológica (rutina, pinocembrina), etc. [25].

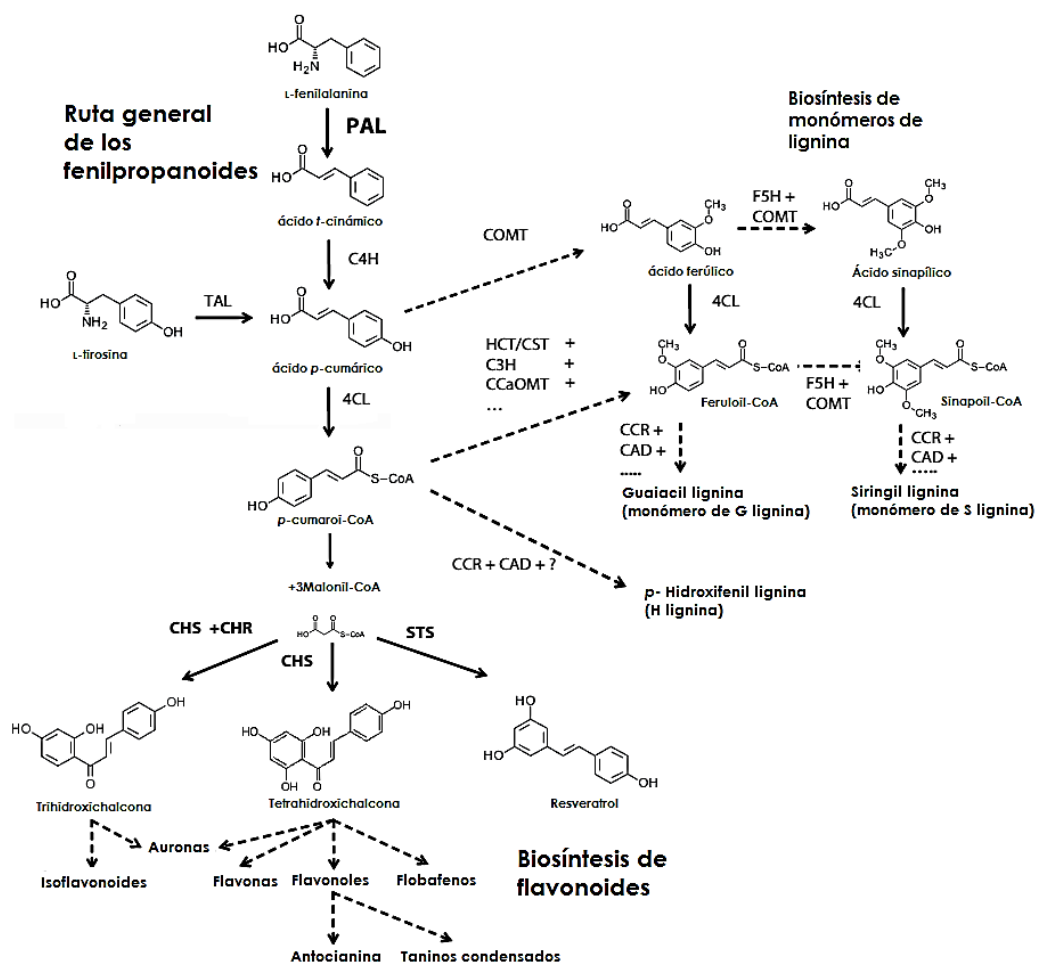


Figura 2.15. Ruta general de los fenilpropanoides [27].

El primer reporte acerca del aislamiento de PAL en plantas superiores surge a partir de investigaciones de Koukol y Conn en el año 1961 [28]. La enzima aislada tenía la capacidad de desaminar L-Phe en *t*-CA, con lo cual la enzima fue primeramente llamada fenilalanina desaminasa. A partir de allí, PAL fue extensamente estudiada en plantas, tanto por su rol en el desarrollo de las plantas, como por su comportamiento bajo diferentes estímulos [29].

En el año 1966, PAL fue aislada por primera vez en microorganismos, específicamente en levaduras del género *Rhodotorula* [30]. Un año después, Ogata y colaboradores realizaron un exhaustivo screening de levaduras de dicho género, encontrando que *Rhodotorula glutinis* (conocida en la actualidad como *Rhodosporidium toruloides*) exhibía una elevada actividad de PAL creciendo en un medio de cultivo con L-Phe como única fuente de carbono y nitrógeno [31]. En cuanto a la función de PAL en estos microorganismos, se piensa que la misma

tiene un rol catabólico, permitiendo que la levadura pueda obtener tanto carbono como nitrógeno a partir de L-Phe.

Respecto a la presencia de PAL en otros organismos, ésta fue aislada también en 12 especies de basidiomicetes [32] y solamente en algunas pocas bacterias [33, 34, 35]. Hasta la actualidad no se reportó la presencia de esta enzima en animales [43].

### 2.2.2. Estructura y propiedades de PAL

La estructura tridimensional de PAL de *R. toruloides* (PAL, EC 4.3.1.25) fue descrita por Calabrese y col. (2004) mediante el uso de cristalografía de rayos X [36]. De este modo se pudo saber que PAL de *R. toruloides* es una enzima intracelular de estructura tetramérica con 4 subunidades idénticas de 716 residuos cada una y un peso molecular de 76,88 kDa por subunidad (Figura 2.16). Cada una de estas subunidades presenta una forma similar a la de un “caballito de mar”, interaccionando desde la parte superior hasta la parte inferior de la subunidad con las dos subunidades adyacentes. En lo que respecta a su estructura secundaria, la mayoría de las cadenas polipeptídicas asumen una configuración del tipo  $\alpha$ -hélice de longitud variable que puede llegar hasta los 61 residuos de largo. Solamente se encontró un pequeño fragmento de no más de 3 residuos de largo que asume una configuración del tipo lámina  $\beta$ -plegada, cercana al sitio activo de la enzima.

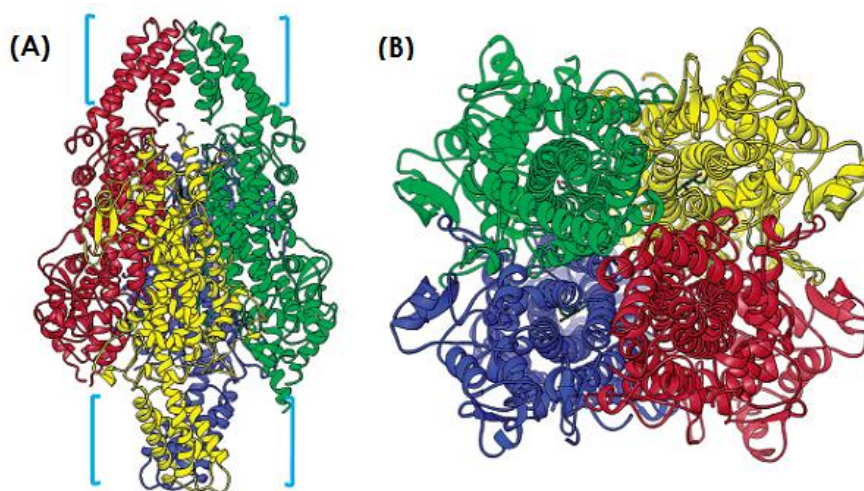


Figura 2.16. Estructura tridimensional de PAL de *R. toruloides* [36].

(A) Vista lateral de PAL (cada subunidad con un color), (B) Vista superior de PAL.

En cuanto a las propiedades de PAL, dependen exclusivamente de la fuente de la enzima y el grado de pureza alcanzado [37]. A partir de su descubrimiento en 1966, PAL de *R. toruloides* ha sido extensamente purificada y caracterizada [38, 39, 40, 41, 42]. Algunos de los parámetros descriptivos de esta enzima se resumen en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3. Propiedades de PAL de *R. toruloides*.

<i>Propiedad</i>	<i>Valor</i>
Peso molecular (kDa)	330
Punto isoelectrico	5,4
$v_{max}$ ( $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ )	1,4
$K_m$ (mmol/l)	0,25
Termoestabilidad	50°C/10 min
pH óptimo	8,5

### 2.2.3. Mecanismo de catálisis de PAL

El mecanismo mediante el cual PAL cataliza la reacción reversible de desaminación de L-Phe para dar lugar a *t*-CA es del tipo Uni-Bi secuencial ordenado [43]. En dicho mecanismo, esquematizado en la Figura 2.17, el S (Phe) se une a la E para luego liberar primeramente el *t*-CA (representado como “Cin”) y luego el amoníaco en forma ordenada.

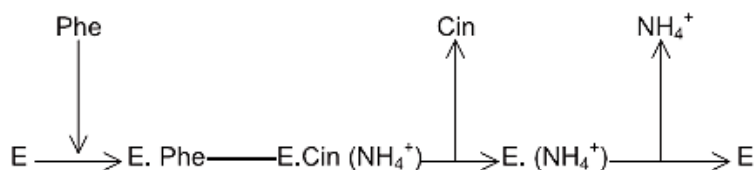


Figura 2.17. Mecanismo de catálisis de PAL [43].

En cuanto al sitio activo de la enzima, se ha reportado, como en muchas aminoácidos amonio liasas, la presencia del grupo protético 3,5-dihidro-5-metiliden-4H-imidazol-4-ona (MIO) [44]. Como puede verse en la Figura 2.18, MIO es un electrófilo producido por ciclación autocatalítica y posterior eliminación de una molécula de agua de un segmento tripeptido interno formado por Ala-Ser-Gly [45]. Las primeras interpretaciones del papel de MIO en la catálisis sugerían que el electrófilo MIO reaccionaba con el grupo amino de la L-

Phe, produciendo la activación y la ruptura del enlace C-H, la formación del doble enlace y la consecuente expulsión del amonio [46]. Más recientemente [47, 48, 49] se halló evidencia de que en realidad MIO ataca el anillo aromático de la L-Phe en una reacción del tipo Friedel-Crafts, para luego activar el enlace C-H y producir la ruptura de dicho enlace mediante un mecanismo del tipo E1cb. Finalmente, luego de la formación del doble enlace y la estabilización del carbanión intermediario, se libera el grupo amino (Figura 2.19).

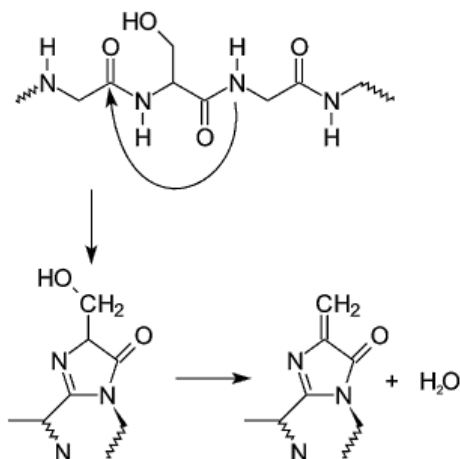


Figura 2.18. Síntesis de MIO [50].

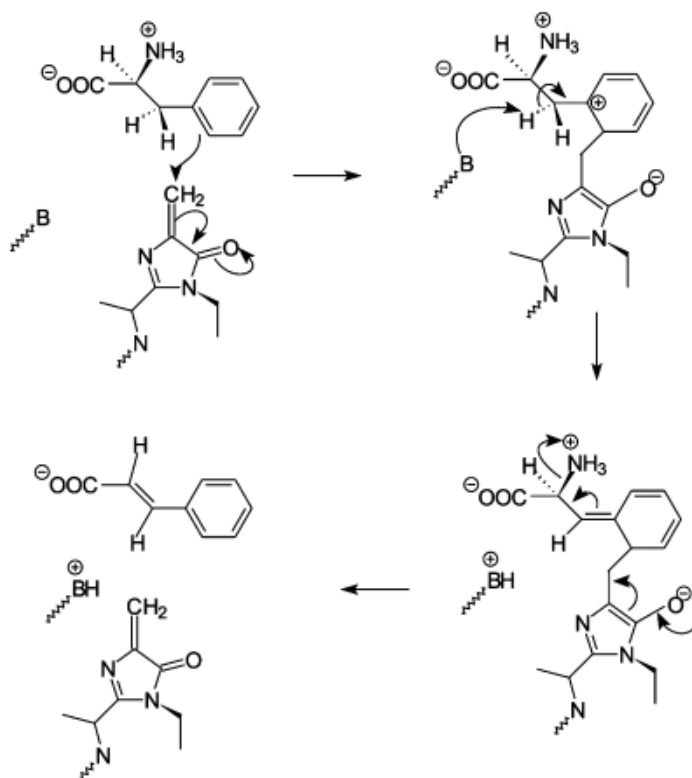


Figura 2.19. Mecanismo propuesto para el papel de MIO en la catálisis [50].

#### 2.2.4. Características cinéticas de PAL

El seguimiento de la reacción catalizada por PAL puede llevarse a cabo mediante el monitoreo de la disminución de L-Phe, así como también la formación de *t*-CA. Por simplicidad lo más frecuente es determinar la actividad de PAL mediante la medida espectrofotométrica de *t*-CA a 290 nm.

Respecto a la cinética de PAL, ésta es compleja y altamente dependiente del origen de la enzima [43]. En el caso particular de PAL de *R. toruloides* se ha propuesto una cinética del tipo Michaelis-Menten, con un  $K_m$  de aproximadamente 0.29 mM [41].

Como ya se mencionó anteriormente, PAL obtenida a partir de *R. toruloides* puede emplear también L-Tyr como sustrato, dando lugar a *p*-CA. Si ambos sustratos se encuentran en la misma mezcla de reacción en condiciones óptimas para la desaminación de L-Phe, L-Tyr se transforma a *p*-CA al 50% de la velocidad de ésta [41]. En cuanto a sus estereoisómeros (D-Phe y D-Tyr), no pueden ser empleados como sustratos [38, 41]. Por otro lado, PAL puede utilizar *t*-CA para la producción de L-Phe, mediante reacción inversa [51, 52, 53, 54]. La reacción es reversible a elevadas concentraciones de amonio (>7 M) y pH entre 10 y 11,5 [52, 53].

En cuanto a la inhibición de la actividad de PAL, se ha reportado que los reactivos del sulfhidrilo, tales como *p*-cloromercuribenzoato y cloruro de mercurio, inhiben la PAL de *R. toruloides* [41]. Además, se ha demostrado que el agente reductor borohidruro de sodio también actúa como inhibidor [41]. En lo que respecta a *t*-CA, se demostró que puede actuar de inhibidor en la reacción inversa de PAL a concentraciones mayores a 60 mM [52]. Algunos derivados de *t*-CA (ie. *p*-hidroxicinamato) pueden actuar también como inhibidores competitivos [38]. En contraste, PAL de *R. toruloides* no es afectada por la presencia de metales pesados, compuestos quelantes o reactivos carbonilos [41], los cuales pueden inhibir PAL obtenida de otras fuentes [43].

Finalmente, se sabe que la actividad PAL en las células suele declinar rápidamente durante el transcurso de la reacción [43]. Con la finalidad de estabilizar la actividad PAL *in vivo*, se ha propuesto la incorporación de L-iso-leucina (L-Ile) en el medio de cultivo [52] así como también pequeñas concentraciones de  $Mg^{+2}$  y glicerol durante la incubación [55].

### 2.2.5. Producción biotecnológica de PAL

Debido a la importancia de esta enzima y su potencial aplicación en el campo de la síntesis orgánica y la medicina, se han estudiado diferentes estrategias para la producción de PAL con elevada actividad.

La inducción enzimática es una de las estrategias más empleadas para mejorar la producción de enzimas [29]. En este sentido los sustratos de la enzima actúan como los mejores inductores. En lo que respecta a PAL, L-Phe ha demostrado ser eficiente en la inducción de PAL [52], así como también otros aminoácidos, tales como D-fenilalanina, L-isoleucina, D-isoleucina, L-leucina, D-leucina, L-valina, L-metionina, L-triptofano y L-tirosina [56]. También se ha reportado que la presencia de glucosa en el medio de cultivo reprime la biosíntesis de PAL [57].

Debido a que la enzima es citoplasmática, requiere ser extraída por metodologías de ruptura celular y posteriormente purificada, o bien pueden emplearse diferentes métodos de permeabilización los cuales permiten emplear la enzima dentro de su ambiente natural, la célula. En cuanto a los métodos de permeabilización se ha reportado la utilización de técnicas de ultrasonido, solventes orgánicos, surfactantes y enzimas líticas [58].

En cuanto a los microorganismos a emplear para la producción biotecnológica de PAL, como ya se mencionó anteriormente, la especie *Rhodospiridium toruloides* es una de las levaduras más empleadas, debido a su elevada actividad PAL y sus bajos requerimientos nutricionales. *R. toruloides* (NBRC 0559) es una levadura basidiomicete, cuyo amorfo es la especie *Rhodotorula glutinis* [59]. Se lo aisló primeramente en la pulpa de madera de algunas coníferas [60], pero se encuentra presente en el aire y el suelo. Tiene la característica de ser una levadura oleaginosa, pudiendo acumular hasta 75% de su peso en lípidos [61]. Además es capaz de sintetizar pigmentos (carotenoides) de color salmón, como mecanismo de fotoprotección contra radiaciones de ciertas longitudes de onda [62]. Estos pigmentos son los que le confieren su coloración cuando es cultivado *in vitro* (Figura 2.20). En cuanto a sus características de cultivo, *R. toruloides* es un microorganismo aeróbico, con una temperatura óptima de crecimiento de 24°C - 30°C y un pH entre 5,2 y 6,0 [63]. Además, tiene

requerimientos nutricionales sencillos, pudiendo crecer en una amplia gama de FC y FN y no requiere de vitaminas para su crecimiento [63].



Figura 2.20. Cultivo en medio sólido de *R. toruloides* [64].

Finalmente en lo que respecta a la producción de biocatalizadores, resulta indispensable encontrar técnicas adecuadas de inmovilización las cuales permitan poder estabilizar el mismo, aislarlo sin dificultad y poder reutilizarlos en los subsiguientes procesos. Dichas tecnologías de inmovilización serán eficientes siempre y cuando sean económicas (teniendo en mente el producto obtenido), de fácil preparación, estables en las condiciones de reacción, no tóxicas, etc. De este punto en particular se discutirá más adelante.

### 2.2.6. Aplicaciones de PAL

PAL es una de las pocas enzimas no hidrolíticas que han sido extensamente estudiadas por aplicación industrial [43]. Tanto la reacción fisiológica que produce *t*-CA como la reacción inversa revisten interés en el campo de la industria química y en la medicina.

Se ha mencionado previamente las condiciones necesarias para la reacción inversa de PAL [52, 53, 55]. Dicha reacción tiene especial interés para la industria farmacéutica y alimenticia. Por un lado se sabe que L-Phe es un aminoácido esencial y, por lo tanto, es empleado por la industria farmacéutica para la formulación de suplementos dietéticos. Por otro lado, L-Phe es uno de los precursores necesarios para la fabricación del edulcorante artificial aspartamo, con lo cual la demanda de este aminoácido por parte de la industria alimenticia, se ha incrementado en los últimos años [29].

Adicionalmente, se ha observado que al aumentar la actividad PAL, aumenta el deterioro de vegetales de hojas [65]. En este sentido PAL también es importante para la industria alimenticia ya que la comprensión de los factores que aumentan la actividad, junto con el desarrollo de métodos de inhibición (por ejemplo el tratamiento con ozono) permitiría aumentar la vida útil de los vegetales procesados.

En cuanto a las aplicaciones médicas, PAL ha sido estudiada por su potencialidad en el tratamiento de ciertos tumores (adenocarcinoma y melanoma). En este sentido, se ha demostrado que PAL inhibe el crecimiento de células neoplásicas *in vitro*, produciendo la cura de ratones inoculados con leucemia linfoblástica [66, 67].

A pesar de la importancia que tiene lo anteriormente mencionado, el principal interés de la medicina en esta enzima se encuentra en su aplicación para la detección y tratamiento de la fenilcetonuria. La detección temprana de la fenilcetonuria es de suma importancia a fin de diagnosticar tempranamente la enfermedad y así poder tratar al paciente inmediatamente, evitando daños a largo plazo. En este sentido PAL se ha empleado en la cuantificación tanto de L-Phe como L-Tyr en plasma y orina para el diagnóstico de fenilcetonuria en neonatos [43]. Más recientemente se ha desarrollado un biosensor empleando PAL para la cuantificación de L-Phe en sangre de neonatos [68]. En cuanto al tratamiento, si bien actualmente no se ha hallado un tratamiento clínico eficiente para la enfermedad, se ha investigado una serie de alternativas que incluyen el uso de PAL. Los primeros estudios indagaron en la administración de soluciones de PAL recombinante en roedores con hiperfenilalaninemias, por vía oral o subcutánea. Estos estudios tenían la finalidad de disminuir rápidamente la concentración de L-Phe en el plasma [69, 70]. Aun cuando se logró este objetivo, estos resultados no pudieron repetirse en el tiempo debido a la respuesta inmune que desarrollaron dichos roedores. Es más, estos preparados de PAL eran degradados en el lumen intestinal debido a la presencia de proteasas [29]. Para resolver esta problemática en los últimos años se viene trabajando en la protección y estabilización de PAL recombinante mediante pegilación con polietilenglicol (PEG-PAL), la cual es aplicada a los ratones, vía subcutánea u oral [71, 72, 73]. Estos últimos ensayos, aunque son muy prometedores, aún se encuentran en fase preclínica.

## 2.3. Fenilcetonuria.

### 2.3.1. Etiología de la enfermedad

La Fenilcetonuria (PKU) es un desorden metabólico congénito caracterizado por la alteración en el metabolismo de la fenilalanina, debido a la deficiencia total o parcial de L-Fenilalanina hidroxilasa (PAH; EC 1.14.16.1). PAH es una enzima clave en el catabolismo de L-Phe, ya que cataliza la hidroxilación de L-Phe en L-Tyr en el hígado (Figura 2.21) [74]. Cuando la esta ruta es bloqueada, la L-Phe se acumula en el torrente sanguíneo ocasionando graves trastornos cognitivos y microcefalia. Luego, el exceso de L-Phe se excreta por la orina en forma de ácido fenilpirúvico. La presencia de este ácido, de un aroma característico en la orina de pacientes con retrasos mentales, fue el indicio que hizo que Fölling en el año 1934 describa la enfermedad por primera vez. A partir de allí la patología fue ampliamente estudiada, siendo la primera enfermedad detectada con éxito en la pesquisa neonatal [6].

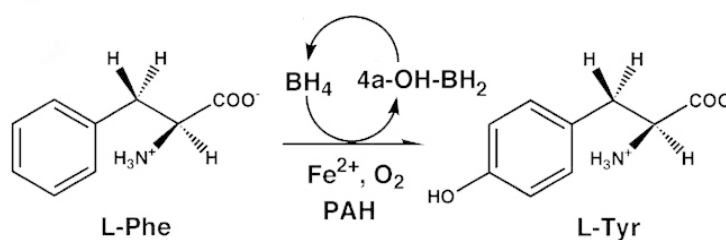


Figura 2.21. Reacción catalizada por PAH [75].

La deficiencia de PAH es un desorden autosómico-recesivo. Se han detectado más de 400 mutaciones a lo largo del cromosoma 12, donde está localizado el gen que codifica PAH. La severidad de este desorden está relacionada con la naturaleza de las mutaciones [6].

Adicionalmente PAH requiere el cofactor (6R)-L-erythro-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>), oxígeno molecular y Fe<sup>2+</sup> enlazado al sitio activo [76]. BH<sub>4</sub> es el donador de electrones durante la catálisis de PAH oxidándose a dihidrobiopterina (qBH<sub>2</sub>). Luego, la qBH<sub>2</sub> se reduce de nuevo a BH<sub>4</sub>, a través de una reacción catalizada por la dihidropterina reductasa (DHPR: EC 1.6.99.7) [77]. La deficiencia en la biosíntesis o reciclado del cofactor BH<sub>4</sub> es reconocido como la principal causa de una variante leve de PKU, la cual puede ser parcialmente tratada con la suplementación del mismo [78]. En el caso de las

hiperfenilalaninemias causadas por defecto del cofactor BH<sub>4</sub>, no sólo afecta la hidroxilación de la fenilalanina, sino que también de la tirosina y del triptófano, dando lugar a deficiencias en 3-5 dihidroxifenilalanina (L-DOPA) y 5-hidroxitriptófano (5HT). Como consecuencia de ello, la síntesis de neurotransmisores dopaminérgicos y serotoninérgicos también se ve afectada por esta condición [77].

### 2.3.2. Clasificación

Aun cuando PKU es uno de los desórdenes metabólicos más comunes a lo largo del mundo (Tabla 2.4), no hay consenso mundial acerca de su clasificación.

Tabla 2.4. Incidencia de PKU a lo largo del mundo [79, 80].

<i>País</i>	<i>Incidencia de PKU</i>	<i>País</i>	<i>Incidencia de PKU</i>
Argentina	1 : 28200	Italia	1 : 17000
Australia	1 : 10000	Japón	1 : 125000
Brasil	1 : 23600	Corea	1 : 41000
Canadá	1 : 22000	México	1 : 161700
Chile	1 : 19600	Noruega	1 : 14500
China	1 : 17000	Paraguay	1 : 31600
Costa Rica	1 : 49200	Perú	1 : 48900
Cuba	1 : 52600	Escocia	1 : 5300
Finlandia	< 1 : 100000	España	1 : 6500
Francia	1 : 13500	Turquía	1 : 2600
Alemania	1 : 8500	Inglaterra	1 : 14300
Hungría	1 : 11000	Uruguay	1 : 20900
India	1 : 18300	USA	1 : 15000
Irlanda	1 : 4500	Yemenitas (Israel)	1 : 5300

En general pueden reconocerse 4 categorías de acuerdo a los niveles de L-Phe en pacientes sin tratamiento [81]:

- PKU clásica: es la variante más severa de la enfermedad. Está caracterizada por niveles de L-Phe en plasma mayores a 1200  $\mu\text{mol/l}$  (> 20 mg/dl).

- PKU moderada: caracterizada por niveles de L-Phe en plasma entre 600 y 1200  $\mu\text{mol/l}$  (10 a 20 mg/dl).
- PKU leve: caracterizada por niveles de L-Phe en plasma entre 360 y 600  $\mu\text{mol/l}$  (6 a 10 mg/dl).
- Hiperfenilalaninemia leve (mHPA): caracterizada por niveles de L-Phe en plasma entre 120 y 360  $\mu\text{mol/l}$  (2 a 6 mg/dl).

De esta clasificación dependerán los niveles de tolerancia de L-Phe y por ende la rigurosidad del tratamiento a base de una dieta restringida.

### 2.3.3. Sintomatología

La deficiencia en la actividad de PAH produce una serie de trastornos dependiendo de la severidad. En principio la ausencia de tirosina y otros compuestos derivados que actúan en la síntesis de neurotransmisores, ocasiona a corto plazo diferentes grados de disfunción cerebral. A su vez, en los pacientes con PKU, la fenilalanina se acumula en el torrente sanguíneo, ocasionando alteraciones estructurales del Sistema Nervioso Central, caracterizada por graves trastornos en el desarrollo mental en los niños afectados. De no ser detectada a tiempo y recibir un tratamiento inmediato, puede derivar en secuelas neurológicas irreversibles y diferentes grados de discapacidad mental [6].

Los síntomas en el niño aparecen a partir de los tres meses y se caracterizan por la pérdida de interés del niño respecto a su entorno. La evidencia de retrasos mentales suelen ser claros al año de edad. Algunos de los síntomas perceptibles en pacientes sin tratamiento, se detallan a continuación [6, 82]:

- Microcefalia.
- Carácter irritable, inquieto y destructivo.
- Depresión, aislamiento social, baja autoestima y problemas para comunicarse con las personas.
- Bajo coeficiente intelectual.
- Liberación de un olor similar a “moho” por la producción de ácido fenilacético, excretado por orina y sudor.
- Piel seca con presencia de erupciones.
- Convulsiones y temblores involuntarios.

- Hipopigmentación del cabello, iris y piel. Esto se debe a que la tirosina está ligada directamente con la producción de melaninas.

Estos síntomas, perfectamente visibles en pacientes no tratados, son raramente perceptibles en la actualidad en países donde el diagnóstico neonatal evita daños degenerativos. Sin embargo, la realidad es distinta en países donde aún no existe pesquisa neonatal y los controles son casi inexistentes [6].

#### 2.3.4. Detección

Desde el descubrimiento de la enfermedad en el año 1934, se han desarrollado diferentes metodologías bioquímicas a fin de poder cuantificar los niveles de L-Phe y de este modo diagnosticar la enfermedad.

El primer programa de pesquisa de PKU se implementó en Estados Unidos en el año 1957 y se trataba de la determinación de fenilpiruvato en orina por medio de un test empleando cloruro férrico. Sin embargo, esta metodología no tuvo impacto favorable, ya que los niveles detectables de fenilpiruvato en orina implicaban niveles dañinos de L-Phe en sangre. De este modo la técnica presentaba muchos falsos negativos, con lo que no revestía utilidad para el diagnóstico precoz de pacientes con PKU [83].

Más adelante, en 1963, Guthrie y Susie [84] desarrollaron una de las técnicas más empleadas y efectivas para la detección de PKU. Esta técnica se basa en la determinación semi-cuantitativa de L-Phe por ensayo de inhibición del crecimiento de la cepa *Bacillus subtilis*. Para ello se emplea una pequeña gota de sangre del talón del recién nacido, la cual se impregna en un disco de papel. Dicho disco se coloca sobre una placa de Petri inoculada con la cepa *Bacillus subtilis* la cual contiene además un inhibidor del crecimiento (B-2 tienilalanina). Debido a que la inhibición puede ser superada por la presencia de altos niveles de L-Phe, el crecimiento de la cepa tras una noche de incubación puede ser indicador de PKU (Figura 2.22). Para cuantificar la técnica se compara el crecimiento con sangre normal a la cual se le adiciona diferentes concentraciones de L-Phe. Si la concentración de L-Phe es menor que 2 mg/dl se considera fisiológico, si está entre 2 y 4 mg/dl debe reiterarse la prueba luego de unos días y si tiene más de 4 mg/dl se considera patológico. Este test demostró ser específico, barato, sencillo y

sólo requiere una pequeña gota de sangre, con lo cual fue ampliamente utilizado en pesquisas neonatales desde entonces.

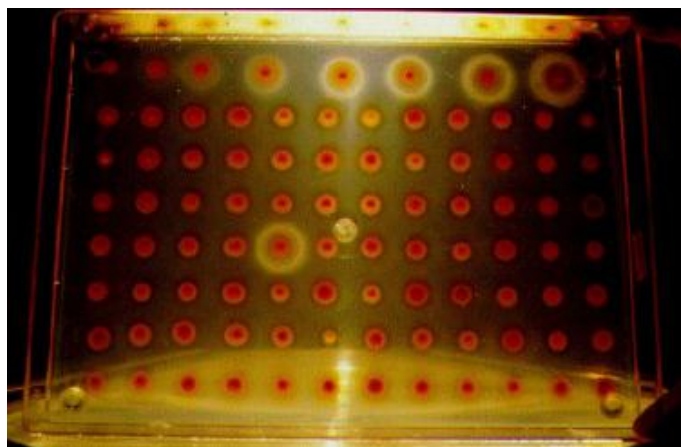


Figura 2.22. Test de Guthrie [85].

En la actualidad, el protocolo de detección y los niveles de corte para el diagnóstico de PKU varían de acuerdo al país donde se realice la pesquisa. En general es posible detectar tempranamente la enfermedad (2 o 3 días a partir del nacimiento). Para ello es indispensable que el paciente haya consumido leche materna, ya que de otro modo, no se observará niveles elevados de fenilalanina aun cuando la enfermedad esté presente.

Debido a que existen otras patologías además de PKU que pueden elevar los niveles de fenilalanina en sangre (defectos en BH4 o bien disfunción hepática) resulta imprescindible la medida tanto de L-Phe como L-Tyr en sangre. Si el paciente tiene una relación mayor a 3 entre ambos aminoácidos, es altamente probable que contenga la enfermedad [6].

Adicionalmente, con la finalidad de prescribir el tratamiento adecuado de acuerdo a las variantes de PKU e hiperfenilalaninemia, es necesario un diagnóstico diferencial en todos aquellos pacientes con niveles de L-Phe mayores a 2,5 mg/dl. Dicho diagnóstico diferencial incluye [77]:

- Cuantificación total de aminoácidos en plasma o suero.
- Determinación de actividad DHPR en eritrocitos.
- Cuantificación de aminoácidos, ácidos orgánicos y proteínas en orina de 12 h congelada y almacenada en oscuridad.
- Determinación de L-Phe en sangre de los padres y hermanos, si los hubiere.

Para llevar a cabo estos estudios se cuenta en la actualidad con técnicas avanzadas, precisas y rápidas, tales como Espectrometría de masa, Fluorimetría y kits colorimétricos. Estos análisis se realizan hoy en día en los laboratorios de los centros médicos y luego se cotejan con las determinaciones realizadas en laboratorios de referencia.

### **2.3.5. Tratamiento**

El objetivo del tratamiento de PKU es mantener los niveles de L-Phe en plasma entre 120 a 360  $\mu\text{mol/l}$ , donde no se observa daño neurológico [81]. Dichos niveles dependerán de dos factores esenciales: la actividad residual de PAH y la ingesta de L-Phe a través de la dieta [6].

Si bien se han desarrollado pruebas clínicas para erradicar la enfermedad, no existe hasta la fecha un tratamiento efectivo que no signifique la limitación del consumo de alimentos proteicos que contengan L-Phe en su composición. Esto implica que los pacientes, dependiendo de la severidad de la enfermedad, deben seguir una estricta dieta, baja en proteínas de origen animal y vegetal. Entre los alimentos más comúnmente ingeridos en los que está presente el aminoácido en cuestión se encuentran: leche materna y de otros mamíferos, huevos, pollo, carne vacuna, cerdo, salmón, sardinas, cereales, harina, soja, arroz, bebidas dietéticas que contengan aspartamo, algunas golosinas, etc. [6]. Existe sin embargo un grupo de alimentos denominados “alimentos libres” los cuales tienen niveles de L-Phe muy bajos en su composición y por ende pueden ser consumidos, casi sin restricción, por los pacientes con PKU [86]. Si bien la categoría de “alimentos libres” difiere entre los diversos centros de referencia, la mayoría incluyen: azúcar, aceite, vinagre, miel, especias, jugo de manzana, algunas golosinas y algunas frutas y verduras [86].

Debido a la importancia del consumo de proteínas para el desarrollo, los pacientes con PKU deben suplir la deficiencia en aminoácidos esenciales mediante la ingesta de fórmulas consistentes en una mezcla de aminoácidos sintéticos con escaso o nulo contenido de Phe [87]. Dichas fórmulas pueden o no estar suplementadas con carbohidratos, lípidos, vitaminas, minerales, etc. Estas fórmulas se presentan frecuentemente en el mercado como bebidas o bien polvos para reconstituir. Debido a que las mezclas de aminoácidos tienen gustos no

agradables, se incorporan saborizantes y a la vez se diluyen. En consecuencia se requiere consumir un elevado volumen a lo largo del día para completar los requerimientos diarios de aminoácidos. Existen reportes que indican que este tipo de suplemento inhibe el apetito y produce algunos problemas gastrointestinales en niños con PKU [88]. Las nuevas formulaciones tienen como objetivo reducir los volúmenes a ingerir y el poder calórico de las mismas, con la finalidad de evitar estas problemáticas [89].

Como se ha mencionado anteriormente, la tolerancia en la ingesta de L-Phe dependerá del tipo de PKU o HPA. Adicionalmente, una suplementación adecuada debe tener en cuenta la edad del paciente, ya que los requerimientos nutricionales para el desarrollo normal del sistema nervioso central disminuyen con la edad. En cuanto a la dosificación de la dieta, existen variados criterios a lo largo del mundo [90]. En la presente tesis tomaremos como referencia las recomendaciones de la FAO, las cuales se resumen en la Tabla 2.5.

Tabla 2.5. Guía de administración de dieta para pacientes con PKU. PAVB: proteína de alto valor biológico (carne, leche cereales, etc.), PrXPhe: proteína contenida en fórmulas, PBVB: proteína de bajo valor biológico (frutas, verduras sin Phe) [77].

<i>Severidad</i>	<i>Parámetro</i>	<i>0 a 3 meses</i>	<i>1 a 3 años</i>	<i>10 a 15 años</i>
PKU clásica	PAVB (g/día)	≤5	≤6	≤6
	Phe (mg/kg/día)	35-50	15-20	-
	PrXPhe (g/kg/día)	2,5-3,0	2,5-3,0	1,7-2,0
	PBVB	No	Libre	Libre
PKU moderada	PAVB (g/día)	≤5	≤12	≤20
	Phe (mg/kg/día)	35-50	40-50	-
	PrXPhe (g/kg/día)	2,5-3,0	2,0	1,7-2,0
	PBVB	No	Libre	Libre
PKU leve	PAVB (g/kg/día)	≤1,5	≤1,5	-
	Phe (mg/kg/día)	-	-	-
	PrXPhe (g/kg/día)	1,5	1,5	1
	PBVB	No	Libres	Libres

Como puede observarse en la Tabla 2.5, los pacientes con PKU requieren una concentración mínima de L-Phe para el desarrollo y crecimiento normal. Ésta

dependerá de la edad y de la tolerancia a PAVB, la cual está directamente relacionada a la severidad de la enfermedad. Cabe destacar que cada individuo es diferente, con lo cual la dieta y la dosificación de las fórmulas deben estar acorde a las características particulares de cada uno y a su vez deben llevarse a cabo seguimientos periódicos del paciente.

En lo que respecta a pacientes con mHPA, los mismos no se encuentran contemplados en la Tabla 2.5 debido a que pueden seguir una alimentación normal siempre y cuando mantengan niveles de Phe en sangre  $<6$  mg/dl o  $<3$  mg/dl en caso de mujeres embarazadas. En algunas situaciones puntuales (fiebre, alergias, etc.) los niveles de Phe pueden verse incrementados, con lo cual estos pacientes deben disminuir el consumo de PAVB.

### **2.3.6. Nuevas alternativas terapéuticas**

Desde que PKU fue descubierta, se han abordados muchos estudios con la finalidad de encontrar la cura de esta enfermedad. Hasta el día de hoy no se ha encontrado ningún método para revertir la deficiencia de PAH. Sin embargo, se están estudiando alternativas para poder reemplazar el tratamiento a base de una dieta estricta suplementada con fórmulas de aminoácidos.

En la búsqueda por suplementos dietarios provenientes de fuentes proteicas naturales, se encontró una proteína proveniente del suero, la cual es naturalmente baja en L-Phe. Esta proteína se denominó Glicomacropéptidos (GMP) y fue extensamente estudiada para reemplazar las fórmulas existentes [91]. Uno de los inconvenientes del GMP es que tiene muy baja concentración de tirosina, histidina, leucina, triptófano y arginina, y por ende requiere suplementar estos aminoácidos mediante otra fuente, con lo cual el paciente no puede independizarse de las fórmulas sintéticas. Además, este producto no se encuentra disponible en muchos países aún [6, 82].

Otra alternativa innovadora fueron los aminoácidos neutros de cadena larga (LNAA). Éstos compiten con la L-Phe presente en el plasma para ingresar en el cerebro a través del mismo transportador neuronal (LAT1). Esto implicaría que al incrementar las concentraciones de LNAA en sangre, evitaría que la L-Phe dañe el sistema nervioso central, y a su vez proveería los aminoácidos necesarios para la síntesis de neurotransmisores [92]. Aun cuando resulta atractiva esta

alternativa, existen muchas críticas alrededor, ya que para cumplir su objetivo se requiere ingerir grandes cantidades de LNAA y existen dudas de que si es confiable administrar este tratamiento sin restricción de la dieta, especialmente en niños y mujeres embarazadas [6].

Por otro lado, ya se ha comentado previamente (ver sección 2.3.1) el uso de suplementos de BH4 para tratar la deficiencia de este cofactor, la cual es la principal causa de una variante de PKU. Sin embargo, algunos estudios recientes han demostrado que puede ser beneficiosa la suplementación de BH4 en pacientes con HPA o PKU leve [6]. Aunque el mecanismo de acción del BH4 sobre la deficiencia de PAH no es claro, entre el 20% y 56% de los pacientes sometidos a estas pruebas han logrado una reducción de L-Phe en plasma mayor al 30% [82]. Una evaluación del genotipo del paciente puede predecir si tendrá buena aceptación a la suplementación de BH4. Sin embargo, de ninguna manera debe asumirse dicha respuesta, con lo cual no debe posponerse el tratamiento a base de dieta [82]. Actualmente la fórmula KUVAN, que consiste en un preparado sintético de sapropterina dihidrocloruro, se comercializa en EE.UU. y Europa, y tiene licencia solamente para niños de más de 4 años de edad que han demostrado una respuesta favorable al BH4 [6].

En lo que respecta a mejorar la calidad de vida de los pacientes, se requieren tratamientos dirigidos a la cura definitiva de la enfermedad. En este aspecto toda la atención se enfoca en la terapia génica y en la enzimática. En cuanto a la terapia génica existen dos alternativas, el trasplante de células genéticamente modificadas que expresen un sistema que metabolice la L-Phe, o bien la inserción de los genes necesarios en órganos adecuados del paciente (i.e. músculo esquelético) [82]. Respecto a los antecedentes dentro de lo que es terapia génica, se ha llevado a cabo la infusión del vector adenoviral recombinante que contiene PAH ADNc humano en ratones deficientes en PAH (PAH<sup>enu2</sup>), logrando reducir notablemente la concentración de fenilalanina en sangre a niveles normales. Sin embargo, el efecto resultó transitorio ya que los modelos presentaban una respuesta inmune contra el vector adenoviral, haciendo que esta técnica no sea reproducible [93]. Hasta la actualidad, no hay ningún reporte del uso de terapia génica en humanos [6].

Por otro lado, en lo referente a la terapia enzimática, el objetivo es suministrar enzimas exógenas que logren metabolizar correctamente la L-Phe en

L-Tyr, o bien convertir el exceso de L-Phe en un producto no dañino para el paciente. En este sentido se ha intentado hallar un biocatalizador consistente en PAH aislada del hígado de ratas, purificada e inmovilizada en una matriz de poliacrilamida [94]. Sin embargo, esta alternativa no prosperó debido a que ningún método pudo evitar la degradación de la enzima y su pérdida de actividad [95]. Dentro de todas las alternativas en terapia enzimática, PAL ha brindado los resultados más prometedores, ya que cataliza la conversión de L-Phe en *t*-CA y amonio, ambos inocuos para los pacientes. Por un lado, el *t*-CA se convierte rápidamente en el cuerpo en ácido benzoico y posteriormente en ácido hipúrico el cual es excretado en la orina [96]. Por su parte, el amonio no se acumula en suficiente cantidad como para resultar perjudicial para el paciente [95]. Los aportes más significativos en cuanto a la terapia enzimática empleando PAL, se resumieron en la sección 2.2.6.

En conclusión, se han desarrollado recientemente algunas alternativas en pos del tratamiento, algunas de ellas con resultados prometedores. Sin embargo, la mayoría de ellas no se encuentran disponibles a lo largo del mundo [6] o bien tienen un costo demasiado elevado para países no desarrollados, como es el caso también de las fórmulas de aminoácidos [7]. Además, en muchos países desarrollados el seguro social se encarga de los costos asociados con la enfermedad, lo cual no es común en países en desarrollo o subdesarrollados donde el paciente debe hacerse cargo de los costos del tratamiento total o parcialmente [82].

A pesar de todas las alternativas terapéuticas presentadas en esta sección, ninguna de ellas se está implementando eficientemente a lo largo del mundo, siendo en la actualidad el único tratamiento posible de la enfermedad, la limitación del consumo de L-Phe en la dieta, sumado a una suplementación de los aminoácidos restantes [6].



# Parte II

## *Obtención del biocatalizador*



# Capítulo 3

## Optimización del medio de cultivo para la producción de PAL

---

### 3.1. Objetivos

Los objetivos del presente capítulo son:

- Evaluar diferentes estrategias de inducción de PAL.
- Determinar la influencia de diferentes FCE y FN, en la productividad de biomasa y en la actividad específica de PAL.
- Optimizar el medio de cultivo en lo que respecta composición cualitativa y cuantitativa de los macro y micronutrientes, mediante la aplicación de diversos diseños experimentales.

### 3.2. Fundamentos

#### 3.2.1. Nutrición microbiana

Los microorganismos requieren una serie de nutrientes para la síntesis de las biomoléculas que le permitirán crecer, multiplicarse, mantenerse y sintetizar diferentes productos de interés biotecnológicos, tanto intracelulares como extracelulares. Los requerimientos nutricionales varían entre los microorganismos cualitativamente y cuantitativamente [97]. Sin embargo se sabe, que como todo organismo vivo, requiere cuatro elementos fundamentales para el crecimiento y la reproducción: carbono (C), hidrógeno (H), oxígeno (O) y nitrógeno (N). Estos elementos son la base fundamental de las biomoléculas mayoritarias que constituyen la célula: proteína, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos. De acuerdo a la forma mediante la cual el microorganismo se provee de estos elementos fundamentales, pueden clasificarse en: autótrofos (obtienen el C a partir del CO<sub>2</sub>) y heterótrofos (si obtienen el carbono a partir de la oxidación de compuestos químicos). Además de los cuatro elementos fundamentales, otros

elementos son importantes para la célula: azufre, potasio, fósforo, calcio, hierro, magnesio, entre otros [98].

Todos los nutrientes antes mencionados deben ser suministrados por el medio de cultivo, el cual debe suplir las cantidades mínimas requeridas por el microorganismo. De acuerdo a las concentraciones en las que se encuentran en el medio de cultivo, podemos clasificar a los nutrientes en [99]:

- Macronutrientes: son aquellos nutrientes que se adicionan en concentraciones del orden de g/l.
- Micronutrientes: son aquellos nutrientes que se adicionan en concentraciones en el orden de mg/l o  $\mu\text{g/l}$ .

En cuanto a la naturaleza y función de los nutrientes en el medio de cultivo, podemos hacer la siguiente diferenciación [99]:

- Fuente de carbono y energía (FCE): en microorganismos quimioorganótrofos, la FCE suministra el carbono necesario para la síntesis de macromoléculas y la energía necesaria para llevar a cabo los procesos metabólicos. Un microorganismo típico contiene el 50% de su peso seco en carbono [97], lo que implica que la FCE es un componente primordial en el medio de cultivo. Existe una amplia variedad de compuestos que pueden utilizarse como FCE. Las FCE usualmente empleados son los azúcares fermentables, principalmente monosacáridos (hexosas y pentosas), algunos alcoholes y polioles como por ejemplo el glicerol, sorbitol y algunos hidrocarburos. En la actualidad, con la finalidad de disminuir el costo de los bioprocesos, se están empleando fuentes más económicas, como ser melazas, suero de queso, algunos cereales e incluso desechos industriales. La capacidad de asimilar y emplear la FCE varía respecto al metabolismo de los microorganismos ya que dependerá de que el mismo contenga el pool enzimático necesario para las reacciones de catabolismo y producción de energía. Debido a estas particularidades del metabolismo es necesario estudiar los requerimientos de carbono y energía del microorganismo a fin de optimizar los parámetros de crecimiento y producción de metabolitos de interés biotecnológico.
- Fuente de nitrógeno (FN): Luego del carbono, el nitrógeno es el componente más abundante de la célula, representando aproximadamente

el 12% de su peso seco [97]. La función de la FN en el microorganismo es proveer el nitrógeno requerido para la síntesis de proteínas, ácidos nucleicos y componentes de la pared celular. En la naturaleza, el nitrógeno se encuentra formando parte de compuestos inorgánicos tales como  $N_2$ ,  $NH_3$ ,  $NO_3^-$ , etc. y compuestos orgánicos como aminoácidos, urea, peptonas, etc.

- **Macroelementos:** Existe una amplia gama de compuestos que se requieren para el metabolismo celular. Entre estos compuestos se encuentran: fósforo, azufre, calcio, magnesio, potasio, sodio, etc. Los mismos se incorporan al medio de cultivo en forma de sus sales. En lo que respecta al fósforo, éste es requerido para la síntesis de ácidos nucleicos y otros polímeros celulares. El azufre, por su parte, es necesario para la síntesis de aminoácidos azufrados, biotina, coenzima A, tiamina, entre otros. En cuanto al potasio es empleado como coenzima y además se encuentra unido al ARN y por ende su requerimiento aumenta con el crecimiento microbiano. Finalmente, el magnesio es otro de los macronutrientes más importantes ya que es necesario para la estabilidad de los cromosomas y actúa como cofactor de enzimas que intervienen en el metabolismo.
- **Microelementos:** Son aquellos componentes del medio de cultivos necesarios para el metabolismo celular, que se adicionan en cantidades de trazas. La mayoría de ellos son metales. Algunos ejemplos de estos compuestos son: calcio, hierro, zinc, cobalto, manganeso, cobre, etc. Existe un grupo de microelementos que raramente son esenciales para el crecimiento, entre ellos están sodio, aluminio, cromo, níquel, molibdeno, boro, etc. Algunas situaciones en las que el microorganismo está sometido a estrés, pueden derivar en aumento de los requerimientos de microelementos.
- **Factores de crecimiento:** son aquellos compuestos que se emplean como bloques en la construcción de macromoléculas o bien tienen funciones específicas en el metabolismo y que no son sintetizados por el microorganismo. Entre ellos se encuentran las vitaminas (principalmente las del complejo B), algunos aminoácidos, algunos ácidos grasos y ácidos nucleicos, etc.

Finalmente, otro nutriente esencial para microorganismos aeróbicos y facultativos, es el oxígeno. Este nutriente se suministra al medio de cultivo mediante el intercambio gas-líquido con la atmósfera dentro del biorreactor. Un correcto suministro de oxígeno debe proveer la concentración de oxígeno disuelto adecuada para evitar que el microorganismo se limite en oxígeno. Para ello debe tenerse en cuenta el flujo de aireación, la agitación, el diseño del biorreactor, etc.

### **3.2.2. Medio de cultivo**

#### **3.2.2.1. Diseño del medio de cultivo**

Un correcto diseño del medio de cultivo debe proporcionar todos los compuestos necesarios para el crecimiento, mantenimiento y síntesis de un producto de interés, de acuerdo a la finalidad del cultivo.

En el diseño debe tenerse en cuenta no sólo los requerimientos nutricionales del microorganismo (descritos en la sección 3.2.1) sino también la disponibilidad de los nutrientes adicionados al medio. También deben considerarse los requerimientos especiales del microorganismo para la producción de productos de interés y además los cambios en parámetros fisicoquímicos que se producen debido al metabolismo [99].

Respecto a la disponibilidad de los componentes incorporados en el medio de cultivo, no sólo es importante que el componente esté presente sino que también se encuentre disponible para ser empleado por el microorganismo. Un ejemplo de ello son los metales adicionados al medio de cultivo. Hay metabolitos que pueden actuar sobre los metales como sustancias quelantes o bien precipitantes. Es por ello que es importante tener en cuenta las posibles sustancias que pueden actuar como ligando y, a su vez, la naturaleza de los iones metálicos, ya que no todos tienen la misma afinidad a dichos ligandos [99].

Por otro lado, si el objetivo del cultivo es la síntesis de un producto determinado, es fundamental tener en cuenta si el medio contiene los precursores necesarios para dicha síntesis. Un ejemplo de ello es el agregado de ácido fenil acético para la producción de penicilina [99]. Este punto reviste interés particularmente en el caso de la síntesis enzimática, ya que como se ha detallado en la sección 2.2.5, es fundamental la incorporación de un inductor en el medio de cultivo. En el caso particular de PAL el inductor más empleado es L-Phe [31].

Finalmente, en lo que respecta a los cambios en algunos parámetros fisicoquímicos del medio durante el cultivo, es necesario tenerlos en cuenta ya que la falta de control puede ocasionar ciertos perjuicios. Un ejemplo de ello son los cambios de pH durante el crecimiento, ya sea por la asimilación de glucosa, la utilización de sales de amonio, etc. A fin de mantener el pH en los niveles requeridos será imprescindible el agregado de compuestos que no afecten a la estequiometría (ácidos o álcalis) y el correspondiente control de pH. Alternativamente pueden adicionarse al medio sustancias buffer para amortiguar los cambios de pH durante el cultivo.

De acuerdo a la naturaleza de los componentes del medio de cultivo, éstos pueden clasificarse en medios sintéticos y medios complejos. Los medios sintéticos son aquellos donde se conoce exactamente la composición tanto cualitativamente como cuantitativamente o sea son química y estequiométricamente definidos. Sin embargo, los medios complejos contienen sustancias de origen animal y vegetal de las cuales no se conoce exactamente la composición y presentan elevada variabilidad. Ejemplo de estas sustancias son extracto de levadura, peptonas, harina de soja, macerado de maíz, etc. [99].

### 3.2.2.2. Formulación del medio de cultivo

Una vez definida la composición del medio de cultivo, lo siguiente es determinar en qué cantidad se adicionará cada uno. Para la formulación del medio de cultivo puede emplearse como aproximación la composición elemental del microorganismo. Si bien dicha composición varía de acuerdo al microorganismo, se ha observado del análisis de múltiples microorganismos que puede hallarse una fórmula estándar que promedie a todos los microorganismos. La composición estándar de los microorganismos se presenta en la Tabla 3.1.

Teniendo en cuenta dicha composición se puede escribir la fórmula mínima del microorganismo como:  $\text{CH}_{1,79}\text{O}_{0,5}\text{N}_{0,2}$ . Esta fórmula representa el 95 % de la biomasa (X), el restante 5% contiene el resto de los elementos. Podemos definir así 1 carbono mol de biomasa (Cmol) como la cantidad de biomasa que contiene un átomo gramo de carbono, entonces:

$$Cmol X = \frac{12 g + 1,79 * 1g + 0,5 * 16g + 0,2 * 14g}{0,95} \quad (3.1)$$

$$Cmol X = 25,9 g \quad (3.2)$$

Tabla 3.1. Composición estándar de los microorganismos [99].

<i>Elemento</i>	<i>% peso seco</i>
Carbono	46-47
Nitrógeno	6-7
Oxígeno	31
Hidrógeno	10-11
Fósforo	1-3
Sulfato	0,5-1
Magnesio	0,5-1

De la misma forma que para la biomasa se puede hallar el Cmol de cualquier sustancia que tenga carbono en su composición, algunos ejemplos se muestran en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2. Peso del Cmol de diferentes compuestos.

<i>Compuestos</i>	<i>Fórmula mínima</i>	<i>g/Cmol</i>
Glucosa	CH <sub>2</sub> O	30
Glicerol	CH <sub>2,66</sub> O	30,66
Etanol	CH <sub>3</sub> O <sub>0,5</sub>	23
Metano	CH <sub>4</sub>	16
Ácido oxálico	CHO <sub>2</sub>	45
Ácido acético	CH <sub>2</sub> O	30

Por otro lado debemos tener en cuenta que la FCE adicionada en el medio de cultivo también debe proveer la energía (Q) necesaria para llevar a cabo los procesos metabólicos. A la hora de plantear los balances energéticos debemos tener en cuenta un parámetro que está relacionado directamente con la capacidad de oxidación de una determinada FCE. Este parámetro se denomina grado de reducción ( $\gamma$ ) y se define como la cantidad de electrones que se transfieren al O<sub>2</sub>, disponibles en un Cmol de la sustancia. Para calcular el  $\gamma$  de cualquier compuesto debe tenerse en cuenta el estado de oxidación del carbono (+4), del hidrógeno (+1), del oxígeno (-2) y del nitrógeno (-3). Adicionalmente se toman como referencia ( $\gamma=0$ ) ciertos estados de los elementos tales como: H<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub> y NH<sub>3</sub>.

Luego, si tenemos un compuesto con fórmula mínima  $CH_aO_bN_c$ , el  $\gamma$  se calcula de la siguiente manera:

$$\gamma = 4 + a - 2b - 3c \quad (3.3)$$

A modo de ejemplo plantearemos el caso de la oxidación de glucosa:



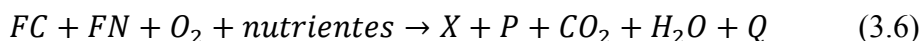
$$\gamma = 4 + 2 - 2 = 4 \quad (3.5)$$

En la Tabla 3.3 se muestra el  $\gamma$  de otros compuestos.

Tabla 3.3. Grado de reducción de algunos compuestos.

<i>Compuestos</i>	<i>Fórmula mínima</i>	<i>e<sup>-</sup>/Cmol</i>
Ácido oxálico	CHO <sub>2</sub>	1
Ácido acético	CH <sub>2</sub> O	4
Glicerol	CH <sub>2,66</sub> O	4,67
Biomasa	CH <sub>1,79</sub> O <sub>0,5</sub> N <sub>0,2</sub>	4,8
Etanol	CH <sub>3</sub> O <sub>0,5</sub>	6
Metano	CH <sub>4</sub>	8

Volviendo al diseño del medio de cultivo, podemos expresar lo anteriormente dicho en forma de ecuación de la siguiente manera:



La velocidad a la cual se produce o consume cada uno de los componentes de esta ecuación se puede expresar como velocidad específica que es la cantidad de sustancia producida o consumida por unidad de biomasa y por unidad de tiempo. Así tenemos por ejemplo la velocidad específica de formación de producto  $q_p$  (Cmol P/Cmol X h), velocidad específica de consumo de oxígeno  $-q_{O_2}$  (mol O<sub>2</sub>/Cmol X h) y velocidad específica de producción de biomasa  $\mu$  (h<sup>-1</sup>). Otra forma de expresar la velocidad de reacción es mediante velocidades volumétricas las cuales no están afectadas por la cantidad de microorganismos sino por el volumen de medio de cultivo. Así, por ejemplo, tenemos la velocidad volumétrica de formación de producto  $r_p$  (Cmol P/l h), velocidad volumétrica de consumo de oxígeno  $-r_{O_2}$  (mol O<sub>2</sub>/l h) y velocidad volumétrica de producción de biomasa  $r_x$  (Cmol X/l h).

En conclusión, una correcta formulación del medio de cultivo debe suministrar como mínimo la cantidad de nutrientes que el microorganismo

requiere para producir una determinada cantidad de biomasa, sumado a los requerimientos de energía y producción de otros metabolitos de interés.

### 3.2.2.3. Optimización del medio de cultivo

En algunos casos particulares es necesaria la optimización del medio de cultivo por razones que pueden incluir [99]:

- Escasa información acerca de los requerimientos nutricionales del microorganismo a emplear.
- Necesidad de maximizar la síntesis de un producto en particular.
- Posibilidad de limitaciones ocultas de algunos nutrientes esenciales para el crecimiento o la formación de un producto de interés.
- Sospecha de presencia de sustancias inhibitorias o estimulantes.
- Utilización de medios con nutrientes en exceso.
- Ensayo de fuentes nutritivas no convencionales, etc.

Para llevar a cabo la optimización del medio de cultivo se deben hacer múltiples ensayos de composición variable. En general, la metodología más usada para microorganismos aeróbicos son ensayos en cultivos sumergidos agitados en erlenmeyer (sistema batch). Este tipo de sistema de cultivo permite variar un componente a la vez y observar el efecto que tiene dicha variación en el crecimiento o bien la síntesis de un producto de interés. En la optimización de los componentes del medio de cultivo las variaciones son tanto cualitativas como cuantitativas. Además para llevar a cabo estos estudios se requiere conocimiento previo de las características cinéticas del microorganismo así como también de sustancias que cumplan una función específica dentro del cultivo, por ejemplo sustancias inhibitorias, estimulantes, inductores, estabilizadores, etc.

Aun cuando el estudio de un factor a la vez brinda información muy útil acerca del cultivo, tiene la desventaja de ser un método muy laborioso, en especial cuando se tratan de muchas variables. Por otro lado, también se pierde información sobre la ocurrencia de interacciones positivas o negativas entre los componentes, la cual se evidencia únicamente cuando se varían los componentes simultáneamente. Como consecuencia de esto último resulta muy valiosa la utilización de diseños experimentales estadísticos que permitan variar

simultáneamente las concentraciones de los componentes con relativamente pocos experimentos.

### **3.2.3. Diseño de experimentos**

#### **3.2.3.1. Definición**

Los diseños de experimentos (DOE) son herramientas muy útiles a la hora de abordar la optimización de una variable en particular. Éstos permiten detectar diferencias significativas entre los diversos tratamientos dentro de un experimento, así como también la magnitud de dichas diferencias. También se pone en evidencia si los datos siguen una tendencia determinada [100].

Los diseños se basan fundamentalmente en esquemas. Para la correcta utilización de dichos esquemas, se requieren seguir una serie de pasos [101]:

- 1) Determinar los factores. Estos pueden ser discretos, continuos o mezcla de ambos y pueden englobarse en factores operacionales (si forman parte del proceso en sí) o ambientales (si forman parte de las condiciones ambientales).
- 2) Definir los niveles entre los cuales se van a investigar los factores. Frecuentemente estos se definen simétricamente respecto al valor nominal del factor, estableciendo de este modo un rango de variación. Al fijar los niveles debe tenerse en cuenta la incertidumbre de los equipos o métodos involucrados para la medición de cada factor, debiendo encontrarse dicho niveles muy por encima de la incertidumbre.
- 3) Seleccionar del diseño experimental adecuado, el cual dependerá en gran medida de la cantidad de factores a analizar y de la información que se desea obtener a partir del mismo.
- 4) Definir el protocolo experimental, lo cual se logra a partir de estudios previos donde se ha llevado a cabo un experimento análogo.
- 5) Especificar la variable respuesta que se va a medir y fijar el modelo empírico que relaciona los factores con dicha respuesta.
- 6) Ejecutar el experimento y medir la variable respuesta. Es muy importante que se use el mismo stock de muestra así como de estándares para evitar variaciones extrínsecas. A su vez es recomendable que se lleven a cabo los diversos tratamientos al azar y que se usen replicados de los experimentos.

- 7) Calcular los efectos de los factores en la variable respuesta.
- 8) Analizar los efectos estadísticamente y/o gráficamente, frecuentemente mediante gráficos probabilísticos.
- 9) Elaborar conclusiones a partir del análisis obtenido.

### 3.2.3.2. Diseño factorial fraccionado

El diseño factorial fraccionado es uno de los diseños experimentales más empleados ya que permite el screening de una gran cantidad de factores simultáneamente en relativamente pocos experimentos. Debido a ello, este tipo de diseño es rápido, menos laborioso y más económico. Se recomienda utilizar este diseño cuando se tiene un número muy grande de factores de los cuales se sospecha que sólo unos pocos tienen influencia sobre la variable respuesta. Una vez identificados dichos factores se debe llevar a cabo un análisis más exhaustivo que incluya los efectos de las interacciones entre los mismos [102].

Uno de los diseños factoriales fraccionados más aplicados en la industria es el diseño de Plackett- Burman [103]. Este tipo de diseño permite analizar el efecto de  $k = N-1$  factores a dos niveles, empleando una matriz reducida de  $N$  experimentos, para  $N$  múltiplos de 4. Esto implica por ejemplo que para analizar 3 factores a dos niveles, en vez de abordar  $2^3$  experimentos, se seleccionarán  $2^{3-1}$  experimentos cubriendo el mayor volumen posible del dominio total de experimentos (Figura 3.1).

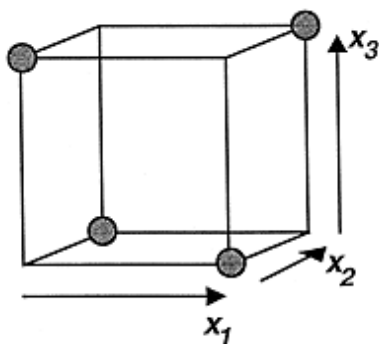


Figura 3.1. Experimentos para diseño factorial fraccionado de tres factores [102].

Para la construcción de la matriz se fija la primer línea (Tabla 3.4) con los niveles superiores (+) y los inferiores (-) y luego en el próximo experimento el primer nivel de la fila anterior se desplaza un factor, y así sucesivamente.

Tabla 3.4. Primera línea de la matriz de Plackett-Burman.

<i>N</i>	<i>Primera fila</i>																						
8	+	+	+	-	+	-	-																
12	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-												
16	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-								
20	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-					
24	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-

Debido a que este tipo de diseño no contempla interacciones entre los factores, la variable respuesta puede describirse mediante un modelo lineal (Ecuación 3.7):

$$y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + e \tag{3.7}$$

Donde *y* es la variable respuesta,  $\beta_0$  es una constante,  $\beta_i$  es el coeficiente lineal,  $x_i$  es el factor y *e* es el residuo.

### 3.2.3.3. Diseño factorial completo

El diseño factorial completo, a diferencia del anterior, permite analizar los factores intervinientes y las interacciones entre ellos. Este diseño admite explorar una zona escogida del dominio experimental y encontrar una dirección prometedora para la optimización posterior [104].

Por su sencillez, los diseños más empleados son los del tipo  $2^k$ , donde *k* es el número de factores. En éstos solamente se estudian dos niveles de cada factor, armando la matriz con todas las combinaciones posibles. Debido a que el número de experimentos crece exponencialmente con la cantidad de factores a analizar, presenta dificultad cuando se tienen que ensayar múltiples factores.

La matriz se construye con  $2^k$  filas y *k* columnas empezando con un signo - (nivel inferior) y se alternan con los signos + (nivel superior) de la siguiente manera: en la primera columna, perteneciente al factor  $x_1$ , se alternan a razón de  $2^0$ ; en la segunda columna, perteneciente al factor  $x_2$ , se alternan a razón de  $2^1$  y en la columna *i*, perteneciente al factor  $x_i$ , se alternan a razón de  $2^{i-1}$ [104]. Para graficar la construcción del diseño y la relación entre los factores se emplea un cuadrado, en el caso que se estén analizando dos factores, y un cubo para tres factores (Figura 3.2).

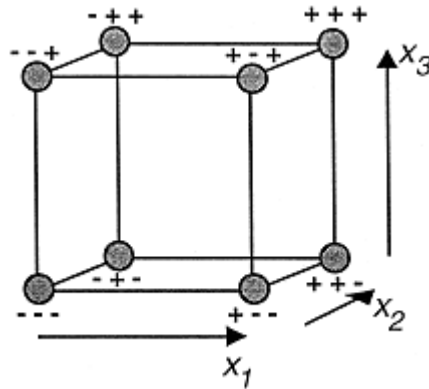


Figura 3.2. Experimentos para diseño factorial completo de tres factores [102].

En todos los diseños factoriales se incorporarán también tres o cuatro controles, con el punto central del rango definido por los niveles. En este último caso en vez de + o - el nivel se indica con un "0" y frecuentemente se trata del nivel basal de los factores a testear. Estos experimentos centrales permiten determinar el intervalo de confianza.

En el caso de los diseños factoriales completos, el modelo ya no es lineal, ya que debe incluir además las interacciones entre los factores. De este modo, la variable respuesta puede ser descrita a través de un modelo de segundo orden (Ecuación 3.8).

$$y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ij} x_i x_j + e \quad (3.8)$$

Donde  $y$  es la variable respuesta,  $\beta_0$  es una constante,  $\beta_i$  es el coeficiente lineal,  $\beta_{ij}$  es el coeficiente de las interacciones,  $x_i$  es el factor y  $e$  es el residuo.

#### 3.2.3.4. Metodología de superficie respuesta (RSM)

La metodología de superficie respuesta es ampliamente usada para la optimización de procesos, ya que permite la construcción de un modelo cuadrático (Ecuación 3.9). Este modelo relaciona la respuesta (variable de salida) con los niveles de los factores que influyen en la respuesta (variables de entrada), pudiendo de este modo hallar un óptimo [102].

$$y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ii} x_i^2 + \sum \beta_{ij} x_i x_j + e \quad (3.9)$$

Donde  $y$  es la variable respuesta,  $\beta_0$  es una constante,  $\beta_i$  es el coeficiente lineal,  $\beta_{ii}$  es el coeficiente cuadrático,  $\beta_{ij}$  el coeficiente de las interacciones,  $x_i$  es el factor y  $e$  es el residuo.

Si hay un único factor que influye en la respuesta, resultará en una curva en 2 dimensiones. Por otro lado, si hay dos factores influyentes, se dará lugar a una representación en forma de superficie o 3 dimensiones. De este modo, si hay  $n$  factores influyentes, se dará lugar a representaciones de  $n+1$  dimensiones [105].

Entre los diseños que pueden emplearse, se encuentra el diseño de Doehlert [106]. Este diseño permite determinar la relación entre las variables y la respuesta con un mínimo de experimentos. Cuando se analizan dos factores a la vez, el diseño se puede representar mediante un hexágono (Figura 3.3).

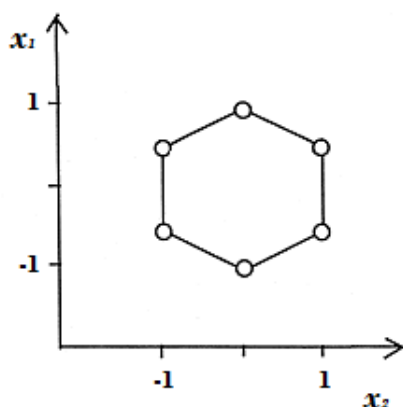


Figura 3.3. Diseño hexagonal de Doehlert.

### 3.2.3.5. Análisis de los resultados

Para el análisis de los resultados de los diseños experimentales, se requiere conocer el efecto de los factores analizados en la respuesta obtenida. Estos se calculan por la resta entre la sumatoria de todas las respuestas donde el factor es positivo dividido por el número de experimentos y la sumatoria de todas las respuestas donde el factor es negativo dividido por el número de experimentos (Ecuación 3.10).

$$E_x = \frac{\sum Y_{(+)} }{N/2} - \frac{\sum Y_{(-)} }{N/2} \quad (3.10)$$

En el caso de las interacciones, los efectos se calculan de la misma manera. Para determinar el signo de las interacciones, se multiplica el signo de los factores de dichas interacciones para cada experimento (Tabla 3.5).

Tabla 3.5. Determinación del signo de las interacciones entre factores.

$x_1$	$x_2$	<i>Interacción</i>
+	+	+
+	-	-
-	+	-
-	-	+

La interpretación de los efectos calculados puede llevarse a cabo numéricamente por análisis estadístico o gráficamente. En general se usan ambas para tener una interpretación más exacta del problema [101].

En lo respecta a la interpretación estadística, ésta permite definir límites para los efectos de las variables con la finalidad de determinar de forma objetiva si un factor es significativo o no. Por simplicidad para el análisis estadístico generalmente se emplea el análisis de varianza (ANOVA) el cual se basa en varios tests de hipótesis simultáneos. La significancia de un factor en este tipo de análisis estará directamente relacionada con el valor  $p$ , el cual se puede calcular a partir de la distribución  $t$  (Ecuación 3.11). El valor  $p$  se compara con el nivel de significancia ( $\alpha$ ) previamente elegido el cual generalmente se fija en 0,1, 0,05 o 0,01. Si  $p < \alpha$ , se descarta la hipótesis nula, lo que significa que el efecto del factor sobre la variable respuesta es estadísticamente significativo.

$$t = \frac{|E_x|}{(SE)_E} \quad (3.11)$$

Donde  $(SE)_E$  es el error estándar de los efectos calculados, el cual representa la variabilidad experimental dentro del diseño.

Si bien ANOVA es muy aplicado para la determinación de la significancia de un efecto, existen diferentes alternativas para calcular el error. Uno de estas alternativas es el algoritmo de Dong [107]. Este algoritmo es considerado un método robusto y estricto en cuanto a hallar factores estadísticamente significativos en una variable respuesta [101].

El algoritmo de Dong se basa en la estimación del error a partir de la distribución de los efectos. Dicha estimación se obtiene a partir de la mediana de los efectos, de la siguiente manera:

$$s_0 = 1,5 \text{ mediana } |E_x| \quad (3.12)$$

El valor de 1,5 en la ecuación 3.12 engloba todos aquellos efectos que de seguir una distribución normal, no se encuentra en la cola de la campana [101]. A partir de  $s_0$  se seleccionan aquellos efectos absolutos que son menores o iguales que 2,5 veces  $s_0$  y se calcula el error estándar ( $s_1$ ).

$$s_1 = \sqrt{m^{-1} \sum E_x^2} \quad (3.13)$$

Donde  $m$  es el número de  $|E_x| \leq 2,5 s_0$ .  $s_1$  se empleará para calcular el llamado margen de error (ME), de la siguiente manera:

$$ME = t_{(1-\frac{\alpha}{2}, df)} s_1 \quad (3.14)$$

Donde  $1-\alpha/2$  es 0.975 para  $p=0.05$  y  $df=m$ . El ME criterio de significancia muy útil cuando un solo nivel debe ser testeado; sin embargo, cuando hay múltiples efectos, la probabilidad de exceder el ME es mayor [101]. Es por ello que se define el margen de error simultáneo (SME), de la siguiente manera:

$$SME = t_{(1-\frac{\alpha^*}{2}, df)} s_1 \quad (3.15)$$

$$\alpha^* = 1 - (1 - \alpha)^{(1/m)} \quad (3.16)$$

$\alpha^*$  se conoce como el nivel de significancia ajustado de Sidak [108].

Para el análisis de significancia se comparan los efectos con el ME y el SME. Los efectos mayores a ME y menores a SME se consideran probablemente significativos, mientras que los efectos que sobrepasan el valor del SME son significativos. Sin embargo, todos aquellos factores probablemente significativos deberían tenerse en cuenta a fin de evitar falsos negativos [101].

En lo que respecta a la interpretación gráfica de los efectos, generalmente esta se lleva a cabo mediante un gráfico de probabilidad normal o bien un gráfico de probabilidad semi-normal (Figura 3.4). En ambos gráficos, los factores no significativos siguen una tendencia lineal alrededor de cero, mientras que los factores significativos se alejan de la misma. La única diferencia entre ambos gráficos es la construcción de los mismos.

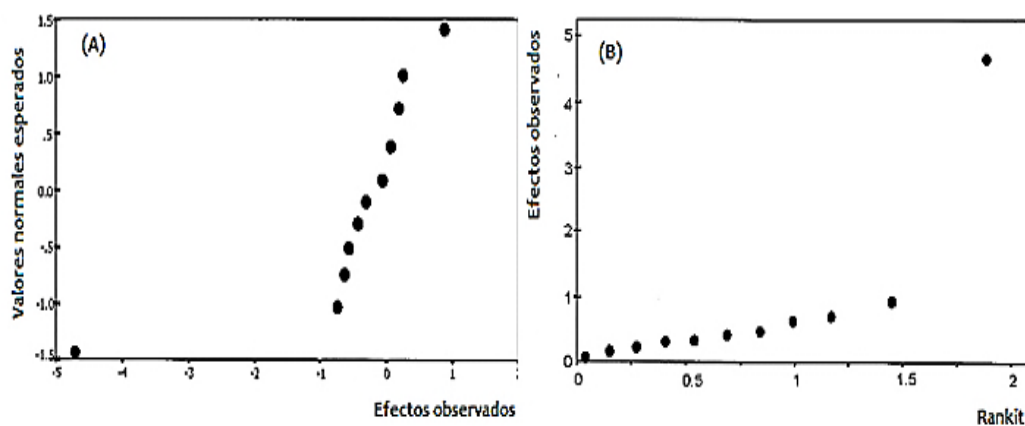


Figura 3.4. Interpretación gráfica de los diseños factoriales [101]. (A) Gráfico de probabilidad normal y (B) Gráfico de probabilidad semi-normal.

### 3.2.3.6. Grado de ajuste de los modelos

A la hora de evaluar el ajuste entre los datos obtenidos y el modelo propuesto para describir la respuesta, existe una serie de parámetros que nos brindan información al respecto.

El primer parámetro es el  $R^2$  e indica la “bondad de ajuste” del modelo (Ecuación 3.17). Puede tomar valores de 0 a 1. Cuanto más cercano a 1, mejor es el ajuste. Para procesos biológicos se propuso como aceptables  $R^2 > 0,7$  [102].

$$R^2 = (SS - SS_{resid})/SS \quad (3.17)$$

Donde  $SS$  es la suma de cuadrados de la variación total de la variable respuesta y  $SS_{resid}$  es la suma de cuadrados debido a los residuos.

Otro parámetro muy importante, es el “lack of fit”. Este parámetro es significativo cuando los factores no representan adecuadamente la respuesta. Esto puede ocurrir cuando en el modelo faltan términos de interacciones o cuadráticos. Este tipo de análisis puede emplearse cuando hay replica de los experimentos, ya que a partir de éstos puede determinarse el “error puro”.

### 3.3. Metodología

#### 3.3.1. Mantenimiento y propagación de la cepa

La cepa *Rhodospiridium toruloides* NBRC 0559, proveniente del Instituto de Fermentaciones en Osaka, Japón, fue provista por el Prof. Osao Adachi. El stock de la cepa se mantuvo viable en el tiempo de dos maneras:

- Congelada a -80°C en glicerol al 80%.
- Liofilizada y almacenada en condiciones de refrigeración.

Para la propagación de la cepa se toma una pequeña porción del stock y se inocula 2,5 ml de medio de cultivo compuesto por 5% (p/v) de glucosa y 1% (p/v) de extracto de levadura. Este cultivo de propagación se incuba a 30°C por 24-36 h. Una vez que se visualiza crecimiento, se realizan disoluciones seriadas en agua peptonada y se toman 100 µl de cada una para sembrar placas con el medio anterior al cual se le ha adicionado 1,5% (p/v) de agar agar. La siembra se realiza en superficie con una espátula de Drigalsky. El objetivo de este paso por medio sólido es aislar las colonias para verificar a simple vista que no haya contaminación de algún tipo. Esto a su vez debe confirmarse mediante la visualización en microscopio óptico. Una vez aisladas las colonias puras, se repican en medio sólido de mantenimiento, específico para la inducción de PAL (Tabla 3.6). Estos repiques se realizan en tubos con agar semi- inclinado y se incuban a 30°C por 7 días (Figura 3.5). Finalmente, se mantienen en condiciones de refrigeración a 5°C y se les agrega vaselina estéril, para evitar la deshidratación del medio.

Tabla 3.6. Medio de mantenimiento de la cepa [52].

<i>Composición</i>	<i>(% p/v)</i>
L-Phe	2
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,25
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,01
Extracto de levadura	0,05
Sacarosa	2
Agar agar	1,5
pH = 6	



Figura 3.5. Propagación de *R. toruloides* en medio sólido.

### 3.3.2. Determinación de la actividad PAL

La determinación de la actividad PAL se llevó a cabo por protocolo modificado de Yamada *et al.* [52]. De acuerdo a éste, la actividad de PAL se mide por determinación de la velocidad formación de *t*-CA (Ecuación 3.18).

$$AE = v_{t \rightarrow 0} = \left( \frac{dP}{dt} \right)_{t \rightarrow 0} \quad (3.18)$$

Una unidad enzimática de PAL (UE) se define como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1  $\mu\text{mol}$  de *t*-CA por minuto en condiciones estándar de reacción (pH = 8,5, 30°C, 10 min). La determinación del ácido cinámico se lleva a cabo por la medida del incremento de densidad óptica (DO) a una longitud de onda de 290 nm.

La mezcla de reacción contiene:

- ~1 mg/ml de muestra (biomasa).
- 25 mM de L- Phe.
- 25 mM de buffer Tris-HCl (pH=8,5).
- 0,005% de CPC.

Si bien los valores  $\text{DO}_{290}$  tanto de blanco sin biomasa, como el blanco sin fenilalanina son muy pequeños a las concentraciones empleadas y a la longitud de onda medida, se opta por medirlos ya que pequeñas variaciones dan indicio del estados de las soluciones patrones.

Para obtener la muestra se toma el volumen necesario de medio de cultivo, se centrifuga a 4000 rpm por 5 min, se elimina el sobrenadante y se llevan a cabo dos lavados sucesivos de la biomasa. Finalmente, el pellet obtenido se congela a -

20°C, hasta su uso. Previo a la determinación, las muestras se descongelan y dispersan en buffer Tris-HCl (0,1 M, pH=8,5) para obtener la concentración celular final requerida en la mezcla de reacción. En el caso de la enzima pura, la determinación se lleva a cabo por cinética, mientras que para las células permeabilizadas, debido a problemas de sedimentación durante el ensayo, se deben incubar por 10 min a 30°C en baño termostático con agitación ocasional. Para detener la reacción se agrega 10% (v/v) de ácido tricloroacético (TCA) al 20% (p/v) para desnaturalizar la enzima. Finalmente, se centrifuga a 10000 rpm por 10 min para eliminar el precipitado proteico y se mide la  $DO_{290}$  en el sobrenadante.

La AE volumétrica se calcula a partir de las determinaciones espectrofotométricas, de la siguiente manera (Ecuación 3.19):

$$AE \left( \frac{mU}{ml} \right) = \frac{\Delta DO}{min} \frac{a}{\epsilon b} \frac{V_f}{V_i} f_d 1000 \quad (3.19)$$

Dónde:

- $\Delta OD$  = Densidad óptica a 290 nm.
- $\epsilon$  = Coeficiente de extinción molar [10000 l/(mol cm)].
- b = espesor de la cubeta (1 cm).
- $V_f$  = Volumen total de reacción (500  $\mu$ l).
- $V_i$  = Volumen de la muestra a ensayar (25  $\mu$ l).
- $f_d$  = factor de dilución.
- a = factor de conversión de unidades [1000  $\mu$ mol l/(ml mol)].

Por otro lado, la AE específica, se calcula a partir de la ecuación 3.19, dividiendo por X expresado en peso seco (Ver anexo 1):

$$AE \left( \frac{mU}{mg} \right) = \frac{AE (mU/ml)}{X (mg/ml)} \quad (3.20)$$

### 3.3.3. Estrategias de inducción de PAL

En un cultivo destinado a la producción de enzimas, si bien se pretende obtener una elevada actividad específica, lo ideal es además maximizar la productividad (cantidad de biomasa por unidad de tiempo). A partir de los cultivos preliminares y de los datos bibliográficos [39] se sabe que se obtienen altas actividades específicas de PAL en cultivos empleando L-Phe como inductor y

única FC y FN. Sin embargo, se ha observado que dichos cultivo tienen muy baja productividad, o dicho de otro modo, baja velocidad de producción de X. Por otro lado, si bien la glucosa es la FCE por excelencia utilizada en los microorganismos, como ya se mencionó en la sección 2.2.5, se presume que la síntesis de PAL es reprimida por la presencia de glucosa en el medio. A partir de estas premisas, una estrategia de inducción válida sería hacer crecer la cepa en un medio con glucosa como FCE y una vez agotada en el medio inducir la enzima mediante el agregado de L-Phe. Adicionalmente, se requiere que la actividad se mantenga constante en el tiempo, ya que si la actividad decae durante el cultivo, es necesario un control más riguroso del proceso. En este sentido se ha reportado el uso de L-Ile como estabilizador de PAL (Ver sección 2.2.4).

Debido a todo lo antedicho se estudiará un sistema de inducción basado en dos etapas:

Etapa de crecimiento: La misma tiene como único objetivo la producción de biomasa. Se empleará para ello un medio de cultivo estándar para crecimiento de levadura, limitado en FCE (Tabla 3.7). El mismo se modificó de acuerdo a los requerimientos nutritivos de la levadura. A este medio se le adiciona buffer fosfato cítrico, cuya composición es 2,5 g/l  $\text{PO}_4\text{HK}_2$  y 1,09 g/l ácido cítrico, para mantener el cultivo tamponado a pH=6. El medio de cultivo se esteriliza por calor húmedo en autoclave durante 15 min a 121°C. Tanto la glucosa como los fosfatos se esterilizan por calor separados del medio, mientras que las vitaminas, al ser termolábiles, se esterilizan por filtración. En esta etapa no se agregaron al medio L-Phe e L-Ile. El cultivo se llevó a cabo por triplicado en erlenmeyer de 1000 ml, con una relación Vol. medio/Vol. erlenmeyer del 10%, para evitar limitaciones por transferencia de oxígeno. Se empleó como inóculo células frescas las cuales se resuspendieron en agua destilada, se contaron mediante cámara de Neubauer (Ver Anexo 2) y se adicionaron al medio de cultivo a razón de  $1,5 \cdot 10^7$  UFC/ml. Se incubó en shaker rotatorio a 180 rpm y 30 °C y se tomó muestra cada 6 h. A cada muestra se le determinó: pH, X ( $\text{DO}_{660}$ , peso seco) y glucosa por medio de kit colorimétrico (Ver Anexo 3).

Tabla 3.7. Medio estándar para crecimiento de levaduras [109].

<i>Composición</i>	<i>Cantidad</i>
Glucosa	5 g/l
SO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	1,5 g/l
KCl	0,145 g/l
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,075 g/l
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,07 g/l
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	3,9 mg/l
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	2,4 mg/l
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,5 mg/l
MnSO <sub>4</sub> .1H <sub>2</sub> O	1,58 mg/l
Ext. levadura (Britania)	1 g/l
Biotina	0,02 mg/l
Pantotenato de calcio	0,4 mg/l
Ácido fólico	0,002 mg/l
Inositol	2 mg/l
Ácido nicotínico	0,4 mg/l
Ácido <i>p</i> -aminobenzoico	0,20 mg/l
Piridoxina	0,4 mg/l
Tiamina	0,4 mg/l
Rivoflavina	0,2 mg/l

- Etapa de inducción: una vez finalizada la glucosa y encontrándose el cultivo en fase estacionaria, se inducirá PAL mediante el agregado estéril de las siguientes soluciones:

a) Inductor de PAL: 0,5 g/l L-Phe,

b) Inductor y estabilizador de PAL: 0,5 g/l L-Phe + 5 g/l L-Ile

c) Inductor y estabilizador de PAL más el agregado de una FCE extra: 0,5 g/l L-Phe + 5 g/l L-Ile + 3 g/l sorbitol.

Se monitorearon las cinéticas de los cultivos registrando: X (DO<sub>660</sub>, peso seco), pH y actividad específica PAL (mU/mg).

### 3.3.4. Efecto de la FC y la FN en la actividad PAL

Como se mencionó anteriormente, si bien L-Phe es la FCE y FN más apropiada para la inducción y producción de PAL, la productividad del cultivo es muy baja. Una de las estrategias posibles para sobrellevar este inconveniente fue la utilización de medios complejos [52, 110], los cuales fueron optimizados para la producción de PAL y a su vez tienen una elevada productividad de biomasa. Sin embargo, para obtener estos resultados, el medio debe utilizar peptonas y extracto de levadura en grandes concentraciones, lo cual no resulta económico para la producción de la enzima a gran escala. Debido a ello, se empleará un medio mínimo semi-sintético (Tabla 3.7) para ensayar diferentes FCE y FN, a fin de encontrar una alternativa que maximice la productividad en biomasa, sin detrimento de la actividad PAL.

En principio, para la screening de FCE (Tabla 3.8), se deja fija la FN y se ensayan diferentes FCE sintéticas y alternativas como melaza de soja. Todas ellas se adicionan en la misma proporción de carbono (0,165 Cmol/l). Como FN se empleó  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  en una concentración final de 1,5 g/l, suficiente para evitar limitación por nitrógeno. También se le adicionó al medio 0,5 g/l de L-Phe como inductor y 5 g/l L-Ile como estabilizador de PAL [52].

Tabla 3.8. FCE testeadas para la producción de PAL.

<i>FCE</i>	<i>g/Cmol</i>
Glucosa	30
Fructosa	30
Galactosa	30
Sacarosa	30
Xilosa	30
Maltosa	28,5
Celobiosa	28,5
Rafinosa	28
Melaza	-
Sorbitol	30,3
Glicerol	30,7
Etanol	23

Las cinéticas de los cultivos se llevaron a cabo por duplicado de cada FCE, en erlenmeyer de 1000 ml, con una relación Vol. medio/Vol. erlenmeyer del 10%, para evitar limitaciones por transferencia de oxígeno. Se inocularon con células frescas a razón de  $1,5 \cdot 10^7$  UFC/ml, se incubaron en un shaker rotatorio a 30°C y 180 rpm y se tomó muestra cada aproximadamente 3 h. A cada muestra se le determinó: pH, Biomasa ( $DO_{660}$  y peso seco) y actividad específica (mU/mg).

Para el estudio del efecto de las FN se procedió de igual manera que con las FCE. En este caso la FCE empleada fue sorbitol la cual se fijó en una concentración de 6 g/l. Para el screening se utilizaron FN orgánicas (Glicina, Urea Glutamato de sodio y Peptona ácida de caseína (Britania)) e inorgánicas (Sulfato de amonio y Nitrato de sodio) a razón de 0,015 eq.N/l.

### 3.3.5. Optimización de los componentes del medio de cultivo

#### 3.3.5.1. Diseño factorial fraccionado

En principio se llevó a cabo el estudio de los componentes del medio de cultivo, empleando el diseño de Plackett-Burman. Los factores a analizar junto con sus respectivos niveles, se detallan en la Tabla 3.9.

Tabla 3.9. Factores y niveles a analizar en el diseño de Plackett-Burman.

<i>Factor</i>	<i>Unidad</i>	<i>Niveles</i>		
		<i>0 (basal)</i>	-	+
pH	-	6	5	7
K <sup>+</sup>	g/l	0,145	0	0,29
Mg <sup>+2</sup>	g/l	0,075	0	0,15
Ca <sup>+2</sup>	g/l	0,07	0	0,14
Cu <sup>+2</sup>	mg/l	3,9	0	7,8
Fe <sup>+3</sup>	mg/l	2,4	0	4,8
Zn <sup>+2</sup>	mg/l	1,5	0	3
Mn <sup>+2</sup>	mg/l	1,58	0	3,16
Peptona	g/l	1,5	0	3
L-Ile	g/l	1	0	2
EL	g/l	1	0	2

Para llevar a cabo el diseño se empleó el medio de cultivo descrito en Tabla 3.7, empleando como FCE 5 g/l de sorbitol, 5 g/l de L-Phe y 1 g/l de L-Ile y peptona como FN.

En cuanto a los niveles de pH, se determinaron las concentraciones de buffer fosfato-citrato, necesarias para lograr que el cultivo se mantenga en los niveles escogidos para este factor.

Finalmente, para 11 factores, la matriz de Plackett-Burman se construyó de la siguiente manera (Tabla 3.10):

Tabla 3.10. Matriz de Plackett-Burman para k=11 y N=12.

<i>Exp</i>	<i>pH</i>	<i>K</i>	<i>Mg</i>	<i>Ca</i>	<i>Cu</i>	<i>Fe</i>	<i>Zn</i>	<i>Mn</i>	<i>Pept</i>	<i>Ile</i>	<i>EL</i>
1	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+
2	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-
3	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+
4	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+
5	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+
6	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
7	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
8	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-
9	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+
10	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-
11	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13(C)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14(C)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15(C)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16(C)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Los cultivos sumergidos se llevaron a cabo en erlenmeyer de 100 ml, con una relación Vol. medio/Vol. erlenmeyer del 10%, para evitar limitaciones por oxígeno. Se empleó como inóculo células frescas a razón de  $1,5 \cdot 10^7$  UFC/ml. Los cultivos se incubaron en un shaker rotatorio a 30 °C y 180 rpm y se detuvieron a las 17 h-18 h de iniciado el cultivo. A cada muestra se le midió pH en el sobrenadante, X (DO<sub>660</sub> y peso seco) y actividad específica (mU/mg).

### 3.3.5.2. Diseño factorial completo

A partir de los resultados derivados del análisis del diseño de Plackett-Burman, se llevó a cabo un diseño factorial completo, para evaluar los factores que resultaron estadísticamente significativos y las interacciones entre ellos. La matriz que se usó para el diseño del experimento se muestra a continuación (Tabla 3.11):

Tabla 3.11. Matriz para factorial completo  $2^k$ .

<i>Exp.</i>	<i>Mg</i>	<i>Mn</i>	<i>EL</i>	<i>Mg-Mn</i>	<i>Mg-EL</i>	<i>Mn-EL</i>	<i>Mg-Mn-EL</i>
1	-	-	-	+	+	+	-
2	+	-	-	-	-	+	+
3	-	+	-	-	+	-	+
4	+	+	-	+	-	-	-
5	-	-	+	+	-	-	+
6	+	-	+	-	+	-	-
7	-	+	+	-	-	+	-
8	+	+	+	+	+	+	+
9 (C)	0	0	0	0	0	0	0
10 (C)	0	0	0	0	0	0	0
11 (C)	0	0	0	0	0	0	0
12 (C)	0	0	0	0	0	0	0

Los niveles empleados son los correspondientes a la Tabla 3.9, a excepción de que sólo se varían aquellos factores que resultan significativos, el resto de los factores se mantiene a nivel basal.

Al igual que en el análisis anterior, los cultivos se llevaron a cabo en erlenmeyer de 100 ml, con una relación Vol. medio/Vol. erlenmeyer del 10%, para evitar limitaciones por oxígeno. Se empleó como inóculo células frescas a razón de  $1,5 \cdot 10^7$  UFC/ml. Los cultivos se incubaron en un shaker rotatorio a 30 °C y 180 rpm y se detuvieron a las 17-18 h de iniciado el cultivo. A cada muestra se le midió pH en el sobrenadante, X ( $DO_{660}$  y peso seco) y actividad específica (mU/mg).

Del análisis de estos datos, se determinó el factor y/o interacción estadísticamente significativa.

### 3.3.5.3. Optimización por diseño de Doehlert

El factor resultante significativo a partir del análisis factorial completo, fue evaluado en el tiempo empleando un diseño hexagonal de Doehlert. El objetivo de este análisis fue determinar, por un lado, las concentraciones óptimas de dicho factor respecto a la actividad específica de PAL y por otro lado observar si el factor tiene efecto estabilizador de PAL en el tiempo. Los valores codificados y reales se muestran en la Tabla 3.12.

Tabla 3.12. Diseño hexagonal de Doehlert para  $[Mg^{+2}]$  vs. tiempo de cultivo.

Exp.	Valores codificados		Valores reales	
	X	Y	Mg <sup>+2</sup> (mM)	Tpo. (h)
1	1	0	3	17
2	0,5	0,866	2,25	20
3	-0,5	0,866	0,75	20
4	-1	0	0	17
5	-0,5	-0,866	0,75	14
6	0,5	-0,866	2,25	14
7	0	0	1,5	17
8	0	0	1,5	17
9	0	0	1,5	17
10	0	0	1,5	17

Para el cultivo se utilizó el medio basal descrito en la Tabla 3.7, para lo cual se mantuvieron todas las concentraciones en su nivel basal a excepción del factor analizado. El estudio se llevó a cabo en cultivo sumergido en erlenmeyer de 100 ml, con una relación Vol. medio/Vol. erlenmeyer del 10%. Se inocularon a razón de  $1,5 \cdot 10^7$  UFC/ml y se incubaron a 30°C en un shaker rotatorio a 180 rpm. A los diferentes tiempos señalados se tomaron muestras y se determinó a cada una: X ( $DO_{660}$  y peso seco), actividad volumétrica (mU/ml) y actividad específica (mu/ml).

Finalmente, se validó el modelo variando por un lado las concentraciones de  $Mg^{+2}$  una a la vez (Tabla 3.13) para 17 h de cultivo y por otro siguiendo la cinética del cultivo para una concentración fija de  $Mg^{+2}$  de 1,5 mM.

Tabla 3.13. Estudio del efecto del  $Mg^{+2}$  en la actividad PAL.

<i>Muestra</i>	<i>Mg<sup>+2</sup> (mM)</i>
1b	0,3
2b	0,6
4b	1,2
6b	1,8
8b	2,4
10b	3

Los cultivos se llevaron a cabo por triplicado en erlenmeyer de 250 ml conteniendo 25 ml de medio. Se inocularon a razón de  $1,5 \cdot 10^7$  UFC/ml y se incubaron a 30°C en un shaker rotatorio a 180 rpm. A las muestras se le determina: X ( $DO_{660}$  y peso seco), actividad volumétrica (mU/ml) y actividad específica (mu/ml).

#### 3.3.5.4. Optimización global alcanzada

Una vez obtenido el medio óptimo semi-sintético se procede a compararlo con el medio complejo óptimo reportado por Yamada *et al.* [52], el cual se describe en la Tabla 3.14.

Tabla 3.14. Medio complejo óptimo reportado por Yamada *et al* [52].

<i>Componente</i>	<i>Concentración (g/l)</i>
EL	10
Peptona	10
NaCl	5
L-Phe	0,5
L-Ile	5
pH = 6	

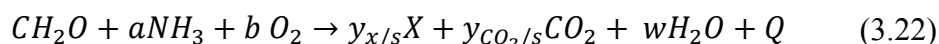
Para ello se preparan ambos medios de cultivo por triplicado, en erlenmeyer de 1000 ml con 100 ml de medio. Ambos se inocularon a razón de  $1,5 \cdot 10^7$  UFC/ml y se incubaron a 30°C en un shaker rotatorio a 180 rpm. Se toman 3 muestras a las 17 h, a las 22 h y a las 40 h y se determina a cada una: X ( $DO_{660}$  y peso seco), actividad volumétrica (mU/ml) y actividad específica (mU/ml).

## 3.4. Resultados y Discusión

### 3.4.1. Estudio de inducción de PAL

Como ya se detalló anteriormente, se llevó a cabo la inducción de PAL en cultivo sumergido en dos etapas: una etapa de crecimiento en glucosa como FCE y sulfato de amonio como FN y una etapa de inducción una vez agotada la glucosa. En esta última etapa se emplearon en uno de los casos únicamente L-Phe (P), en otro caso se agregó L-Phe e L-Ile (P+I) para comprobar el efecto de este último en la estabilización de la actividad PAL y finalmente, L-Phe + L-Ile + sorbitol (P+I+S) con el fin de determinar si se requiere una fuente energética extra para la síntesis de PAL.

Durante la primera etapa de crecimiento, los tres sistemas se comportan de igual forma llegando a fase estacionaria luego de las 16 h de cultivo, momento en el cual se agota la glucosa, como puede verse en la Figura 3.6. En lo que respecta a la producción de biomasa se alcanzó un elevado rendimiento global (Ecuación 3.21) con una curva de crecimiento exponencial estándar para la cepa.



$$y_{x/s} = \frac{\Delta X}{-\Delta S} = \frac{X_f - X_0}{-S_f + S_0} \quad (3.23)$$

$$y_{x/s} = \frac{0,115 \text{ Cmol } X}{0,212 \text{ Cmol } S} = 0,54 \text{ Cmol } X / \text{Cmol } S \quad (3.24)$$

Una vez llevada a cabo la inducción, a las 25 h de iniciado el cultivo, se observa que la cepa continúa creciendo en los sistemas P+I y P+I+S, primero lentamente y luego a partir de las 35 h comienzan a crecer rápidamente. En ambos casos puede verse que tanto la isoleucina como el sorbitol son empleados como FCE. En el caso particular del P+S+I se observa que el crecimiento es mayor aun cuando la tendencia es igual al sistema P+I. Por el contrario, en el sistema P, la biomasa crece muy poco al principio, pero mientras los dos otros sistemas comienzan a producir biomasa extra, en este sistema el crecimiento se estaciona rápidamente en un valor constante. Si comparamos la fase temprana de inducción (25 - 35 h), podemos ver que el crecimiento tanto en el sistema P como en P+I, es muy similar. Esto nos indicaría que en presencia de L-Ile y L-Phe la cepa prioriza la asimilación de la L-Phe en primer lugar. Si esto es así, el mayor crecimiento en la fase temprana de inducción en el sistema P+I+S se debería al agregado de

sorbitol. En todos los casos hay que desestimar el pulso negativo entre la fase de crecimiento e inducción, ya que se debe a la dilución del medio por el agregado de las soluciones (Figura 3.6).

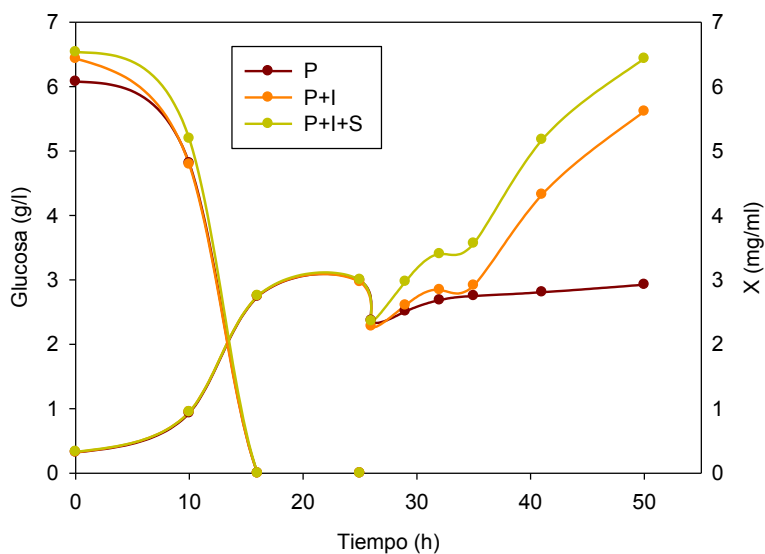


Figura 3.6. Curva de crecimiento durante inducción de PAL.

P: 0,5g/l L-Phe, P+I: 0,5g/l L-Phe+5 g/l L-Ile, P+I+S: 0,5g/l L-Phe+5 g/l L-Ile+3 g/l sorbitol.

Con relación a la evolución del pH, se observa una disminución durante la fase de crecimiento (Figura 3.7).

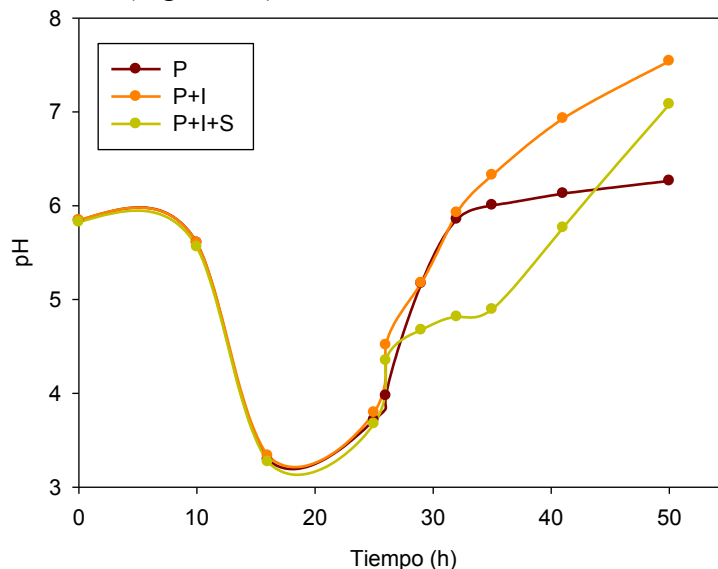


Figura 3.7. Evolución de pH durante inducción de PAL.

P: 0,5g/l L-Phe, P+I: 0,5g/l L-Phe+5 g/l L-Ile, P+I+S: 0,5g/l L-Phe+5 g/l L-Ile+3 g/l sorbitol.

Esta disminución es típica de la asimilación de glucosa, ya que la metabolización de la misma da lugar a un descenso brusco del pH en el medio de cultivo. En la fase de inducción, sin embargo, los valores de pH para los tres

sistemas aumentaron aunque de diferente manera. En el caso de P el valor de pH se estancó en valores cercanos a 6, mientras que en los sistema P+I y P+I+S el pH se elevó hasta valores superiores a 7 (Figura 3.7). Esta evolución del pH a valores alcalinos puede deberse a la asimilación de aminoácidos, la cual produce el aumento de pH en el medio. Nuevamente en la fase temprana de inducción los sistemas P y P+I presentan el mismo patrón, confirmando la deducción anterior. En el sistema P+I+S se observa que el aumento de pH se enlentece durante la fase temprana (probablemente por la presencia de sorbitol), para luego aumentar rápidamente. En los tres casos, el pH no alcanzó valores que pudieran inhibir el crecimiento de la cepa.

Por otro lado, en lo que respecta a la actividad específica de PAL durante la fase de inducción, se observa un pico de actividad a las 3 h del comienzo de la inducción en el sistema P. Sin embargo en este sistema la actividad decae rápidamente, estabilizándose a niveles muy bajos (Figura 3.8). Este comportamiento de decaimiento de la actividad durante la inducción de PAL *in vivo* empleando L-Phe como única FCE ya se había observado previamente [52, 56] aun cuando la estrategia de inducción en estos casos fue diferente.

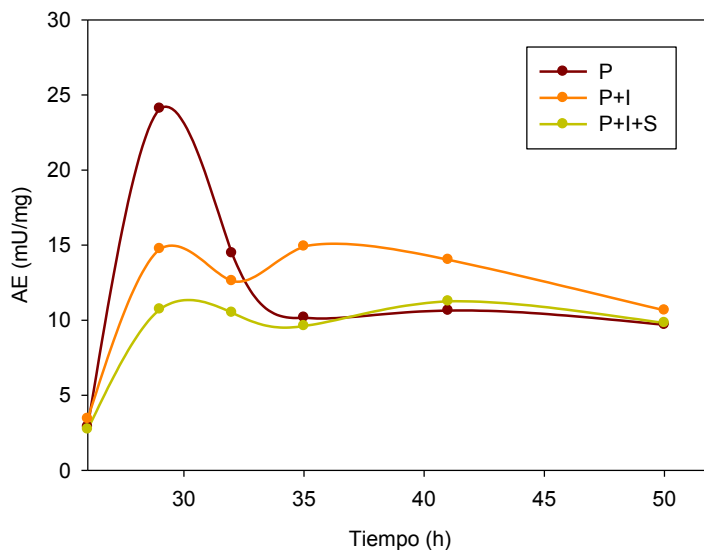


Figura 3.8. Inducción de PAL en cultivo batch.

P: 0,5g/l L-Phe, P+I: 0,5g/l L-Phe+5 g/l L-Ile, P+I+S: 0,5g/l L-Phe+5 g/l L-Ile+3 g/l sorbitol.

La adición de L-Ile si bien parece haber logrado estabilizar los niveles de actividad hasta cierto punto, inhibió la aparición del pico de actividad observado en el sistema P (Figura 3.8). Esto probablemente se deba a las altas concentraciones utilizadas [52] que hicieron la L-Ile se utilice para el crecimiento

en detrimento de la síntesis enzimática. También se observa un decaimiento de la actividad, seguido por lo que intenta ser un nuevo pico de actividad. La inducción de PAL por parte de la L-Ile en ausencia de L-Phe fue reportado por Nakamichi *et al.* [56]. Finalmente, respecto al sistema P+I+S, no se observan diferencias considerables respecto al comportamiento de P+I, lo que indicaría de que el sorbitol se está empleando de igual manera para incrementar el crecimiento, a expensas de la actividad PAL.

En conclusión, la inducción en un cultivo batch en fase estacionaria no logró proporcionar una alternativa para la producción de PAL, ya que se obtuvieron valores de actividad muy bajos comparado con cultivos en los que la inducción se llevó a cabo al inicio del mismo. La estrategia de inducción empleando únicamente L-Phe logró los mejores resultados; sin embargo, la actividad decae rápidamente. Respecto al agregado de L-Ile, no pudieron observarse los efectos de estabilización previamente reportados [52, 56]. Finalmente, la adición de una fuente de energía adicional como fue el sorbitol, no agregó un efecto positivo a la inducción debido a que, en su presencia, la cepa priorizó el crecimiento a la síntesis de PAL.

### **3.4.2. Efecto de la FCE y FN en la actividad PAL**

#### **3.4.2.1. Efecto de diversas FCE en la actividad PAL**

Debido a que las estrategias de inducción de PAL, basadas en la utilización de L-Phe como única FCE y FN tienen muy baja productividad, se ensayará el uso de diversas FCE y se evaluará de cada una, la productividad global de biomasa alcanzada, y la actividad específica de PAL obtenida. En cuanto a la productividad, es un parámetro muy importante desde el punto de vista industrial ya que disminuye los tiempos entre cada batch. Para evaluar este concepto se llevó a cabo la cinética de crecimiento y se calculó la velocidad específica de producción de biomasa ( $\mu$ ) y el tiempo de duplicación celular ( $T_d$ ) (Ver anexo 4). Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 3.15.

Observando la Tabla 3.15 y comparando con el blanco sin FCE adicional, podemos ver que todas las FCE empleadas pudieron ser empleadas como FCE por la cepa, observación que coincide con los datos reportados para *R. toruloides* [63]. Respecto a la productividad de biomasa, podemos ver que la mayor productividad

fue alcanzada por los azúcares simples (glucosa, fructosa y sacarosa), seguida por la rafinosa y la melaza de soja. La melaza de soja es un residuo obtenido a partir de la concentración de proteínas de soja. Se estima que tiene un 70% de azúcares, entre otros rafinosa, estaquiosa y sacarosa. Por su elevada productividad resulta una fuente muy prometedora para el crecimiento de la cepa, ya que se trata de un residuo agroindustrial. En productividad le siguen los alcoholes y polioles, siendo el sorbitol el que más rindió de todos ellos. En lo que respecta a la maltosa y a la celobiosa, ambas tienen una productividad similar, y levemente más baja que los alcoholes y polioles. Finalmente, si comparamos la xilosa y la galactosa con el blanco sin FCE adicional, la productividad fue muy baja tendiendo a nula en el caso de la galactosa. En el blanco utilizando L-Phe y L-Ile como FCE, la productividad fue muy baja comparados con aquellos medios donde se adicionó una FCE adicional. Esto ya fue observado previamente en algunos trabajos donde comparaban la productividad de L-Phe con fructosa, en un medio de cultivo mínimo de diferente composición [110].

Tabla 3.15. Influencia de diversas FCE en la productividad de biomasa.

<i>FCE</i>	$\mu$ ( $h^{-1}$ )	$T_d$ (h)	$R^2$
Glucosa	0,201	3,4	0,967
Sacarosa	0,202	3,4	0,971
Fructosa	0,185	3,8	0,991
Rafinosa	0,157	4,4	0,986
Melaza	0,148	4,7	0,973
Sorbitol	0,130	5,3	0,994
Glicerol	0,121	5,7	0,989
Etanol	0,115	6,0	0,994
Maltosa	0,113	6,1	0,985
Celobiosa	0,105	6,6	0,983
Xilosa	0,082	8,5	0,994
Galactosa	0,076	9,1	0,997
Blanco	0,074	9,36	0,960

Respecto a la evolución del pH durante el cultivo, se registra un leve aumento del pH en la mayoría de las FCE, el cual fue amortiguado por el buffer

citrato-fostato adicionado al medio. En el caso de la glucosa, la sacarosa y la fructosa se evidencia un descenso abrupto del pH en la primera fase del cultivo para luego comenzar a aumentar llegando a la fase estacionaria. Este comportamiento indica que dicho descenso está ligado al crecimiento más específicamente al metabolismo celular. En estos tres últimos casos, la adición del buffer al inicio del cultivo no logró amortiguar el descenso previamente observado en la Figura 3.9.

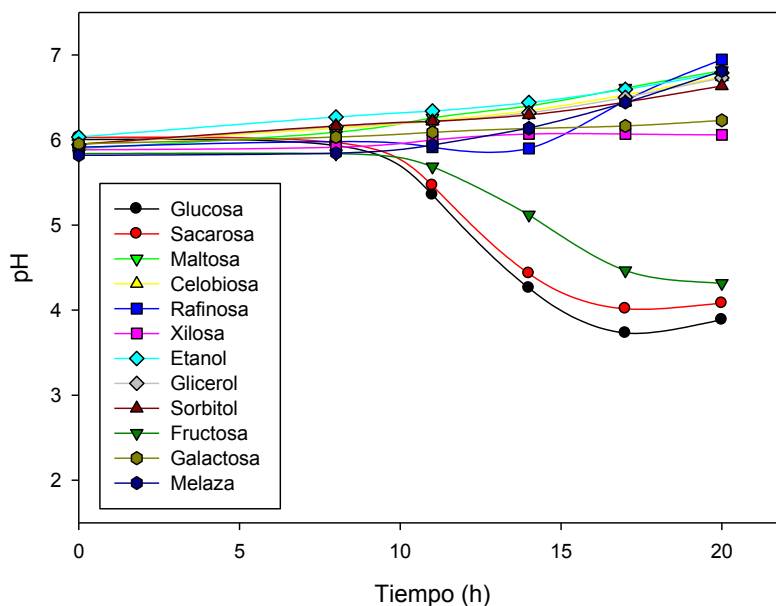


Figura 3.9. Evolución del pH durante el cultivo empleando diferentes FCE.

Respecto a la actividad PAL, resulta indispensable incrementar la actividad específica a modo de obtener una elevada producción por unidad celular. Sin embargo, como se mencionó anteriormente es indispensable a la hora de optimizar un bioproceso poder obtener una elevada actividad volumétrica la cual surge a partir del producto de la actividad específica por la biomasa producida. A la hora de escoger la mejor FCE para nuestro sistema de cultivo, se tuvieron en cuenta ambos parámetros. En la Tabla 3.16 se resumen los resultados correspondientes a los picos de actividad específica obtenidos a partir de las cinéticas de producción de PAL. En la mayoría de los casos dichos picos de actividad se evidenciaron entre las 17 y 20 h de iniciado el cultivo, a excepción de la maltosa, donde se observó el pico a las 12 h. En todos los cultivos dicho pico de actividad se manifiesta durante la fase exponencial tardía, donde  $\mu = \mu_{\max}$ , para luego declinar cuando el cultivo alcanza la fase de desaceleramiento previa la fase estacionaria. Este comportamiento fue observado también en medios complejos

[52, 110]. Por ende, no se observó en los cultivos realizados con el medio semi-sintético el efecto estabilizador de L-Ile, reportado por Yamada *et al.* [52].

Por otro lado, en lo que respecta a actividad específica, los mejores resultados se obtuvieron empleando un medio de cultivo sin FCE adicional (solamente L-Phe e L-Ile). De las FCE adicionadas al medio de cultivo basal, se obtuvieron elevadas actividades específicas empleando maltosa y celobiosa, seguidos por el etanol, sorbitol, melaza, glicerol, rafinosa y galactosa. Los azúcares simples de amplia aplicación en cultivos microbianos (sacarosa, fructosa y glucosa) dieron lugar a bajas actividades específica. Ya se mencionó anteriormente la presunta inhibición de la producción de PAL en medios conteniendo glucosa (Ver sección 2.2.5); sin embargo, la inhibición completa de la síntesis de PAL no se evidenció en estos cultivos. En el único caso que se evidenció una completa inhibición de la síntesis de PAL fue cuando se empleó xilosa como FCE en el medio de cultivo.

Tabla 3.16. Influencia de diversas FCE en la actividad PAL.

<i>FCE</i>	<i>AE esp. (mU/mg)</i>	<i>AE vol. (mU/ml)</i>	<i>t<sub>opt</sub> (h)</i>
Glucosa	26,5 ± 2,4	69,2 ± 6,2	~20
Sacarosa	29,0 ± 0,5	84,3 ± 1,4	~20
Fructosa	25,1 ± 1,6	69,5 ± 4,3	~20
Rafinosa	67,6 ± 3,9	106,4 ± 6,2	~17
Melaza	80,2 ± 0,31	146,4 ± 0,6	~20
Sorbitol	95,1 ± 1,1	121,9 ± 1,4	~20
Glicerol	75,0 ± 2,2	103,4 ± 3,0	~20
Etanol	98,7 ± 5,9	90,3 ± 5,4	~17
Maltosa	119,5 ± 6,1	56,7 ± 2,9	~12
Celobiosa	116,7 ± 5,6	101,7 ± 4,9	~17
Xilosa	9,5 ± 0,38	4,9 ± 0,2	~17
Galactosa	36,0 ± 1,08	28,3 ± 0,8	~20
Blanco	125,2 ± 0,55	88,9 ± 1,6	~17

Por otro lado, si tenemos en cuenta la actividad volumétrica durante el pico de actividad, como medida global de la síntesis de PAL, podemos ver que

aun cuando el medio sin FCE adicional arrojó los mejores resultados en lo que a actividad específica se refiere, la baja productividad de biomasa hace que la actividad volumétrica no sea demasiado elevada (Tabla 3.15). Sin embargo, existen FCE que pueden maximizar la actividad volumétrica aun cuando la actividad específica no es muy elevada debido a la creciente productividad en biomasa. Este es el caso específico de la melaza de soja y del sorbitol. Estos resultados resultan interesantes desde el punto de vista de que la melaza en un residuo industrial, lo que la transforma en una materia prima económica. Los inconvenientes de las melazas es la continuidad del suministro de las mismas y la estandarización de su composición. Debido a ello, para futuros ensayos se optó por emplear sorbitol como FCE.

En conclusión, se ha observado que la síntesis *in vivo* de PAL se manifiesta en ausencia de FCE adicionales que no se traten de L-Phe o L-Ile. En el caso en que la cepa utilizó L-Phe como única FCE se ha observado una elevada actividad específica en detrimento de la producción de biomasa. Para lograr aumentar la actividad volumétrica global se requirió el empleo de FCE alternativas con elevada productividad de biomasa y una actividad específica razonable, como fue el caso de la melaza de soja y el sorbitol.

#### **3.4.2.1. Efecto de diversas FN en la actividad PAL**

De igual modo que en el caso anterior se probaron algunas FN y se determinó su influencia en la productividad de biomasa y en la actividad PAL. Se analizaron tanto FN definidas de origen orgánico (Urea, Glutamato, Glicina) e inorgánico (sulfato de amonio y nitrato de amonio) y fuentes complejas de composición variable (peptona ácida de caseína). En primer lugar, en lo que refiere a productividad de biomasa, los resultados se resumen en la Tabla 3.17. Solamente en el caso de la peptona y el glutamato se logra una leve mejoría en la productividad. En general la incorporación directa de aminoácidos en el medio de cultivo, en especial aquellos que son esenciales para el crecimiento del microorganismo a cultivar, permite el ahorro de energía de la síntesis de los mismos, pudiendo crecer con mayor facilidad. Esto explicaría porque la mayor productividad se obtiene empleando un hidrolizado de proteínas, como es la peptona ácida de caseína. Sin embargo, este efecto no se observó empleando glicina como FN, la cual demostró el mismo comportamiento que las demás FN.

Tabla 3.17. Influencia de diversas FN en la productividad de biomasa.

<i>FN</i>	$\mu$ ( $h^{-1}$ )	$T_d$ (h)	$R^2$
Peptona ác. de caseína	0,134	5,2	0,982
Glutamato	0,129	5,4	0,980
Urea	0,110	6,3	0,997
Nitrato de sodio	0,109	6,4	0,998
Glicina	0,105	6,6	0,998
Sulfato de amonio	0,103	6,7	0,992

Respecto al pH no se observaron variaciones considerables empleando diversas FN, ya que el pH pudo ser amortiguado por el agregado del buffer.

Finalmente, en cuanto a la influencia de las FN en la actividad específica de PAL, no se observaron diferencias significativas entre ellas, a excepción del glutamato, cuya actividad específica fue menor que el resto (Tabla 3.18). Otra diferencia fue la ocurrencia del pico de actividad, ya que para el glutamato dicho pico se hizo presente a las 24 h mientras que para el resto fue a las 20 h. Por otro lado, cuando se compararon las actividades volumétricas entre las FN, se observó un incremento significativo cuando se empleó peptona como FN (Tabla 3.18). Este resultado era esperable ya que se trata de una FN compleja que administra al medio los aminoácidos necesarios para el crecimiento y la inducción de PAL. Estas particularidades hacen que la peptona ácida de caseína sea la FN escogida para futuros ensayos.

Tabla 3.18. Influencia de diversas FN en la actividad PAL.

<i>FN</i>	<i>AE esp.</i> (mU/mg)	<i>AE vol.</i> (mU/ml)	$t_{opt}$ (h)
Peptona ác. de caseína	70,0 ± 2,4	164,2 ± 5,7	~20
Glutamato	54,0 ± 0,9	131,9 ± 2,3	~24
Urea	77,5 ± 2,9	120,9 ± 4,6	~20
Nitrato de sodio	72,3 ± 3,4	111,3 ± 5,2	~20
Glicina	68,2 ± 3,3	97,3 ± 4,8	~20
Sulfato de amonio	75,1 ± 3,1	99,2 ± 4,0	~20

### 3.4.3. Optimización de los componentes del medio de cultivo

#### 3.4.3.1. Diseño factorial fraccionado

Para la determinación de la significancia de los componentes del medio de cultivo en la actividad PAL, se llevó a cabo un diseño factorial fraccionado de Plackett-Burman. Se evaluaron 11 componentes del medio de cultivo: pH, K<sup>+</sup>, Mg<sup>+2</sup>, Ca<sup>+2</sup>, Cu<sup>+2</sup>, Fe<sup>+3</sup>, Zn<sup>+2</sup>, Mn<sup>+2</sup>, Peptona, L-Ile y Extracto de levadura (EL). Los cultivos se realizaron en sistema batch en erlenmeyer a 30°C en un shaker rotatorio a 180 rpm, y las muestras fueron cosechadas a las 18 h de iniciado el cultivo. Los datos obtenidos a partir del mismo se resumen en la Tabla 3.19. Si comparamos los 12 experimentos con los controles, podemos ver que solamente los experimentos 3 y 7 lograron incrementar la producción de biomasa. Por su parte el pH se mantuvo relativamente en los valores establecidos por el diseño.

Tabla 3.19. Datos del cultivo del diseño de Plackett-Burman.

<i>Exp.</i>	<i>Biomasa (mg/ml)</i>	<i>pH</i>	<i>AE esp. (mU/mg)</i>
1	0,716 ± 0,025	7,13	11,1 ± 0,1
2	0,280 ± 0,003	7,07	1,3 ± 0,1
3	2,346 ± 0,029	5,27	39,6 ± 0,1
4	0,800 ± 0,032	7,05	54,4 ± 1,8
5	0,300 ± 0,001	7,06	7,0 ± 0,3
6	0,280 ± 0,002	7,06	6,9 ± 0,6
7	1,227 ± 0,030	5,12	31,8 ± 1,3
8	0,346 ± 0,001	4,97	4,6 ± 0,2
9	0,403 ± 0,003	5,06	2,4 ± 0,1
10	0,263 ± 0,001	7,01	0,6 ± 0,1
11	0,326 ± 0,001	5,11	0,5 ± 0,2
12	0,311 ± 0,003	5,01	3,0 ± 0,1
13(C)	0,853 ± 0,017	6,04	25,5 ± 0,2
14(C)	0,785 ± 0,015	6,07	25,0 ± 1,7
15(C)	0,734 ± 0,035	6,08	26,6 ± 1,1
16(C)	0,653 ± 0,007	6,08	21,3 ± 0,5

Finalmente en lo que respecta a los valores de actividad específica, solamente los experimentos 3, 4 y 7 superaron los valores de actividad específica de los controles.

A partir de los valores de actividad específica de PAL obtenidos (Tabla 3.19), se calcularon los efectos correspondientes a cada valor, mediante la Ecuación 3.10 (Ver sección 3.2.3.5). Como puede verse en la Tabla 3.20, hay factores con efecto positivo y otros con efecto negativo, sin embargo los únicos factores que resultaron tener un efecto significativo en la actividad específica de PAL, fueron el  $Mg^{+2}$  y el  $Mn^{+2}$  ( $\alpha=0,05$ ). En lo que respecta al  $Mg^{+2}$ , se ha reportado su papel en la estabilización *in vitro* de PAL durante la síntesis de L-fenilalanina metil éster [55]. Por otro lado, el  $Mn^{+2}$  se ha atribuido como el factor influyente en la estabilización de PAL durante el almacenamiento por presunta estabilización de una conformación más activa de la enzima [111]. Sin embargo el efecto de ambos cationes en la síntesis PAL, no ha sido reportado aun.

Tabla 3.20. Análisis de resultados del diseño de Plackett-Burman ( $R^2= 0,904$ ).

<i>Factor</i>	$E_x$	<i>SE</i>	<i>t</i>	<i>p</i>
pH	-0,09	5,618	-0,016	0,988
K <sup>+</sup>	1,88	5,618	0,335	0,754
Mg <sup>+2</sup>	22,27	5,618	3,964	0,017
Ca <sup>+2</sup>	6,62	5,618	1,179	0,304
Cu <sup>+2</sup>	-6,84	5,618	-1,217	0,290
Fe <sup>+3</sup>	4,99	5,618	0,889	0,424
Zn <sup>+2</sup>	-8,67	5,618	-1,543	0,198
Mn <sup>+2</sup>	-18,26	5,618	-3,251	0,031
Peptona	1,74	5,618	0,309	0,772
L-Ile	6,44	5,618	1,146	0,316
EL	11,10	5,618	1,976	0,119
Lack of fit				0,004

Aun cuando el lack of fit es significativo, se considera que el modelo es aceptable cuando el  $R^2$  es lo suficientemente elevado [112]. En este caso

particular un  $R^2$  de 0,904, es más que aceptable para procesos biológicos (Ver sección 3.2.3.6.).

En paralelo a este análisis se llevó a cabo el análisis de efectos por medio del algoritmo de Dong. Mediante éste se logró determinar aquellos efectos de factores posiblemente significativos ( $|E_i| > ME$ ) y aquellos efectos significativos ( $|E_i| > SME$ ). Los resultados del análisis por Algoritmo de Dong, se presentan en la Tabla 3.21.

Tabla 3.21. Algoritmo de Dong aplicado al diseño de Plackett-Burman.

<i>Parámetro</i>	<i>Valor</i>
ME	11,43
SME	18,06

Estos límites pueden representarse en un gráfico de probabilidad semi-normal (Figura 3.10) y observar aquellos efectos que se alejan de la tendencia de los datos y se encuentran fuera de los límites de la normalidad.

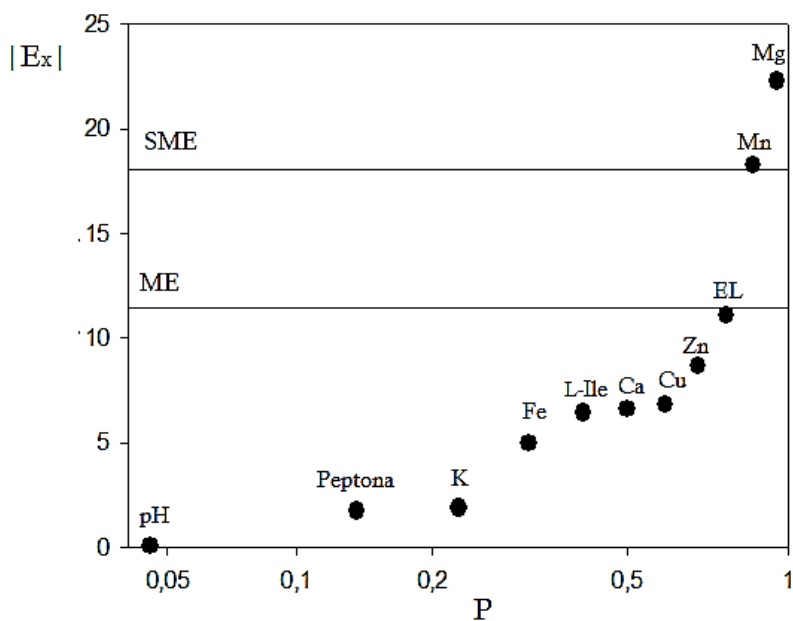


Figura 3.10. Gráfico de probabilidad semi-normal para diseño de Plackett-Burman.

En la Figura 3.10 podemos observar que de acuerdo al algoritmo de Dong los únicos efectos estadísticamente significativos fueron el  $Mg^{+2}$  y el  $Mn^{+2}$ , mientras que el extracto de levadura se encuentra muy cerca del límite del ME.

Debido a la cercanía del EL al margen ME, se puede considerar como un factor probablemente significativo y analizarlo como tal.

### 3.4.3.2. Diseño factorial completo

Los tres factores resultantes significativos o probablemente significativos en el análisis de Plackett-Burman ( $Mg^{+2}$ , el  $Mn^{+2}$  y EL) se evaluaron mediante un diseño factorial completo. Este diseño tuvo como objetivo verificar si los tres factores son realmente significativos y además evaluar si alguna interacción entre los factores analizados era significativa. Los datos obtenidos de los cultivos, se muestran en Tabla 3.22. Si comparamos los 8 experimentos podemos ver que hay una marcada diferencia en la producción de biomasa en los experimentos pares respecto a los impares e incluso mayor que los controles. Si observamos el diseño original (Tabla 3.11), se evidencia que estos experimentos corresponden a los que contienen un nivel superior de  $Mg^{+2}$ . Esto nos indica en principio que el  $Mg^{+2}$  influiría positivamente en el crecimiento de la cepa. Una tendencia similar se puede ver a simple vista comparando las actividades específicas de los distintos experimentos. En cuanto al pH, el mismo se mantuvo dentro del nivel basal esperado.

Tabla 3.22. Datos del cultivo del diseño factorial completo.

<i>Exp.</i>	<i>Biomasa (mg/ml)</i>	<i>pH</i>	<i>AE esp. (mU/mg)</i>
1	0,316 ± 0,002	6,07	3,5 ± 0,5
2	1,243 ± 0,003	6,16	48,7 ± 1,6
3	0,327 ± 0,001	5,95	16,2 ± 0,2
4	1,289 ± 0,029	6,09	42,9 ± 1,5
5	0,321 ± 0,001	5,99	7,7 ± 0,3
6	2,248 ± 0,017	6,17	35,7 ± 0,4
7	0,343 ± 0,001	6,06	12,3 ± 0,3
8	2,358 ± 0,035	6,18	37,0 ± 0,5
9 (C)	0,941 ± 0,008	6,14	23,4 ± 0,2
10 (C)	0,975 ± 0,032	6,12	20,4 ± 1,4
11 (C)	1,002 ± 0,008	6,2	19,8 ± 0,8
12 (C)	0,878 ± 0,005	6,18	20,8 ± 0,4

A partir de los valores de actividad específica de PAL obtenidos, se calcularon los efectos correspondientes a cada factor y las interacciones entre ellos (Tabla 3.23). A partir del análisis de los efectos se puede observar que el único factor estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) es el  $Mg^{+2}$ . El resto de los factores, incluyendo las interacciones entre ellos, no resultaron significativos.

Tabla 3.23. Análisis de resultados del diseño factorial completo ( $R^2 = 0,973$ ).

<i>Factor</i>	<i>E<sub>x</sub></i>	<i>SE</i>	<i>t</i>	<i>p</i>
$Mg^{+2}$	31,18	2,72	11,46	0,000
$Mn^{+2}$	3,20	2,72	1,18	0,305
EL	-4,69	2,72	-1,72	0,160
$Mg^{+2}$ - $Mn^{+2}$	-5,48	2,72	-2,01	0,115
$Mg^{+2}$ - EL	-4,79	2,72	-1,76	0,153
$Mn^{+2}$ -EL	-0,28	2,72	-0,10	0,922
$Mg^{+2}$ - $Mn^{+2}$ -EL	3,79	2,72	1,39	0,236
Lack of fit				0,021

Si bien el lack of fit resultó ser nuevamente significativo, el modelo puede considerarse con un buen ajuste debido a que el  $R^2$  obtenido es bueno ( $R^2 = 0,973$ ).

Paralelamente se llevó a cabo el análisis de efectos por medio del algoritmo de Dong. Los resultados del análisis por Algoritmo de Dong, pueden visualizarse en la Tabla 3.24.

Tabla 3.24. Algoritmo de Dong aplicado al diseño factorial completo.

<i>Parámetro</i>	<i>Valor</i>
ME	9,97
SME	12,09

Para observar a simple vista la tendencia de efectos y los límites establecidos por el Algoritmo de Dong, se presentan los datos en un gráfico de probabilidad semi-normal (Figura 3.11). Se puede observar que los efectos siguen una tendencia lineal mientras que el  $Mg^{+2}$  se aleja de dicha tendencia muy por encima del SME.

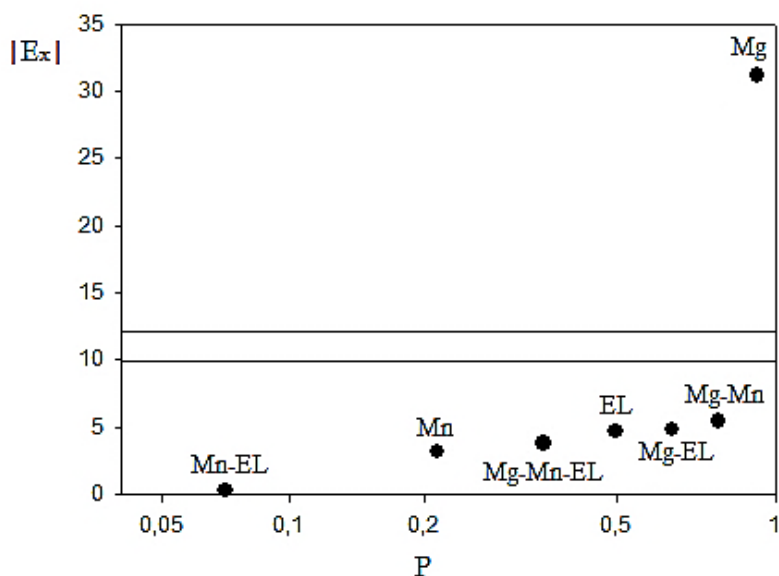


Figura 3.11. Gráfico de probabilidad semi-normal para diseño factorial completo.

En conclusión, a pesar que el  $Mn^{+2}$  resultó un factor significativo en el diseño factorial fraccionado, cuando se lo analizó con todas las combinaciones posibles dentro de un diseño factorial completo, dicha significancia no pudo probarse. Esto demuestra que si bien son útiles los diseños factoriales fraccionados a la hora de hacer el screening de una amplia variedad de factores, es necesario siempre completar el análisis con un factorial completo.

#### 3.4.3.3. Optimización por diseño de Doehlert

Una vez detectado el  $Mg^{+2}$  como el único componente del medio de cultivo que influye en la actividad PAL, se analizó este factor desde dos puntos de vista. Por un lado, como se mencionó anteriormente se presume que el  $Mg^{+2}$  cumple la función de estabilizar la actividad PAL en el tiempo durante la reacción inversa. Por otro lado, a partir de los cultivos realizados es posible que el  $Mg^{+2}$  cumpla un papel en la síntesis de PAL. Para investigar estas dos hipótesis se optimizará la concentración de este componente en el tiempo, mediante RSM empleando diseño hexagonal de Doehlert. Los resultados obtenidos a partir de dicho diseño, se muestran en Tabla 3.25.

Tabla 3.25. Resultados obtenidos a partir de RMS.

<i>Exp.</i>	<i>X (mg/ml)</i>	<i>PAL (mU/mg)</i>
1	1,672 ± 0,047	53,2 ± 0,8
2	2,282 ± 0,037	72,9 ± 1,5
3	2,073 ± 0,025	65,1 ± 1,7
4	0,254 ± 0,006	0,6 ± 0,0
5	1,033 ± 0,025	28,3 ± 0,5
6	1,244 ± 0,077	34,0 ± 0,6
7	1,655 ± 0,029	52,7 ± 3,3
8	1,636 ± 0,033	53,3 ± 1,9
9	1,666 ± 0,020	53,6 ± 1,2
10	1,650 ± 0,049	53,4 ± 2,1

A partir del análisis ANOVA para el RSM, se obtuvo que tanto la concentración de  $Mg^{+2}$  como el tiempo de cultivo son factores estadísticamente influyentes en la actividad PAL (Tabla 3.26).

Tabla 3.26. Significancia de los factores analizados por RMS ( $R^2=0,942$ ).

<i>Factor</i>	<i>p</i>
$Mg^{+2}$	0,010
Tiempo	0,007
Lack of fit	0,001

En principio estos resultados indicarían que si bien es posible que exista un efecto del  $Mg^{+2}$  sobre la síntesis de PAL, no habría en principio efecto estabilizador de la misma en el tiempo, ya que el tiempo resultó ser también significativo.

A partir de los coeficientes de regresión obtenidos del análisis de los resultados (Tabla 3.27), se puede armar el modelo cuadrático, de acuerdo a la ecuación 3.9. En este modelo  $i=1$  es  $Mg^{+2}$  e  $i=2$  es el tiempo.

Tabla 3.27. Coeficientes de regresión para RMS.

<i>Coficiente</i>	<i>Valor</i>
$\beta_0$	53,25
$\beta_1$	19,78
$\beta_2$	21,85
$\beta_{11}$	-26,35
$\beta_{22}$	4,55
$\beta_{12}$	1,21

El modelo cuadrático que representa la respuesta observada, se muestra a continuación:

$$PAL = 53 + 19,8Mg + 21,8t - 26,4Mg^2 + 4,55t^2 + 1,21Mgt \quad (3.25)$$

Esta respuesta expresada en función de sus factores se puede visualizar en un gráfico de contorno (Figura 3.12).

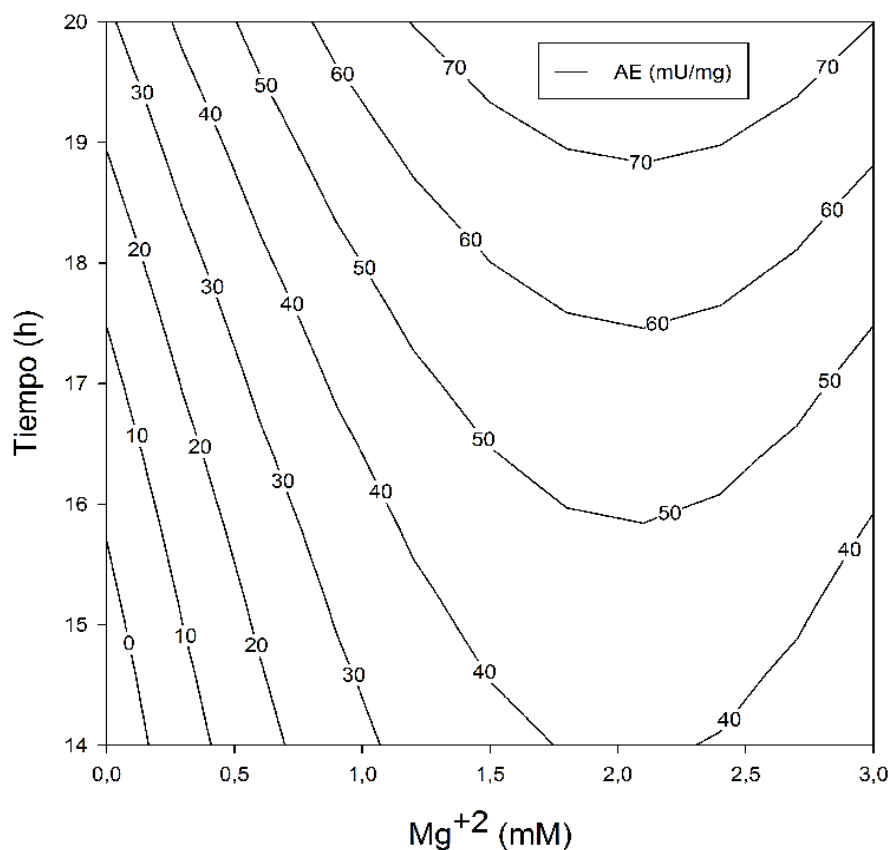


Figura 3.12. Gráfico de contorno de la influencia del Mg y t en la AE de PAL.

El modelo anterior se validó mediante ensayos que consideran un efecto a la vez. En principio se variaron las concentraciones de  $Mg^{+2}$  desde el nivel basal hasta 10 veces el nivel basal (0,3 mM a 3mM) para un tiempo de cultivo de 17 h. Como puede observarse en la Figura 3.13, el aumento de las concentraciones de  $Mg^{+2}$  incrementaron la actividad PAL hasta valores de aproximadamente 2 mM, para luego volverse asintótico. Esta tendencia también puede observarse en el gráfico de contorno si trazamos una línea imaginaria para un tiempo de 17 h. Al principio el aumento fue prácticamente lineal pero luego volverse curvilínea alrededor de actividades cercanas a 50 mU/mg (Figura 3.12).

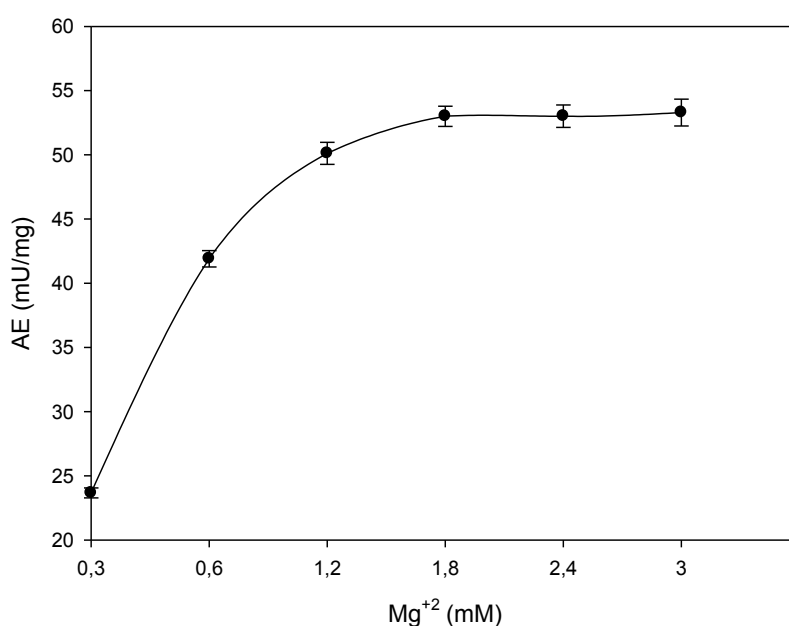


Figura 3.13. Efecto del  $Mg^{+2}$  en la biosíntesis de PAL.

Por otro lado, para una concentración fija de  $Mg^{+2}$  igual a 1,5 mM, se siguió la cinética del cultivo para verificar si realmente no hay un efecto estabilizador del  $Mg^{+2}$  en la actividad PAL. Como puede verse en la Figura 3.14, tal como predice el gráfico de contorno, si nos paramos en una línea imaginaria en una concentración de 1,5 mM, la actividad específica de PAL aumenta en el tiempo. Sin embargo, lo que no se pudo observar en el modelo es que luego de 30 h de cultivo la actividad decrece. Esto confirma la premisa anterior de que el  $Mg^{+2}$  no tiene efecto estabilizador de la actividad PAL en el tiempo, al menos durante la síntesis enzimática.

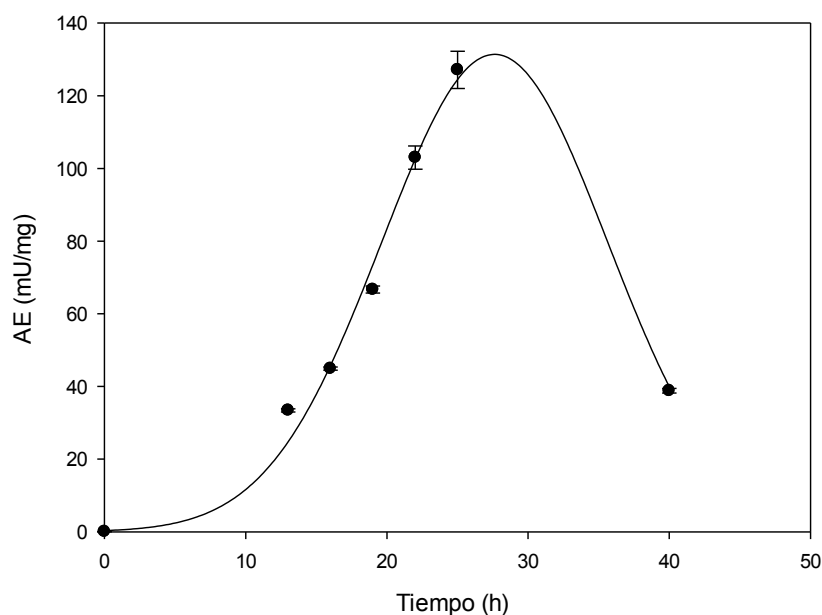


Figura 3.14. Efecto del  $Mg^{+2}$  en la estabilización de PAL.

En conclusión, a partir de la optimización de los componentes del medio de cultivo se pudo determinar que el único factor que realmente tiene un efecto estadísticamente significativo en la actividad PAL es el  $Mg^{+2}$ . Este efecto no ha sido observado previamente, debido que la mayoría de los estudios sobre PAL se basan en la mejora genética, y emplean medios complejos ya optimizados [52]. Otro factor significativo resultó ser el tiempo, ya que no se observó en ningún caso el efecto estabilizador del L-Ile, como ha sido reportado previamente por otros investigadores [52]. Por otro lado, el efecto estabilizador del  $Mg^{+2}$  observado durante la catálisis inversa de PAL *in vitro* [55] tampoco fue evidenciado durante la síntesis de PAL. Debido a ello, resulta indispensable el uso de técnicas de monitoreo y control para lograr cosechar las células en el pico de actividad específica.

#### 3.4.3.4. Optimización global alcanzada

Como ya se mencionó anteriormente uno de los medios más empleados en la producción de PAL es el medio complejo óptimo desarrollado por Yamada *et al.* [52], el cual se muestra en la Tabla 3.14. El objetivo de este estudio es contrastar nuestro medio optimizado (Medio C) con el medio desarrollado por Yamada (Medio Y). El medio C es el mismo medio de cultivo empleado en los

DOE, con los componentes en su concentración basal, a excepción del  $Mg^{+2}$ , el cual se adicionó en concentraciones 5 veces mayores al nivel basal (2 mM). Ambos cultivos se trataron de igual manera en lo que respecta a inoculación e incubación y se tomaron muestras a las 17, 22 y 40 h.

Los resultados obtenidos a partir de estos cultivos, se muestran a continuación:

Tabla 3.28. Contraste de medio óptimo con medio de referencia.

Medio	Parámetro	17 h	22 h	40 h
C	X (mg/ml)	1,466 ± 0,058	2,275 ± 0,093	5,588 ± 0,040
	% optimización	83	104	243
	PAL (mU/mg)	40,4 ± 1,0	49,7 ± 0,9	42,2 ± 0,4
	% optimización	158	137	150
	PAL (mU/ml)	59,2 ± 2,1	113,1 ± 5,7	235,7 ± 3,5
	% optimización	131	142	366
Y	X (mg/ml)	1,763 ± 0,020	2,196 ± 0,066	2,296 ± 0,045
	% optimización	100	100	100
	PAL (mU/mg)	25,6 ± 1,5	36,2 ± 1,2	28,0 ± 0,9
	% optimización	100	100	100
	PAL (mU/ml)	45,1 ± 2,9	79,5 ± 4,2	64,4 ± 2,8
	% optimización	100	100	100

Como puede apreciarse en la Tabla 3.28, el medio C logró superar en algunos aspectos al medio óptimo Y. En lo que respecta a la producción de biomasa puede observarse un mayor crecimiento del medio Y a las 17 h. Sin embargo luego de las 22 h alcanza la fase estacionaria. En contraste, el medio C creció a menor velocidad pero alcanzó un rendimiento de biomasa superior luego de las 40 h de cultivo (150%). En lo que respecta a la actividad específica de PAL, el medio Y presenta un valor mayor a las 22 h lo cual implica que no se evidenció la estabilización de dicha actividad debido al agregado de L-Ile [52]. De igual modo ocurrió con el medio C, el cual presenta un incremento a las 22 h. Si comparamos los valores de los tres tiempos analizados podemos ver que el medio

C presentó mayor actividad específica de PAL en los tres tiempos, con un mayor % de optimización a las 17 h (158%). Aun cuando la mayor diferencia se encuentra a las 17 h, es necesario evaluar la optimización en forma global, ya que como se hizo hincapié en este capítulo, no sólo la actividad específica alcanzada es importante, sino que también es indispensable tener una elevada productividad de biomasa. En este sentido el parámetro que indica la optimización de ambos parámetros es la actividad volumétrica. Comparando la actividad volumétrica de PAL entre ambos medios se puede concluir que a pesar de la menor productividad del medio C al inicio del cultivo, la actividad volumétrica fue mayor durante los tres tiempos analizados. A las 40 h de cultivo se logró la mayor diferencia (366%), esto se debe a que el cultivo C continuó creciendo mientras que el cultivo Y ya se encontraba en etapa de mantenimiento celular.

En conclusión el medio óptimo desarrollado es una alternativa interesante al medio de cultivo complejo previamente reportado por Yamada *et al.* ya que se logró obtener a partir de él elevadas concentraciones de biomasa en el tiempo, una mayor actividad específica de PAL y por ende, se logró incrementar considerablemente la actividad volumétrica de PAL.

# Capítulo 4

## Recuperación y caracterización del biocatalizador

---

### 4.1. Objetivos

Los objetivos del presente capítulo son:

- Describir las alternativas de recuperación de la enzima en forma de célula permeabilizada y purificada.
- Caracterizar el biocatalizador obtenido.

### 4.2. Fundamentos

#### 4.2.1. Diseño del bioproceso

El diseño racional de un bioproceso debe considerar la aplicación del mismo. Un bioproceso puede bien ser un servicio (biorremediación) o puede estar destinado a la producción de un producto de interés. En este último caso es fundamental focalizarnos en el producto final a obtener.

Para definir el tipo de producto que se desea producir existen dos aspectos esenciales a tener en cuenta: aspectos económicos y aspectos técnicos [21].

Los aspectos económicos están directamente relacionados al mercado, más específicamente a la oferta y demanda. En cuanto a estos parámetros, los productos biotecnológicos pueden enmarcarse en dos categorías fundamentales:

- Producto de alto valor: son aquellos que se producen a bajas escalas, requieren un elevado grado de pureza y por ende los costos del producto se incrementan. En general la oferta de este tipo de producto es baja.
- Producto de bajo valor: son aquellos que se producen a elevadas escalas, en general el grado de pureza dependerá de la aplicación y los costos del proceso deben ser bajos para que el producto sea económicamente

rentable. En general, la oferta de productos de este tipo es elevada pero dependerá exclusivamente de la aplicación.

El primer paso en el diseño de un bioproceso será entonces definir el tipo de producto que deseamos obtener. En el caso particular de los biocatalizadores, éstos generalmente son insumos industriales, con lo cual debe tenerse siempre presente el producto final, ya que el costo del insumo repercutirá en el costo de dicho producto.

Dicho esto, para que un producto sea rentable hay ciertos aspectos técnicos, relacionados con el proceso de producción de los biocatalizadores, que hay que resguardar. Algunos de ellos se enuncian a continuación [22]:

- El biocatalizador debe incrementar la productividad del proceso fermentativo (Ver capítulo 3).
- El biocatalizador debe poder producirse en un medio de cultivo económico (Ver capítulo 3).
- El biocatalizador debe poder almacenarse en forma adecuada sin pérdida considerable de su actividad.
- La producción del biocatalizador debe poder adaptarse a una escala mayor.
- El biocatalizador no debe ser perjudicial para la salud.

#### **4.2.2. Downstream del proceso**

El downstream del proceso, como ya se introdujo en el Capítulo 2 de la presente tesis, incluyen todas aquellas etapas del procesos posteriores a la fermentación tendientes a la recuperación y formulación del producto de interés biotecnológico, en nuestro caso el biocatalizador. Debido a que el downstream pueden incluir un gran número de operaciones unitarias, llega a representar alrededor del 60% de los costos de producción [14], los cuales se reflejarán en el precio final del producto. Debido a ello, la elección correcta de la secuencia y de las operaciones involucradas es fundamental cuando se diseña un producto de bajo costo, como ya se observó en la sección 4.2.1.

En lo que respecta a las operaciones que engloba el downstream del proceso, podemos englobarlas en tres pilares fundamentales:

- Recuperación del biocatalizador.
- Purificación del biocatalizador.

- Formulación del biocatalizador.

En las próximas secciones se describirá brevemente cada una de ellas.

Si bien las operaciones de recuperación, purificación y formulación son operaciones unitarias ampliamente utilizadas en la industria química, hay ciertas particularidades a tener en cuenta en lo que respecta a su aplicación en sistemas biológicos [14]:

- Muchos de los productos a recuperar son solubles en agua y se encuentran diluidos.
- Los productos son generalmente sensibles a aumentos de temperatura.
- Las propiedades físico-químicas de los productos a recuperar son parecidas a las de los contaminantes.
- Se requiere mantener la pureza del producto para que no resulte dañino para los seres vivos.

### **4.2.3. Recuperación del biocatalizador**

Las operaciones de recuperación tienen como objetivo aislar el biocatalizador del medio circundante. En el caso de biocatalizadores producidos a partir de microorganismos, el medio circundante es el medio de cultivo en el cual se encuentra inmerso el microorganismo productor y el biocatalizador. De acuerdo a la naturaleza del biocatalizador, dependerán las operaciones destinadas a su recuperación [14]:

- Enzimas extracelulares: se trata de aquellas enzimas que se producen y se excretan al exterior de la célula. En este caso, la enzima quedará diluida en el medio de cultivo con lo cual las operaciones de recuperación incluirán la separación de las células del medio de cultivo conteniendo la enzima (de ahora en más denominado extracto enzimático) y la concentración de dicho extracto. Debido a que el extracto enzimático contiene los componentes del medio de cultivo más las sustancias excretadas por las células, requerirá de técnicas de purificación adicionales.
- Enzimas intracelulares: son aquellas enzimas que quedan retenidas dentro de las células. En este caso, las operaciones de recuperación incluirán la separación de las células (conteniendo la enzima) del medio de cultivo. Una vez obtenido el pellet de biomasa puede optarse por liberar la enzima

de la célula por ruptura celular, obtener el extracto enzimático y proceder a la purificación de dicho extracto, o bien puede emplearse la célula como soporte de la enzima mediante técnicas de permeabilización selectiva de la membrana plasmática.

Las operaciones de recuperación utilizan las diferencias entre las propiedades físico-químicas de las sustancias a separar. El criterio de elección de estas operaciones debe priorizar aquellas que aprovechen al máximo estas diferencias y a la vez resulten económicas.

#### **4.2.3.1. Separación de las células del medio de cultivo**

Para la separación de biomasa del medio de cultivo se utilizan operaciones de separación del tipo sólido-líquido. La elección de las mismas dependerá, entre otras cosas, del tamaño de las partículas (células), la diferencia de densidad entre las células y el medio de cultivo, la forma de dichas partículas (esféricas, alargadas, filamentosas), etc. Si bien los microorganismos pueden decantar naturalmente, la velocidad de sedimentación natural es muy lenta debido al tamaño pequeño de estos y que la densidad de los microorganismos es muy similar a la del medio de cultivo que lo rodea. Para acelerar dicha separación las operaciones más empleadas son la filtración y la centrifugación.

La filtración es la operación por la cual las partículas en el seno de una solución son forzadas a atravesar un medio filtrante, en el cual son retenidas. Esta operación es mayoritariamente empleada en organismos multicelulares y en microorganismos filamentosos [8]. Los sistemas de filtración pueden diferir notablemente de acuerdo a la naturaleza de la membrana filtrante, el tamaño de partícula que retiene, la presión utilizada, la dirección del flujo y el principio de filtración empleado. A escala piloto e industrial los filtros más empleados por su eficacia y economía, son los de placa y marco y los tambores rotatorios.

En cuanto a la centrifugación es mayoritariamente aplicada para separar partícula de menor tamaño, como lo son las bacterias y las levaduras [8]. En estos equipos la separación se logra mediante fuerza centrífuga producida por el giro de del rotor a altas revoluciones. Las centrífugas pueden trabajar en forma continua o batch, y se adaptan a diferentes escalas, dependiendo del tipo de centrífuga. Las más empleadas a escala industrial son las tubulares y las de cámara y disco.

A escala de laboratorio generalmente se utilizan centrifugas con rotor intercambiable para bacterias y levaduras, y filtros con membranas filtrantes o telas para la recuperación de hongos filamentosos.

Una vez separadas ambas fases, y dependiendo la ubicación de la enzima, se continúa el proceso con la fase líquida (producto extracelular) o con la fase sólida (producto intracelular).

#### **4.2.3.2. Disrupción celular**

La disrupción o ruptura celular es utilizada cuando el producto de interés es intracelular y se requiere liberarlo al medio para su posterior purificación. Se trata de la disgregación de la membrana y/o pared celular con la consiguiente desestabilización de la misma y liberación del contenido intracelular. La disrupción de la célula usualmente requiere de métodos fuertes, en particular en microorganismos como las bacterias y levaduras debido a la estructura de la pared celular [8].

Los métodos de disrupción celular pueden clasificarse en [14]:

- **Métodos físicos:** En ellos se produce la disrupción por medio de fuerza mecánica de diferentes formas. Uno de los equipamientos más empleados para este fin es el molino de perlas. Se trata de un tambor giratorio con perlas que impactan unas con otras y con la suspensión celular, produciendo la ruptura por fuerzas de impacto y cizalla. Uno de los inconvenientes que tiene este tipo de equipo es la elevación de la temperatura, lo cual puede ser perjudicial para la enzima que se desea recuperar. Otro tipo de tecnología empleada son los homogeneizadores, los cuales son sistemas presurizados en los que se hace pasar la suspensión a través de una válvula para luego hacer que choque con un anillo de impacto. En este tipo de tecnología actúan fuerzas de impacto y fuerza de corte. Ambas tecnologías descritas pueden emplearse a escala de laboratorio o industrial. Finalmente, una de las metodologías aplicadas a escala laboratorio son los ultrasonificadores. Esta tecnología se basa en la generación de sonidos de alta frecuencia que resultan en zonas de diferencia de presión. Esto a su vez producen la cavitación de micro burbujas las cuales transmiten energía a las células haciéndolas colapsar.

- **Métodos químicos:** Los métodos químicos se basan en el tratamiento de las células con sustancias químicas concentradas muy abrasivas que disgregan la estructura de las envolturas celulares, liberando el contenido celular. Las sustancias empleadas pueden ser agentes surfactantes (detergentes), álcalis fuertes, solventes orgánicos, etc. En el caso de los surfactantes, estos actúan solubilizando los lípidos de la membrana. Los álcalis, entre otras cosas, saponifican los lípidos de la membrana desintegrándola. Los ácidos orgánicos también afectan la membrana disolviendo los lípidos y produciendo la lisis celular. Cuando se emplean métodos químicos para la disrupción debe tenerse sumo cuidado en el efecto adverso que puede producir en el biocatalizador.
- **Método enzimático:** El método enzimático es uno de los métodos menos extremos de disrupción de la membrana celular. Se trata de enzimas que digieren en forma específica la membrana, sin afectar el contenido celular. Algunos ejemplos son las lisozimas y glucanasas. El tratamiento enzimático es costoso y por ende es impensable su utilización a escala industrial [22].

#### **4.2.3.3. Permeabilización celular**

La permeabilización celular consiste en la alteración de la permeabilidad de la membrana sin afectar su integridad [113]. La disrupción tiene la desventaja de que, al liberar todo el contenido celular, dificulta la posterior purificación de la enzima por la presencia de muchos contaminantes. Para evitar que esto suceda se puede permeabilizar selectivamente la membrana sin desintegrarla completamente. Por un lado se puede modificar la permeabilidad de la membrana para dejar pasar el compuesto de interés. En este caso, además de liberarlo del interior de la célula, se simplificaría el proceso de purificación. Este método emplea los mismos compuestos que la ruptura celular pero los tratamientos son menos intensivos. Entre los agentes permeabilizantes más comúnmente empleados están algunos solventes orgánicos, agentes surfactantes, policiones y algunas enzimas específicas. También puede lograrse cierta permeabilización mediante métodos físicos leves, como podría ser el congelamiento o liofilización de las células sin el uso de crioprotectores.

Esta metodología se puede emplear también para modificar la permeabilidad de la membrana y permitir únicamente el pasaje de compuestos de bajo peso molecular a través de ella. Esto implica que la enzima de interés puede quedar retenida dentro de la célula y el sustrato y el producto de la reacción pueden entrar y salir de la misma libremente [114]. Este sistema permitiría que la célula actúe como soporte de la enzima, pudiendo recuperarlas fácilmente del medio de cultivo circundante mediante las técnicas anteriormente descritas (Ver sección 4.2.3.1). Además del fácil aislamiento las células permeabilizadas conteniendo la enzima (de aquí en más denominadas “células catalíticas”) presentan varias ventajas en comparación a la enzima pura. En principio, mediante la permeabilización se permite utilizar la enzima *in vivo* lo cual le brinda estabilidad a la misma, ya que al aislarla pierde la protección que tenía dentro de la célula. Por otro lado, es posible que los cofactores que requiere la enzima se pierdan durante las etapas de purificación, sin embargo dentro de la célula catalítica el cofactor puede ser regenerado [115]. Finalmente empleando la célula catalítica se puede reutilizar el biocatalizador por medio de centrifugación.

#### 4.2.3.4. Concentración del extracto enzimático

Una de las etapas previa a la purificación enzimática es la concentración del extracto crudo. Mediante esta etapa se elimina el contaminante más abundante: el agua. Además al reducir el volumen de material se facilitan las operaciones de purificación y a su vez, se reduce el costo de dichas operaciones [11]. Las técnicas de concentración dependerán fundamentalmente de las propiedades físico-químicas del producto a recuperar. A continuación se mencionan algunos de los métodos más utilizados a tal fin:

- Métodos térmicos: son métodos muy empleados pero deben controlarse muy bien con el fin de evitar la desnaturalización enzimática. Para evitar aumentar la temperatura excesivamente, la evaporación del agua se lleva a cabo bajo presión reducida. De acuerdo a la forma de operación de los evaporadores tenemos de capa fina y evaporadores tubulares.
- Precipitación: en condiciones normales, las enzimas interactúan con el solvente a través de grupos ionizables e hidrofóbicos. Si las condiciones en el medio se modifican, es posible que las enzimas se aglomeren y finalmente precipiten. Dicho precipitado puede retornar a las condiciones

iniciales mediante la disolución en un solvente, pudiendo ser disuelto en un volumen menor, es por ello que se considera un método de concentración. Existen varios agentes que pueden causar la precipitación. Las sales son unos de los agentes precipitantes más comunes. Elevadas concentraciones de sales actúan sobre las moléculas de agua que rodean la proteína cambiando las fuerzas electrostáticas responsable de la solubilidad proteica. Entre las sales más comúnmente empleadas está el sulfato de amonio. La precipitación con sales puede emplearse también como etapa de purificación si se logra separar por precipitación otras enzimas sin afectar la enzima de interés. Otros agentes precipitantes son los solventes orgánicos. Éstos reducen la constante dieléctrica del medio y con ello el efecto de solvatación de las moléculas que rodean la proteína, con la consiguiente aglomeración y precipitación de la enzima. Por otro lado, algunos polímeros como por ejemplo el polietilenglicol actúan de forma similar que los solventes orgánicos, modificando la esfera de solvatación que rodea la proteína. Finalmente, se puede precipitar una enzima en su punto isoeléctrico. La metodología de precipitación consiste en adicionar un ácido para disminuir el pH y producir la precipitación de proteínas, ya que muchas tienen un punto isoeléctrico en el rango ácido.

- Filtración por membrana: para la concentración de extractos crudos pueden emplearse filtración por membrana. Una de las tecnologías de membrana más empleadas a estos fines es la ultracentrifugación. Las membranas semipermeables de ultrafiltración permiten el pasaje de solvente y pequeños compuestos a través de ella, reteniendo las moléculas de alto peso molecular. Como en la ultrafiltración las sales permean con el solvente, es también un método de desalado.

#### **4.2.4. Purificación del biocatalizador**

Las operaciones de purificación tienen como objetivo remover todos aquellos contaminantes que se encuentran en el extracto crudo y que pueden interferir en su uso posterior. A su vez, a través de la purificación se logra incrementar la actividad específica de la enzima la cual se define como la cantidad

de unidades enzimáticas por min por mg de proteína total. Obtener una elevada actividad específica es un requisito previo a la inmovilización del biocatalizador.

La composición del extracto crudo dependerá si la enzima es extracelular o intracelular [8]. En el primer caso el extracto contendrá un pool de enzimas extracelulares y pequeños solutos de bajo poder molecular, ya que la membrana celular es una poderosa barrera que retiene todo el contenido celular. Sin embargo, en el caso de extracto de enzimas intracelulares que debieron pasar por un proceso de disrupción celular, éste contiene además de lo antedicho, todos los componentes intracelulares, entre ellos, una mezcla compleja de proteínas y ácidos nucleicos. En este último caso unas de las primeras etapas de purificación debe separar los ácidos nucleicos de la muestra, lo cual puede lograrse mediante precipitación con algunos agentes o bien empleando nucleasas. El sulfato de amonio puede emplearse con este fin pero no es específico, ya que también precipita proteínas.

Los componentes de bajo peso molecular, principalmente las sales, pueden ser removidas previamente ya sea mediante diálisis o cromatografía de exclusión molecular. Esta etapa se conoce como desalado.

Una vez eliminados los componentes no proteicos, el extracto crudo consiste principalmente en una mezcla de proteínas. A estas alturas la purificación del extracto estará dirigida a operaciones de fraccionamiento de las diferentes proteínas [8]. Cada una de estas etapas incrementará la pureza del compuesto, expresado como el grado de purificación (Ecuación 4.1), pero a su vez se perderá parte de la enzima en cada etapa, parámetro conocido como el rendimiento de purificación (Ecuación 4.2). Idealmente, el grado de purificación final debe ser elevado al igual que el rendimiento. Esto dependerá en gran medida de la cantidad de etapas de purificación, ya que aun si se obtiene un rendimiento por etapa elevado, si el proceso tiene muchas etapas, el rendimiento final será bajo.

$$\text{Grado de purificación} = \frac{AE_i}{AE_{TOTAL}} \quad (4.1)$$

$$\text{Rendimiento} = \frac{UE_i}{UE_{TOTAL}} \quad (4.2)$$

Desde el punto de vista industrial, las operaciones de purificación en general son costosas y el precio del producto muchas veces no puede compensar los costos de obtención de enzimas puras. Es por ello, que aun cuando el grado de

purificación es importante, es esencial obtener un buen rendimiento final en detrimento de la purificación [8].

Las operaciones empleadas para la purificación de un extracto enzimático que contiene mayoritariamente proteínas, consistirá en una serie de etapas que utilizan las diferencias entre las propiedades físicas (tamaño molecular, solubilidad y distribución de carga en la superficie) así como también propiedades biológicas (especificidad a un determinado ligando) para separar las diversas proteínas.

#### **4.2.4.1. Cromatografía**

La cromatografía es una de las técnicas de purificación más empleadas debido a su eficacia. La configuración más común para este propósito es en columna. Esta técnica consiste en el pasaje de una mezcla de sustancias (en este caso proteínas) disueltas en una fase móvil a través de una fase estática, la cual generalmente es una matriz sólida. Durante dicho pasaje los solutos interactúan de manera diferente con la matriz, produciendo un retardo en la elución de acuerdo a sus propiedades.

Existen muchas técnicas cromatográficas para la purificación de proteínas, las más relevantes se resumen a continuación [22]:

- Cromatografía de exclusión molecular o filtración en gel: este tipo de cromatografía separa las moléculas por su peso molecular. Así, las moléculas de alto peso molecular, las cuales no son retenidas en los poros de la matriz pasan rápidamente por la columna, mientras que las más pequeñas quedan retenidas y son eluidas de mayor a menor peso molecular. Las matrices son muy variadas siendo las más comúnmente empleadas poliacrilamida, dextrano, polimetacrilato, geles de agarosa, etc.
- Cromatografía de intercambio iónico: esta técnica separa las proteínas de acuerdo a su carga neta a un determinado pH. La matriz empleada tiene una carga neta un dado pH, por lo cual las moléculas con carga opuesta interactúan con el soporte y quedan retenidas en la columna. Hay matrices de carga negativa (intercambiadores catiónicos) y matrices de carga positiva (intercambiadores aniónicos). Las proteínas son eluidas mediante el incremento de la fuerza iónica (aumentando la concentración de sales) o bien mediante gradiente de pH.

- Cromatografía por interacción hidrofóbica: este tipo de cromatografía separa las proteínas de acuerdo a su hidrofobicidad. La mezcla de proteínas se inyecta en la columna y las proteínas comienzan a interaccionar con los ligandos hidrofóbicos de la matriz. Las proteínas absorbidas se eluyen empleando un gradiente decreciente de concentración salina, variando el pH o disminuyendo la polaridad del buffer empleando etilenglicol.
- Cromatografía de afinidad: Es una de las técnicas más eficientes de purificación. En ésta, las proteínas interaccionan con un ligando, unido a la matriz, con el cual tienen afinidad. Los ligandos pueden ser, en el caso de enzimas, el sustrato, un sustrato análogo, un cofactor, un inhibidor, un anticuerpo, etc. El ligando debe unirse fuertemente a la enzima retardándola pero a su vez dicha unión debe ser reversible. Idealmente este tipo de cromatografía permite que se pueda purificar la enzima en un único paso.

#### **4.2.4.2. Cristalización**

La cristalización es una forma de purificación muy antigua la cual se está empleando en la actualidad, debido a la búsqueda de alternativas factibles de aplicar a escala industrial y a su vez económicas [11]. Algunas enzimas que se lograron cristalizar para uso comercial son las celulasas, la glucosa isomerasa y la alcohol oxidasa [11].

La cristalización trata de la formación de partículas sólidas de la enzima de tamaño y forma definida. Para que una enzima cristalice se tienen que dar las condiciones adecuadas para que se encuentre sobresaturada en el solvente.

Existen muchos factores que influyen en la cristalización incluyendo el tipo de sal y su concentración, el pH, la temperatura, la agitación, el núcleo de cristalización, etc. Mediante el control de los niveles de saturación se puede optimizar el tamaño del cristal obtenido. Adicionalmente algunas enzimas se pueden hacer crecer en diferentes morfologías modificando las condiciones de cristalización [11].

#### **4.2.4.3. Control de las etapas de purificación**

Para determinar la pureza de la solución obtenida luego de cada etapa de purificación no basta únicamente con hacer un seguimiento de la actividad específica, sino que debe llevarse a cabo técnicas que confirmen la pureza alcanzada. Una de las técnicas más empleadas para estos fines es la electroforesis.

La electroforesis se basa en la separación de proteínas por migración diferencial dentro de un campo magnético. Aquellas proteínas con carga eléctrica neta positiva migran hacia el ánodo y las proteínas con carga neta negativa migran hacia el cátodo. La migración alcanzada desde el punto de siembra es proporcional a la carga neta.

Algunas de las técnicas electroforéticas más empleadas son la electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE), geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), isoelectroenfoque (IEF), electroforesis bidimensional, etc.

#### **4.2.5. Formulación del biocatalizador**

La formulación del producto consiste en una serie de operaciones diversas tendientes a la estabilización, estandarización y presentación del producto de acuerdo a su aplicación.

Las enzimas en general se presentan para su comercialización de dos maneras: sólidas o líquidas.

Para la presentación de enzimas en forma sólida, las mismas se mezclan con estabilizantes y se someten a operaciones de secado. Las técnicas de secado más comunes son el secado spray y la liofilización. La primera técnica se emplea a escala industrial ya que es un método económico y la segunda es más comúnmente empleada a bajas escalas [9]. Las enzimas presentadas en forma sólida tienen el beneficio de conservar la vida útil del producto por más tiempo debido a la disminución de  $a_w$ . Bajas  $a_w$  reducen la velocidad de ocurrencia de la mayoría de las reacciones de deterioro, incluyendo el deterioro microbiano. Adicionalmente pueden ser almacenadas a temperatura ambiente con el concomitante ahorro de energía de refrigeración y a su vez son más fácilmente transportables, debido a la reducción de volumen. En contraposición, la

presentación de enzimas en forma sólida puede producir polvo y afectar a los trabajadores, los cuales pueden sufrir de alergias debido a ello [8].

Por otro lado, la presentación de enzimas en forma líquida incluye la concentración, la adición de estabilizantes y la posterior filtración. Los estabilizantes más empleados son la glucosa, sacarosa y algunos polioles. Estas sustancias confieren estabilización en cuanto al mantenimiento de la estructura nativa de la proteína y de este modo evitan la desnaturalización. Además previenen la formación de agregados, manteniendo a la enzima soluble. Seguidamente el producto se filtra para eliminar sólidos insolubles y reducir la carga microbiana [9]. Las ventajas de utilizar enzimas líquidas están dadas por la facilidad de manejo y dosificación y existe además un ahorro energético al no tener que utilizar operaciones como el secado. Sin embargo tiene la desventaja de ser más vulnerable a desestabilización y contaminación microbiana, con lo cual generalmente debe ser almacenada en condiciones de refrigeración.

En definitiva, la aplicación del biocatalizador determinará si es más factible su utilización en forma sólida o líquida. Por ejemplo, para la industria de detergentes para la ropa en general deben suministrarse en forma sólida, mientras que para la industria de jarabes de alta fructosa se prefiere la enzima líquida.

Finalmente, parte de la formulación del producto es su estandarización. Es muy común en los procesos biológicos las variaciones entre batch y batch, y desde el punto de vista de la comercialización se requiere que el producto tenga características estables en el tiempo. Una forma de disminuir las fluctuaciones del proceso es mediante la incorporación de sistemas de monitoreo y control del mismo. Aun así la estandarización del producto es necesaria para lograr obtener las especificaciones del producto y una calidad constante. Dichas especificaciones deben suministrar la siguiente información: Actividad específica, estabilidad en el almacenamiento, solubilidad, contenido de agua, etc.

### 4.3. Metodología

#### 4.3.1. Diseño del proceso

Ya se ha explicado al inicio de este capítulo que un diseño racional del proceso de obtención de biocatalizadores debe considerar la aplicación que tendrán los mismos y fundamentalmente si la rentabilidad del producto final puede solventar los gastos de dicho proceso.

En nuestro caso estamos produciendo un biocatalizador para la reducción de L-Phe en hidrolizados proteicos. Dichos hidrolizados serían una alternativa para las actuales fórmulas de aminoácidos. Si bien hoy en día estas fórmulas se venden como productos farmacéuticos, con los costos concomitantes, nuestra propuesta tiende a la obtención de un producto más económico que no perjudique la economía familiar del paciente. En vista de ello, la tecnología aplicada a la obtención del biocatalizador como insumo para esta industria, debe ser lo más económica posible. Por lo tanto, se diseñará un proceso económico para la obtención del biocatalizador que consiste en la producción de células catalíticas con elevada actividad PAL y se contrastará con un método alternativo basado en la purificación de la enzima mediante métodos convencionales. Dicho proceso se resume en la Figura 4.1.

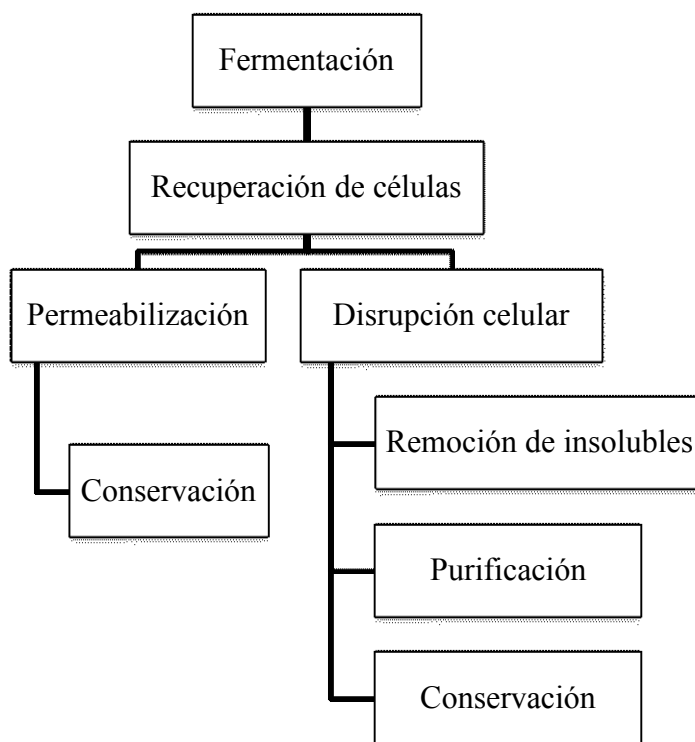


Figura 4.1. Alternativas de obtención del PAL.

### 4.3.2. Obtención y caracterización de células catalíticas

#### 4.3.2.1. Obtención de células catalíticas

Las células catalíticas se obtuvieron a partir de cultivos de *R. toruloides* NBRC 0559 en medio óptimo para la producción de PAL (Tabla 3.14). La fermentación se llevó a cabo en cultivo sumergido en erlenmeyer de 3 litros conteniendo 600 ml de medio de cultivo (Figura 4.2). Se inoculó con células frescas (no más de una semana) a razón de  $1,5 \cdot 10^7$  UFC/ml. Los erlenmeyers se incubaron en shaker rotatorio a 200 rpm y 30°C.



Figura 4.2. Cultivo sumergido de *R. toruloides*.

Las células se cosecharon en su pico de actividad y se recuperaron por centrifugación a 4000 rpm por 5 min a 5°C. El pellet se resuspendió en solución fisiológica y se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones antes descritas con la finalidad de eliminar los componentes del medio de cultivo. Este último paso se repitió dos veces más. Una vez obtenido el pellet se mantuvo en condiciones de refrigeración a -20°C.

#### 4.3.2.2. Permeabilización y conservación de células catalíticas

Como ya se mencionó anteriormente, PAL es una enzima intracelular ubicada en el citoplasma de la célula. Para poder emplear la célula como soporte de la enzima se la debe permeabilizar de tal forma que permita el pasaje de L-Phe al interior de la célula y la salida de *t*-CA al exterior de la misma. Ogata *et al.* [31]

han demostrado la eficacia del bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) y cloruro de cloruro de cetilpiridinio (CPC) en la permeabilización de la membrana plasmática. Si bien estos compuestos están aprobados por la FDA [116], no es recomendable su uso en alimentos que van a ser ingeridos, ya que pueden causar reacciones adversas como vómitos y náuseas. Como alternativa se estudió la liofilización como medio de permeabilización celular. A su vez este método permite conservar las células por un largo período de tiempo a temperatura ambiente, con lo cual se lograría una doble ventaja a partir de su aplicación.

Para determinar si es factible la permeabilización celular por medio de liofilización, la suspensión celular sin crioprotector se congeló a  $-80^{\circ}\text{C}$  y luego se liofilizó. Una vez liofilizada, se preparó una suspensión celular de 100 mg/ml final en buffer Tris-HCl (0,1 M,  $\text{pH}=8,5$ ) con 5 mM de 2NaEDTA. El ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) tiene como objetivo actuar como conservante microbiano y además es inhibidor de metaloproteasas.

Se ensayaron dos condiciones, por un lado se evaluó una suspensión celular de 5 mg/ml tratada únicamente con liofilización y por el otro se agregó CPC en una concentración final de 0,05 mg/ml de mezcla de reacción. Se emplearon dos blancos de reacción, uno es el blanco sin L-Phe y otro es el blanco sin células, en todos los casos las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado. Los tratamientos se incubaron con 1 mM de L-Phe en Tris-Buffer (0,1 mM,  $\text{pH}=8,5$ , 5 mM 2NaEDTA) a  $35^{\circ}\text{C}$  y se tomaron muestras a las 2 y 4 h. La reacción se detuvo por desnaturalización térmica a  $80^{\circ}\text{C}$  por 10 min, se centrifugó a 11500 rpm por 10 y se determinó en el sobrenadante el *t*-CA producido espectrofotométricamente a 290 nm. Para corroborar que la absorbancia medida se trata del *t*-CA se llevó a cabo una corrida espectrofotométrica entre 250 a 320 nm de longitud de onda y se comparó con un espectrograma de la droga patrón de *t*-CA.

#### 4.3.2.3. Caracterización de las células catalíticas

Las células catalíticas libres fueron caracterizadas para determinar la aptitud de las mismas en la reducción de L-Phe.

En principio se caracterizaron en término de concentración celular (2,5, 5,0, 7,5 y 10 mg de células secas/ml) en solución de 1 mM de L-Phe en buffer Tris-HCl (0,1 M,  $\text{pH}=8,5$ , 5 mM EDTA), a  $35^{\circ}\text{C}$  por 4 h. Finalizada la reacción,

la misma fue detenida mediante tratamiento térmico a 80°C por 10 min. Seguidamente la muestra fue centrifugada a 11500 rpm por 10 min para eliminar el precipitado. La cantidad de *t*-CA formado se determinó espectrofotométricamente mediante la DO<sub>290</sub> conociendo el  $\epsilon$  para nuestras condiciones de reacción. Un procedimiento similar se utilizó para medir la cinética de reacción para diferentes concentraciones de L-Phe (1, 5 y 10 mM). Se empleó para ello 5 mg de células secas y se llevó a volumen con buffer Tris-HCl (0,1 M, pH=8,5, 5 mM EDTA). La incubación y el análisis de las muestras se llevaron a cabo de la misma manera descripta anteriormente. Debido a que la reacción es mol a mol, mediante la cinética de aparición de *t*-CA se puede determinar la cinética de reducción de L-Phe en las muestras.

Por otro lado se evaluó el efecto de la temperatura en la actividad PAL de las células catalíticas. La temperatura influye de dos maneras en la enzima: por un lado afecta su estabilidad y por el otro su reactividad. En cuanto a la estabilidad, las enzimas pueden ser afectadas por elevadas temperaturas debido a su naturaleza proteica, pudiendo ocasionar la desnaturalización y con ello la alteración de su estructura nativa y funcionalidad. Por otro lado, en lo que respecta a su reactividad, como en toda reacción química, la velocidad a la que ocurre se ve incrementada por la temperatura, con lo cual el aumento de la temperatura puede incrementar la actividad enzimática hasta cierto punto. El comportamiento global será el que se alcance a partir de ambos efectos: el incremento de actividad y la inactivación proteica.

En vista de lo antedicho, se determinó primeramente la termoestabilidad de la enzima dentro de la célula catalítica. Éste es un parámetro importante ya que nos brinda información acerca de las temperaturas a las cuales la enzima se inactiva en cortos períodos de tiempo. A su vez es una propiedad muy utilizada a la hora de purificar una enzima ya que si es termoestable a elevadas temperaturas se puede emplear esta propiedad para precipitar enzimas con menor termoestabilidad. La termoestabilidad de la enzima se determinó mediante tratamientos de una suspensión celular de 10 mg/ml en Tris buffer (0.1 M, pH=8,5, 1 mM EDTA), a diferentes temperaturas (20 a 70 °C) para un tiempo definido de 10 min. Durante el tratamiento térmico, la mezcla de reacción fue agitada ocasionalmente para asegurar la correcta transferencia de calor. Una vez finalizado el proceso, se enfrían rápidamente las muestras en un baño de hielo, se

agrega L-Phe en una concentración final de 1 mM y se incuba a 35°C por 2 h con agitación constante (80 rpm) en una shaker termos atizado (Figura 4.3). Transcurrido dicho tiempo las muestras se inactivan completamente en un baño termostático a 80°C por 10 min, se centrifuga a 11500 rpm por 10 min y se determina la concentración de *t*-CA mediante medida de DO<sub>290</sub>.



Figura 4.3. Incubación de las muestras a temperatura variable.

Por otro lado, se evaluó el efecto global de la temperatura en la actividad PAL a fin de determinar el punto de trabajo óptimo. Para ello se incubaron suspensiones celulares de 10 mg/ml en Tris-HCl (0,1 M, pH=8,5, 5 mM EDTA) con 1 mM de L-Phe a diferentes temperaturas (20 a 70 °C) por el término de 2 h. Finalizado dicho tiempo se llevó a cabo el mismo procedimiento descrito anteriormente y se determinó actividad.

Finalmente, se determinó la estabilidad de las células catalíticas durante el almacenamiento en condiciones de refrigeración. Este es un requisito fundamental para su aplicación, ya que una misma suspensión celular debe ser utilizada en reiteradas oportunidades. Para evaluar la capacidad de retener su actividad por varios días se determinó la actividad PAL durante los días sucesivos de almacenamiento a 5°C. Para ello se incubó la suspensión celular con una concentración de 5 mg/ml en Tris-HCl (0,1 M, pH=8,5, 5 mM EDTA) con 1 mM de L-Phe a 35°C por 2 h. Finalizado dicho tiempo se detuvo la reacción, se centrifugó y se determinó la concentración de *t*-CA en el sobrenadante, de la misma forma descripta anteriormente. Este procedimiento se repitió durante los 5 días subsiguientes a la preparación del biocatalizador.

### 4.3.3. Obtención y caracterización de PAL purificada

#### 4.3.3.1. Protocolo de purificación de PAL

Para contrastar la eficiencia de las células catalíticas conteniendo PAL, se utilizó enzima purificada y parcialmente purificada provista como gentileza del Prof. Osao Adachi. La razón de preparar una enzima totalmente pura y una enzima parcialmente purificada radica en los costos de las operaciones de purificación. Se ensayará la aplicación de ambas alternativas para determinar si se puede emplear un extracto parcialmente purificado o se requiere la purificación total de la enzima.

La enzima parcialmente purificada fue obtenida a partir del siguiente protocolo resumido en la Figura 4.4.

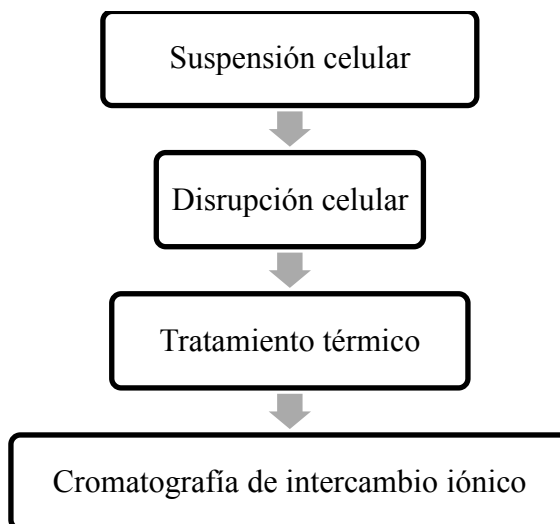


Figura 4.4. Protocolo de obtención de la enzima parcialmente purificada.

Una vez recuperadas las células del medio de cultivo se resuspendieron en un pequeño volumen de buffer Tris-HCl (10 mM, pH=8) y se congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  en un baño de etanol al 60%. Una vez congeladas se llevó a cabo la ruptura celular con una prensa X, mediante tres pasajes sucesivos entre los cuales la muestra se congelaba. Seguidamente se eliminaron los restos insolubles mediante centrifugación a 10000 rpm por 20 min. El sobrenadante se fraccionó luego en tubos de vidrio de pared fina y se calentaron a  $50^{\circ}\text{C}$  por 5 min con agitación constante, luego de lo cual se sumergieron los tubos en un baño de hielo. Esta etapa tiene como finalidad desnaturalizar algunas proteínas de baja estabilidad térmica y con ello eliminar gran cantidad de proteínas contaminantes [41]. El

precipitado se eliminó nuevamente por centrifugación a 10000 rpm por 20 min. Seguidamente se llevó a cabo una cromatografía de intercambio iónico empleando una columna de intercambio aniónico (DEAE-toyopearl, 30 × 3 cm) la cual se equilibró con buffer NPB 0,5 M, pH=7. El extracto enzimático se inyectó en la columna y se comenzó la elución con concentraciones crecientes de KCl. La elución de PAL se logró a concentraciones cercanas a 30 mM de KCl. La PAL parcialmente purificada, obtenida de esta manera se liofilizó y se mantuvo en condiciones de refrigeración, como medida adicional de conservación.

Por otro lado, el protocolo completo de purificación diseñado por el Prof. Adachi [41] se presenta en la Figura 4.5.

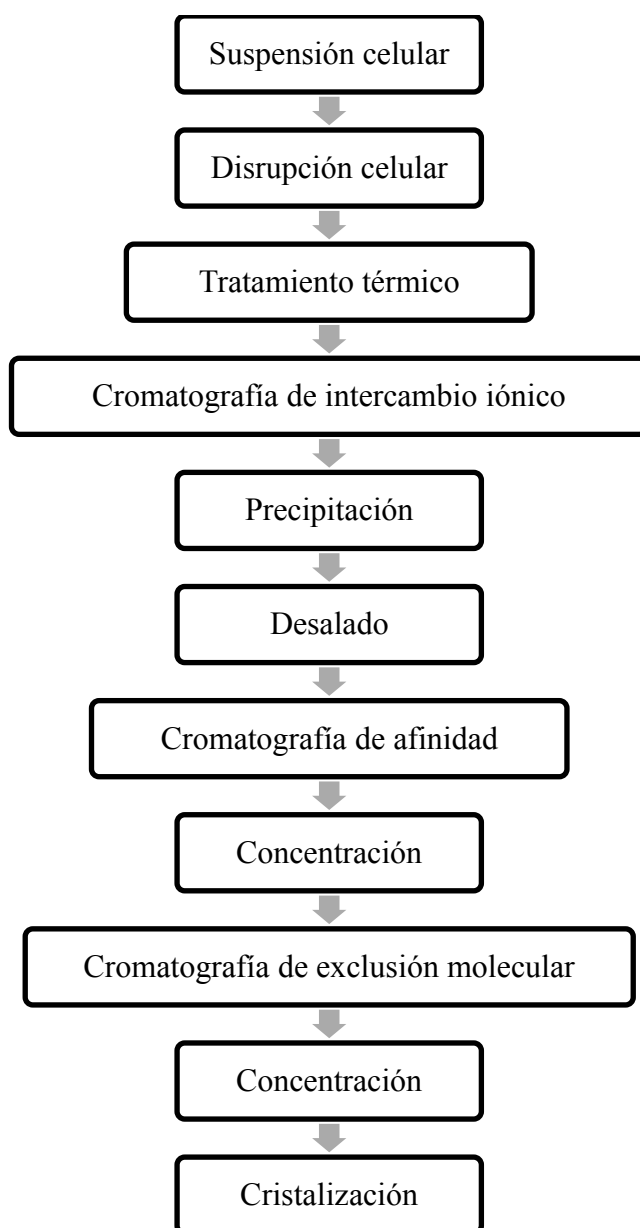


Figura 4.5. Protocolo de obtención de la enzima purificada.

El protocolo de purificación se va a explicar brevemente (para mayores detalles ver bibliografía correspondiente [41]). Dicho protocolo consiste en la disrupción celular mediante dos pasos por una prensa french con eliminación de restos celulares mediante centrifugación a 10000 g por 30 min. Luego se prosigue con el tratamiento térmico a 50°C por 5 min, de la misma forma descrita anteriormente. Seguidamente se emplea una cromatografía de intercambio iónico DEAE- celulosa la cual se equilibra con buffer Tris-HCl (10 mM, pH= 8, 10 mM L-Phe). Seguidamente se inyecta la muestra y se eluye la enzima de interés mientras se incrementa la concentración de KCl. Las fracciones conteniendo PAL se eluyen a 0,2 M KCl. Las fracciones obtenidas se concentran por precipitación empleando sulfato de amonio a 70% de saturación y luego se disuelven en buffer KPB (5 mM, pH=7,5, 10 mM L-Phe). Seguidamente la muestra se dializa toda la noche en condiciones de refrigeración para desalar. La solución dializada se inyecta en una columna de hidroxapatita y se eluye con 50 mM de buffer KPB (pH=7,5, 10 mM L-Phe). Luego se concentra nuevamente con sulfato de amonio al 80% y se dializa. A continuación la solución enzimática se inyecta en una columna Sephadex G-200 y se eluye con buffer KPB (50 mM, pH=7,5, 10 mM L-Phe). Las fracciones son nuevamente sometidas diálisis. Finalmente la enzima se cristaliza en finos cristales con forma de aguja por el agregado muy lento de sulfato de amonio sólido, hasta detectar una leve turbidez y se mantiene en refrigeración hasta su completa precipitación. La enzima obtenida a partir de este protocolo se liofiliza y se mantiene en condiciones de refrigeración hasta su uso.

#### **4.3.3.2. Caracterización de PAL purificada**

La enzima liofilizada se reconstituyó en buffer Tris HCl (20 mM, pH=8,5, 5 mM EDTA) hasta una concentración final de 128 mg/ml.

En principio se determina la actividad volumétrica de la enzima parcialmente purificada y de la enzima purificada. La actividad volumétrica en la enzima, como ya se mencionó anteriormente (Ver capítulo 3) se determina por la velocidad inicial de producción de *t*-CA. Para ello se sigue la cinética de PAL espectrofotométricamente a 290 nm y se toma la pendiente de la zona lineal previa a la saturación del sistema (Figura 2.4).

Seguidamente PAL purificada se caracterizó en términos de concentración de biocatalizador. Para ello se determinó la influencia de la concentración de PAL

en la velocidad inicial de reacción. A una solución 2,5 mM de L-Phe en buffer Tris-HCl (0,1 M, pH=8,5) se agregó PAL en concentraciones crecientes (~2 a 25 mU/ml). La reacción se llevó a cabo en una cubeta y siguió la cinética espectrofotométricamente a 290 nm durante 10 min.

Por otro lado PAL se caracterizó cinéticamente, para verificar si puede ajustarse a un modelo de cinética del tipo Michaelis-Menten (Ver capítulo 2). Para ello se emplearon concentraciones crecientes de L-Phe (0 a 5 mM) en buffer Tris-HCl (0,1 M, pH=8,5) y se le adicionó PAL en una concentración de 10,3 mU/ml en la mezcla de reacción. Se determinó la velocidad inicial de reacción mediante la pendiente de la recta de formación de *t*-CA, la cual se calculó a partir de la cinética registrada espectrofotométricamente a 290 nm para cada concentración. Para la determinación de los parámetros cinéticos ( $v_{max}$  y  $K_m$ ) se empleó el método de linealización de Lineweaver-Burk (Ver capítulo 2).

Finalmente se sabe a partir de estudios previos que PAL es estable hasta temperaturas de 50°C por 10 min [43]. De hecho, ésta es una de las propiedades que se utiliza ventajosamente para su purificación. Sin embargo, hay muy poca información acerca de su temperatura óptima de reacción. Es por ello que la temperatura óptima de PAL purificada se determinó por incubación de la solución de 1 mM de L-Phe en Tris-HCl (0,1 M, pH=8,5, 5 mM EDTA) con PAL a concentración final de 206 mU/ml, a diferentes temperaturas (20 a 70 °C) por el término de 2 h. Finalizado dicho tiempo las muestras se sumergieron en un baño de hielo, se centrifugaron a 10000 rpm por 20 min para eliminar cualquier precipitado que pudiera formarse y se midió el *t*-CA formado por espectrofotometría a 290 nm.

## 4.4. Resultados y Discusión

### 4.4.1. Caracterización de células catalíticas

Una vez obtenidas las células catalíticas se caracterizarán en varios aspectos que tienen incumbencia en cuanto a su factibilidad de uso para la aplicación propuesta. A continuación se detallan cada uno.

#### 4.4.1.1. Permeabilización de células conteniendo PAL

El objetivo de este estudio fue revelar si se puede emplear una técnica de conservación del biocatalizador, como lo es la liofilización, para la permeabilización de las células, obteniendo el mismo desempeño observado cuando se utiliza CPC como agente permeabilizante.

Para ello se preparó una suspensión a partir de las células liofilizadas y se trató por un lado dichas células con CPC y por el otro lado no se agregó agente permeabilizante, como fue descrito previamente en la sección metodológica. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 4.6.

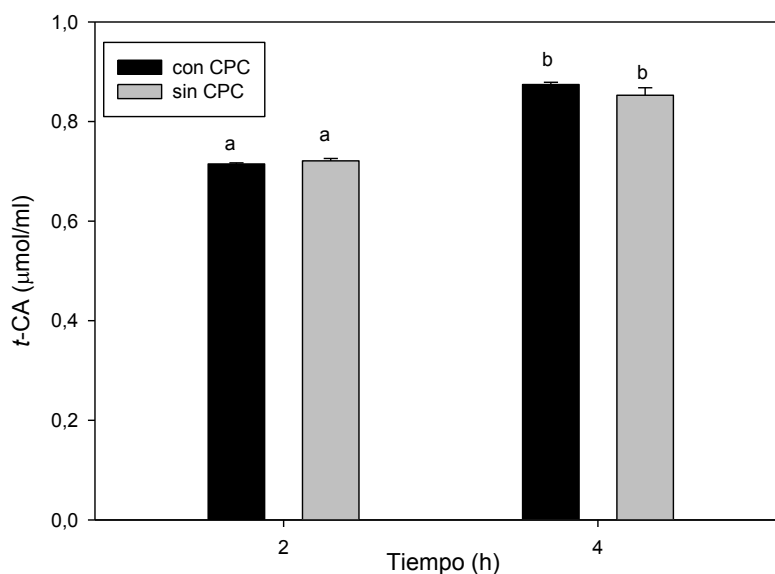


Figura 4.6. Permeabilización de células conteniendo PAL.

Suspensión celular: 5 mg/ml, sustrato: 1 mM de L-Phe en buffer Tris-HCl (0,1 M, pH=8,5 y 5 mM EDTA) y temperatura de reacción: 35°C.

Letras distintas indican diferencia significativa según Test de Tukey ( $p < 0,01$ ).

A partir de los resultados obtenidos podemos ver que no hay diferencias significativas entre las células liofilizadas de aquellas que han sido tratadas

adicionalmente con CPC. Esto implicaría que el proceso de congelado y liofilización sin crioprotección produjo un daño en la membrana plasmática, permeabilizándola, como lo indica la Figura 4.6. Para corroborar estos resultados se trazaron los espectros de absorción de las muestras analizadas a las 2 h y se compararon con el espectro de la droga patrón de *t*-CA.

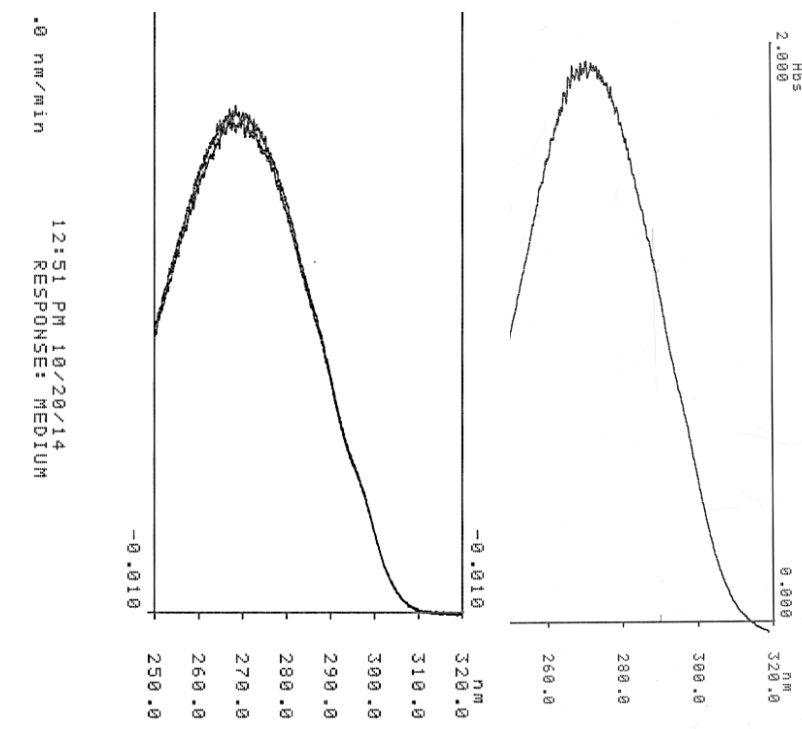


Figura 4.7. Espectrograma de *t*-CA formado.

Mezcla de reacción con y sin CPC (izq), droga patrón (der).

En la Figura 4.7 podemos ver que el pico obtenido a las 2 h para ambos tratamientos corresponderían al *t*-CA formado. Ambos picos tienen un patrón similar con un máximo a una longitud de onda alrededor de 270 nm. Se podría concluir entonces que en principio se trata del mismo compuesto y por ende mediante la medida de  $DO_{290}$  se está midiendo la concentración de *t*-CA.

En conclusión, como ya se mencionó anteriormente, el hecho de que se pueda utilizar una técnica de conservación como es la liofilización como técnica de permeabilización evitaría la incorporación de agentes químicos exógenos al biocatalizador, los cuales pueden resultar perjudiciales para la salud de los consumidores.

#### 4.4.1.2. Efecto de la concentración celular en la bioconversión

Un parámetro muy importante en lo que respecta a la optimización de la reacción, es determinar el efecto de la concentración celular sobre la bioconversión. Para una concentración fija de L-Phe (1 mM) se ensayaron concentraciones crecientes de células catalíticas (2,5 a 10 mg de células secas/ml de mezcla de reacción).

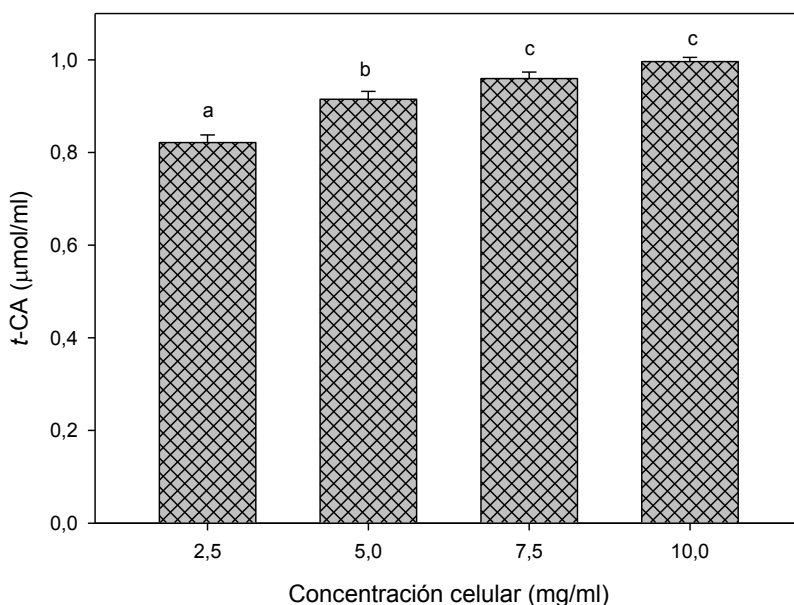


Figura 4.8. Efecto de la concentración celular en la bioconversión.

Letras distintas indican diferencia significativa según Test de Tukey ( $p < 0,01$ ).

En la Figura 4.8 se puede observar, luego de 4 h de incubación, un incremento en la bioconversión con el aumento de la concentración celular hasta 5 mg/ml. Más allá de estas concentraciones no hay variación significativa. También podemos visualizar que se alcanza la máxima conversión posible, ya que la reacción catalizada por PAL es mol a mol. Esto implica que a las 4 h de reacción se logró convertir casi la totalidad de L-Phe en ácido *t*-CA. Aun para la concentración más baja (2,5 mg/ml) se logró obtener más del 80% de conversión. A partir de este ensayo no sólo se pudo determinar la concentración celular más adecuada para la bioconversión (5 mg/ml) sino que se también se comprobó la eficacia de las células catalíticas a bajas concentraciones celulares en la bioconversión de L-Phe a *t*-CA.

#### 4.4.1.3. Cinética de bioconversión de L-Phe en *t*-CA

Como continuación del ensayo anterior, se llevó a cabo la cinética de bioconversión de L-Phe a *t*-CA empleando células catalíticas libres conteniendo PAL. Para ello se empleó una concentración celular de 5 mg/ml y soluciones de concentración creciente de L-Phe (1, 5 y 10 mM). Las cinéticas resultantes se muestran a continuación (Figura 4.9).

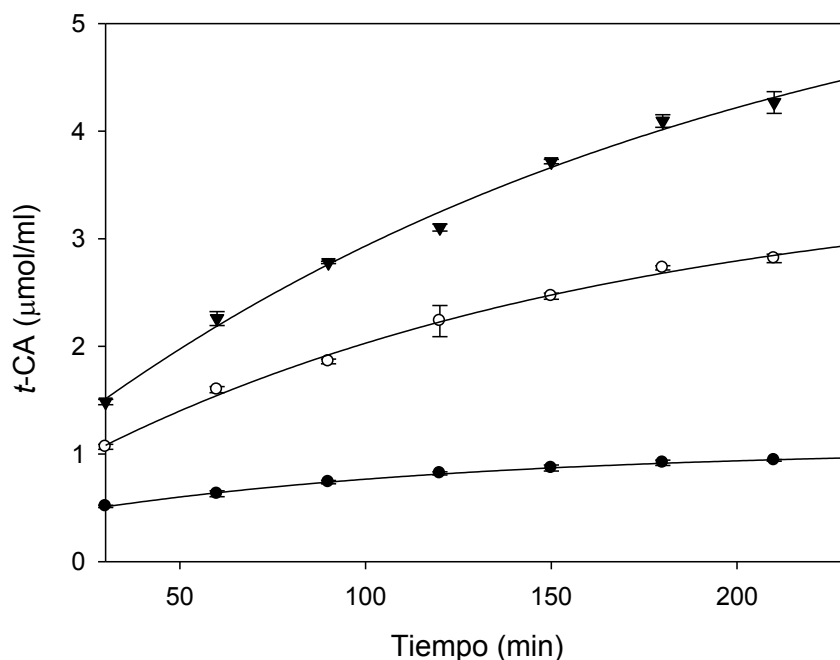


Figura 4.9. Cinética de bioconversión empleando células catalíticas.  
Concentración de L-Phe: 1 mM (●), 5 mM (○) y 10 mM (▼).

A partir de las cinéticas se pudo confirmar nuevamente la eficacia del biocatalizador respecto a la bioconversión de L-Phe en *t*-CA. Como se puede apreciar en la Figura 4.9, una solución 1 mM de L-Phe fue convertida totalmente en *t*-CA luego de transcurridos 150 min. En el caso de concentraciones mayores de L-Phe puede observarse que la conversión fue parcial, alrededor del 60% para 5 mM y ~45% para 10 mM. En estos casos la conversión total no pudo alcanzarse debido a que la reacción no transcurrió a velocidad máxima, como puede apreciarse en la Figura 4.9. Esto implica que para concentraciones mayores de sustrato se requerirá ajustar la cantidad de biocatalizador para asegurar que la reacción transcurra a velocidad máxima de modo que se alcance la bioconversión total en un tiempo razonable.

#### 4.4.1.4. Efecto de la temperatura en las células catalíticas libres

En lo que respecta al efecto de la temperatura en la actividad de las células catalíticas conteniendo PAL, se evaluó la termoestabilidad y la temperatura óptima.

Respecto a la termoestabilidad se sometió a una suspensión celular de 10 mg/ml a tratamiento a diferentes temperaturas (20 a 70°C) por 10 min. Luego se incubaron las mismas con 1 mM L-Phe a 35°C por 2 h. Luego de dicha incubación se determinó el *t*-CA formado.

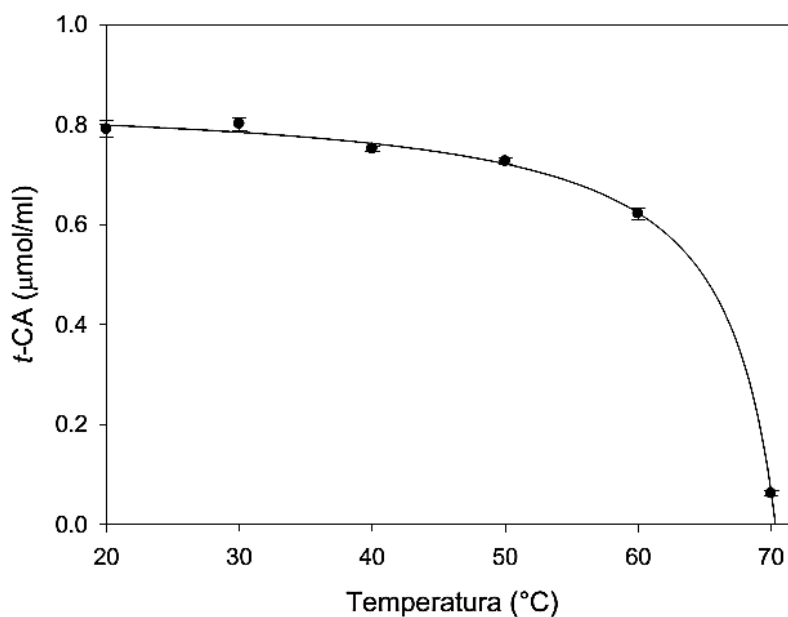


Figura 4.10. Efecto de la temperatura en la estabilidad de las células catalíticas.

Como puede verse en la Figura 4.10, las células catalíticas son estables respecto a la temperatura hasta valores cercanos a los 60°C, inactivándose completamente durante tratamiento térmico a 70°C por 10 min. Dicha inactivación es muy probable que se deba a la desnaturalización proteica de PAL debido a la temperatura.

Por otro lado se determinó el efecto de la temperatura sobre la reactividad de PAL. Para ello se incubó 10 mg/ml de células catalíticas con 1 mM L-Phe a diferentes temperaturas (20 a 70°C) durante 2 h. La finalidad de este ensayo fue determinar la temperatura óptima de trabajo para las células catalíticas.

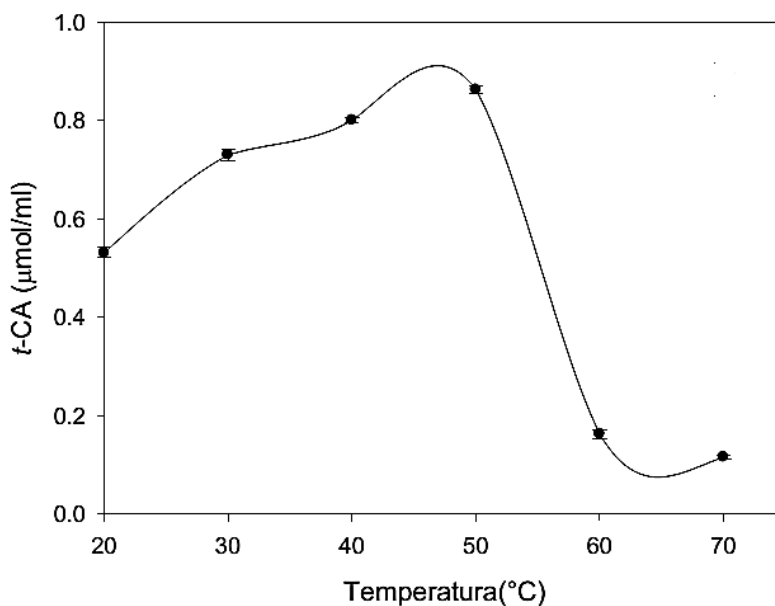


Figura 4.11. Temperatura óptima de las células catalíticas.

La Figura 4.11 nos muestra el perfil de temperatura y su efecto en la formación de producto. Se puede observar a simple vista que la temperatura óptima de las células catalíticas es cercana a los 50°C, donde el efecto de aumento de la actividad respecto a la inactivación se ve compensado. Luego, si comparamos la formación de *t*-CA a 20°C y 50°C, se alcanza un incremento de casi el 40% con el aumento de 30°C, lo cual es un incremento considerable teniendo en cuenta que en 2 h a 48°C se podría alcanzar casi el 90% de conversión total. Con estos resultados hemos demostrado que se puede lograr una mejora considerable del sistema al utilizar temperaturas de reacción cercanas a 50°C. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que se requiere un control estricto de la temperatura a fines de evitar la inactivación de la enzima, la cual comienza por encima de los 50°C con una pendiente abrupta, inactivándose completamente a los 60°C.

#### 4.4.1.5. Estabilidad durante el almacenamiento

La estabilidad de las células catalíticas durante el almacenamiento en condiciones de refrigeración se determinó durante los días subsiguientes a su preparación. Este estudio tiene como objetivo evaluar la cinética de pérdida de actividad a 5°C para las células catalíticas. A partir de las muestras obtenidas cada día se obtuvo los valores de % relativo de Actividad PAL, de la siguiente manera (Ecuación 4.3):

$$\text{Actividad PAL relativa (\%)} = \frac{AE_x}{AE_{TOTAL}} * 100 \quad (4.3)$$

La cinética de detrimento de la actividad durante el almacenamiento a 5°C, se grafica en la Figura 4.12.

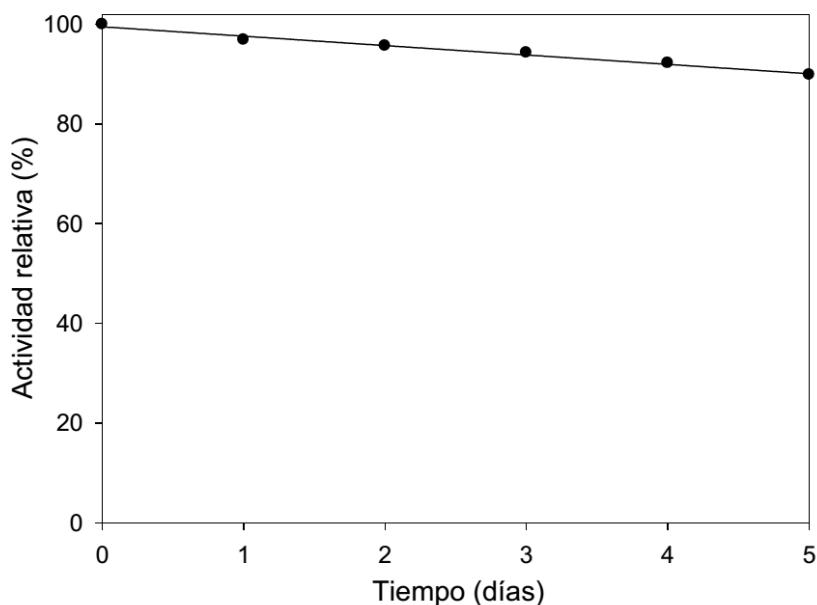


Figura 4.12. Cinética de pérdida de actividad durante el almacenamiento.

Suspensión celular: 5 mg/ml, sustrato: 1 mM de L-Phe en buffer Tris-HCl (0,1 M, pH=8,5 y 5 mM EDTA), temperatura de reacción: 35°C y tiempo de incubación: 2 h.

Correlación lineal:  $y = -1,8862 x + 99,539$  ( $R^2 = 0,9825$ ).

Luego de transcurridos los 5 días de almacenamiento a temperatura de refrigeración, el 90% de la actividad enzimática se conserva, lo cual es interesante desde el punto de vista que se puede preparar un batch por semana de células sin pérdida considerable de actividad. La cinética de pérdida de actividad presenta un comportamiento lineal lo que implica que, de seguir dicho comportamiento en el tiempo, se perdería totalmente la actividad enzimática luego de 53 días, lo cual es demasiado tiempo para el almacenamiento de células, debido a la posibilidad de contaminación microbiológica.

En definitiva, a partir de la caracterización completa de las células catalíticas se puede concluir que el biocatalizador obtenido evidencia una serie de ventajas respecto a su aplicación:

- Presentan elevada actividad por mg de células por lo que se requiere poco catalizador para alcanzar los objetivos deseados.

- La cinética de biocatálisis es lo suficientemente elevada para alcanzar la bioconversión completa de soluciones 1 mM de L-Phe a las 3 h de iniciado el tratamiento.
- La pérdida de actividad por exposición a temperatura elevadas es baja hasta 50°C, de hecho es posible conseguir un efecto global positivo cercano a estas temperaturas.
- Es un biocatalizador de fácil preparación y se puede mantener en heladera durante 5 días sin pérdida considerable de la actividad.

A pesar de las ventajas expuestas, y si bien se puede eliminar las células por centrifugación, no parece ser un método factible para su aplicación industrial. Para ello debería considerarse una tecnología de inmovilización eficiente y económica.

#### 4.4.2. Caracterización de PAL purificada

La enzima purificada ha sido ampliamente caracterizada a lo largo de estos años, ya que muchos trabajos están dirigidos a la purificación y utilización de la enzima para propósitos de síntesis química o medicinal [38, 39, 41, 42]. Debido a que el objetivo de este trabajo es buscar una alternativa económica para la obtención del biocatalizador la enzima pura servirá únicamente con el propósito de contrastar la cinética y se empleará solamente si su utilización deriva en mejoras sustanciales.

##### 4.4.2.1. Actividad enzimática de la enzima purificada

Ambas enzimas (purificada y parcialmente purificada) se comparan en función de su actividad enzimática volumétrica (Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Actividad de PAL con diferente grado de pureza.

<i>Identificación</i>	<i>AE (U/ml)</i>
PAL purificada	20,6
PAL parcialmente purificada	2,8

Cuando comparamos las dos enzimas podemos ver que hay mucha diferencia en actividad respecto una de la otra. Para lograr una purificación total

se requieren sucesivas etapas de purificación y concentración, lo cual resulta un proceso tedioso y el costo del mismo es elevado. Si bien la enzima parcialmente purificada permite incrementar la actividad respecto al cultivo inicial, no confiere mejoras considerables. Debido a su relativamente baja actividad no sería conveniente su inmovilización, sino que debería emplearse en solución. Esta alternativa se evaluará más adelante (Ver capítulo 6).

#### 4.4.2.2. Efecto de la concentración del biocatalizador en $v$

Como ya se mencionó previamente, la concentración del biocatalizador es un parámetro que se desea optimizar, debido al costo de su obtención, especialmente en el caso de enzimas purificadas. Como resultado de ello, se determinó la influencia de la concentración del biocatalizador en la velocidad inicial de reacción (Ecuación 3.18).

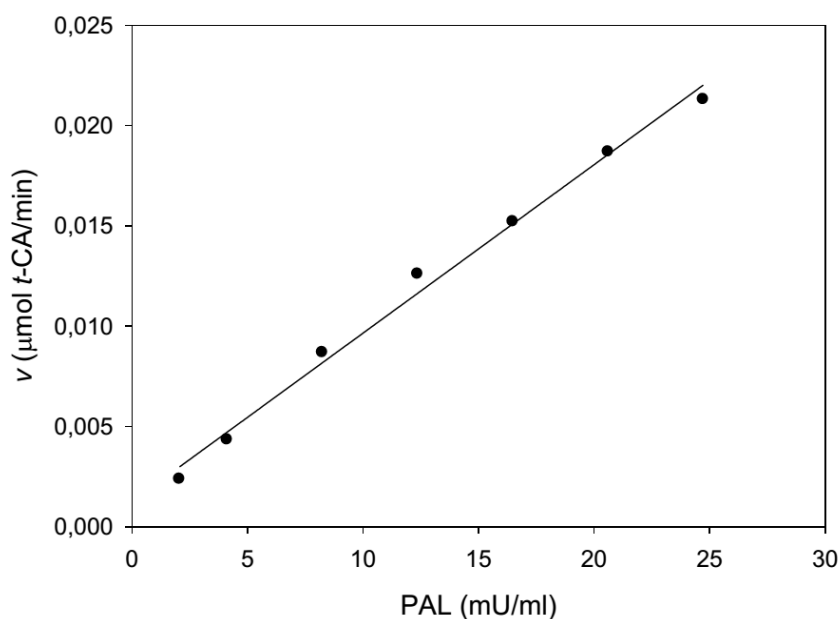


Figura 4.13. Influencia de la concentración de PAL en la velocidad inicial.

Sustrato: 2,5 mM de L-Phe en buffer Tris-HCl (0,1 M, pH=8,5) y temperatura de reacción: 30°C.

$$\text{Correlación: } y = 9 \cdot 10^{-4}x \quad (R^2 = 0,9823)$$

A partir de la Figura 4.13 podemos ver que el incremento en la concentración de PAL aumenta la velocidad de reacción en forma lineal. Esto implicaría que para lograr la bioconversión completa equivalente a 3 h (como en el caso de las células catalíticas) de una solución 2,5 μmoles de L-Phe se requiere una  $v = 0,0138 \mu\text{mol}/\text{min}$  de  $t$ -CA. Si hipotéticamente la reacción transcurriera a

velocidad inicial, bastarían con 15 mU/ml de PAL, lo cual equivale a 36  $\mu$ l de una solución 1/50 de PAL purificada. En conclusión, la enzima pura es una alternativa a las células catalíticas debido a su elevada actividad. Sin embargo, para su utilización se requiere obtener ventajas significativas de su inmovilización, ya que debe ser reutilizarla reiteradamente para que el proceso sea rentable.

#### 4.4.2.3. Caracterización cinética de la enzima pura

La finalidad de la caracterización de la cinética enzimática es determinar los parámetros cinéticos propios de PAL pura. Para ello se determinó la cinética a diferentes concentraciones de sustrato y se graficó  $v$  en función de dicha concentración (Figura 4.14).

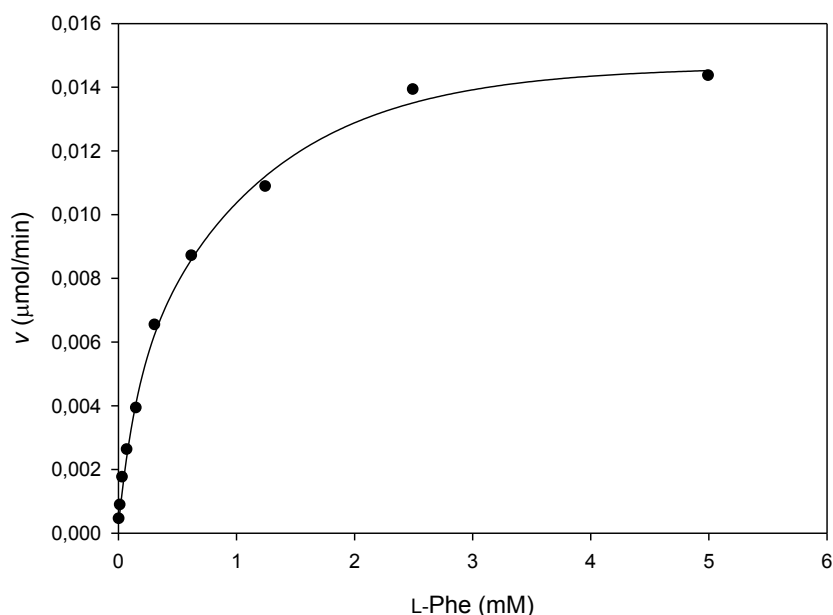


Figura 4.14. Cinética de PAL pura.

PAL: 10,3 mU/ml y temperatura de reacción: 30°C.

La cinética de PAL purificada resultó ser una típica cinética del tipo de Michaelis-Menten (Ver capítulo 2). Esto ya había sido observado previamente por otros investigadores [41, 43]. Respecto a la determinación de los parámetros cinéticos (Ver capítulo 2), se llevó a cabo mediante linealización de Lineweaver-Burk (Figura 4.15).

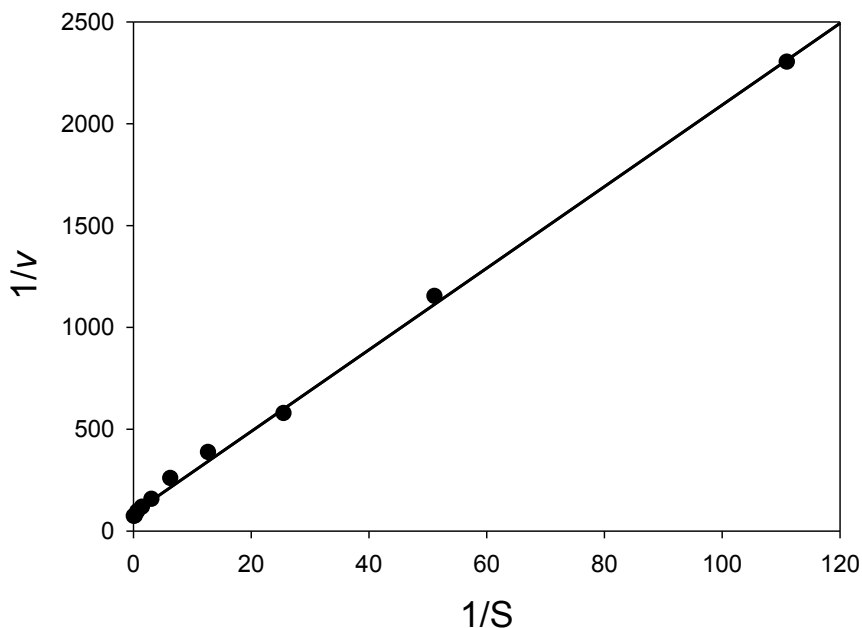


Figura 4.15. Linealización de Lineweaver-Burk para PAL pura.

$$\text{Correlación: } y = 20,039x + 88,821 (R^2 = 0,9986)$$

De acuerdo a este modelo, los parámetros cinéticos para la enzima pura son:

$$v_{max} = \frac{1}{o.o} = \frac{1}{88,821} = 0,011 \text{ mM/min} \quad (4.4)$$

$$K_m = \text{pendiente} * v_{max} = 20.039 * 0,011 = 0,23 \text{ mM} \quad (4.5)$$

Si se compara los valores de  $K_m$  obtenidos para PAL purificada se comparan con los valores bibliográficos: 0,29 mM [41] y 0,25 mM [43], podemos ver que el valor obtenido a partir de esta enzima está muy cercano a los mismos.

#### 4.4.2.4. Temperatura óptima de la enzima pura

Se determinó la temperatura óptima para la enzima pura con la finalidad de observar si tiene un comportamiento similar a la enzima recluida dentro de la célula. Para ello se incubó la enzima con el sustrato a diferentes temperaturas (20 a 70°C) por 2 h. Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

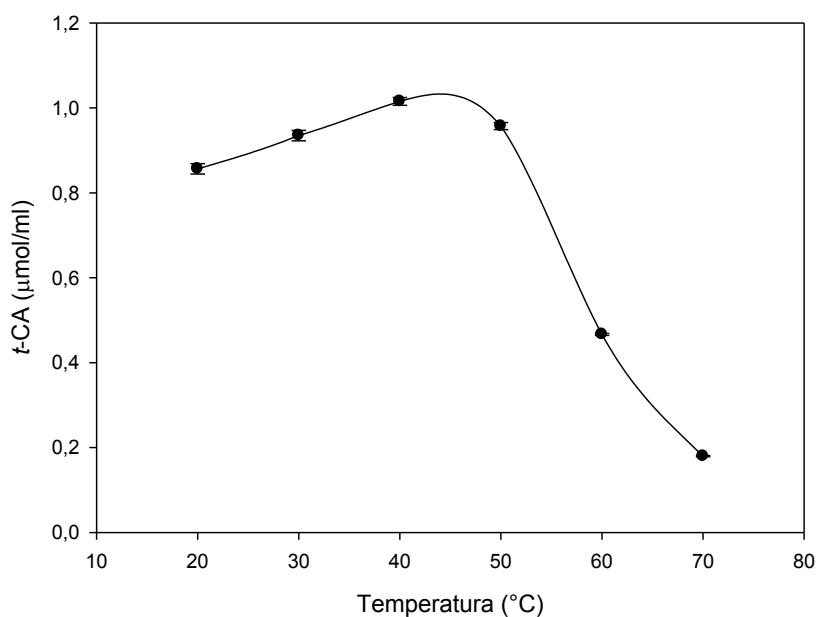


Figura 4.16. Temperatura óptima para PAL pura.

Sustrato: 1 mM de L-Phe en buffer Tris-HCl (0,1 M, pH=8,5, 5 mM EDTA), PAL: 206 mU/ml y tiempo de reacción: 2 h.

Comparando la Figura 4.16 con la Figura 4.11 (correspondiente a la temperatura óptima de las células catalíticas) se observan algunas diferencias. En principio, la temperatura óptima para la enzima purificada se encuentra más cercana a los 40°C que a los 50°C. Tampoco se observa mucha diferencia entre temperaturas de 20°C y 40°C, obteniendo <20% de incremento. Estas diferencias sugieren que la enzima tiene un comportamiento diferente frente a la temperatura si se encuentra libre o bien si se encuentra dentro de la célula. Probablemente en el caso de la célula catalítica, al encontrarse la enzima dentro de su ambiente fisiológico, la misma se encuentre protegida de algunos factores externos como la temperatura. La enzima pura, sin embargo, se encuentra más expuesta a los factores externos.

En conclusión, si debemos elegir una alternativa, a saber: célula catalítica y enzima purificada, podemos hallar ventajas y desventajas de cada una de ellas. Sin embargo, desde el punto de vista estrictamente económico parecería que la célula catalítica es la mejor opción. Sin embargo, la elección final dependerá del comportamiento de los biocatalizadores en sistemas inmovilizados típicamente empleados para cada caso (Ver Capítulo 5).

# Parte III

## *Caracterización del biocatalizador inmovilizado*



# Capítulo 5

## Inmovilización y caracterización del biocatalizador

---

### 5.1. Objetivos

Los objetivos del presente capítulo son:

- Describir la metodología de inmovilización de las células catalíticas.
- Caracterizar el biocatalizador inmovilizado obtenido.
- Contrastar el desempeño del biocatalizador con PAL pura inmovilizada.

### 5.2. Fundamentos

#### 5.2.1. Biocatalizadores inmovilizados

Como ya se mencionó en el Capítulo 2, la utilización de enzimas en la industria ha proporcionado claras ventajas en comparación con los catalizadores químicos, entre ellas alta especificidad, elevada actividad y gran efectividad a presión y temperatura ambiente. A pesar de ello, el empleo de muchas enzimas en la industria se ve limitado como consecuencia de su labilidad en las condiciones normales de trabajo. Por otra parte, debido a que son hidrosolubles, es difícil recuperarlas de la mezcla de reacción para utilizarla en un sucesivo proceso, al igual que separarlas de los productos de reacción. Con el advenimiento de la inmovilización de las enzimas, se han podido superar estos últimos inconvenientes, permitiendo que el proceso biotecnológico sea económicamente rentable [117].

De acuerdo a la European Federation of Biotechnology (1983), se definen los biocatalizadores inmovilizados como: “enzimas, células u organelas (o combinación de ellos) confinados o localizados en una región definida del espacio, con retención de su actividad catalítica y, si es necesario, de su viabilidad, y que pueden ser usados de modo repetido y continuo” [11].

El término “confinado y localizado” implica el uso de una fase insoluble y macroscópica que sea catalíticamente activa y la cual se encuentre dispersa en un medio líquido, libre del catalizador. El transporte de reactivo hacia y desde el biocatalizador está gobernado por difusión, produciéndose gradientes y haciendo que la concentración varíe en el seno del líquido y dentro del catalizador.

Por otro lado, el término “retención de la actividad catalítica” implica que la metodología de inmovilización debe asegurar al menos el 25% de la actividad original del biocatalizador.

Finalmente, cuando hace mención al “uso repetido y continuo” se refiere a que el biocatalizador debe poder separarse fácilmente del seno de la solución para poder reutilizarlo.

### **5.2.2. Ventajas y desventajas de la inmovilización de enzimas**

El uso de biocatalizadores inmovilizados en la industria de bioprocesos confiere una serie de ventajas respecto al uso del biocatalizador libre [17, 22]. Las mismas se anuncian a continuación:

- Reutilización del biocatalizador: una de las ventajas más importantes de los biocatalizadores inmovilizados es la posibilidad de usarlo reiteradamente. Esta propiedad se debe a que el aislamiento del biocatalizador en general es muy sencillo, en contraste con el biocatalizador libre. Esto se ve reflejado en un incrementando de la productividad por unidad de enzima. Dicha productividad es un requisito esencial para el biocatalizador inmovilizado, ya que de ello depende la rentabilidad del proceso.
- Mayor control sobre la reacción: esta característica es importante cuando se debe detener la reacción por algún motivo en particular. Cuando el biocatalizador se encuentra libre en solución, la única forma de detener una reacción es inactivando la enzima, mientras que el biocatalizador inmovilizado es fácilmente removible de la mezcla de reacción.
- Adaptación a procesos continuos: los biocatalizadores inmovilizados pueden ser empleados en procesos continuos, por ejemplo en lechos estáticos en una columna o bien lechos fluidizados. Esto permite poder

automatizar el proceso con la consiguiente reducción de los costos laborales.

- Menor contaminación de los productos: mediante el uso de biocatalizadores inmovilizados, la recuperación de los productos de reacción o del sustrato modificado, resulta más sencilla. Esto evita la contaminación de ambas especies con el catalizador, y por ende, las etapas de downstream necesarias para la purificación del producto.
- Estabilización del biocatalizador: el soporte de inmovilización puede proveer un ambiente favorable que protege la enzima de las condiciones de reacción, brindándole estabilidad y aumentando, de este modo, la vida útil de la misma.

Por otro lado, la utilización de enzimas tiene una serie de desventajas, entre ellas:

- Pérdida de actividad durante la inmovilización: es posible que parte de la actividad del biocatalizador se pierda durante la inmovilización. Esto dependerá en gran medida del método escogido para llevarla a cabo. Por un lado, las condiciones de inmovilización pueden ser perjudiciales para el biocatalizador. Por otra parte, algunos métodos de inmovilización pueden modificar la conformación de la estructura nativa de las enzimas, pudiendo reducir considerablemente su actividad.
- Heterogeneidad del sistema enzima-soporte: puede ocurrir que la cantidad de enzima unida a un soporte difiera y con ello se pueden producir variaciones entre batch y batch.
- Barrera difusional: la inmovilización generalmente adiciona una barrera al libre flujo de sustratos y productos, lo cual traduce en gradientes de concentración a través del soporte, limitando en gran medida la velocidad de reacción.
- Incremento del costo de producción del biocatalizador: la incorporación de la inmovilización en la producción del biocatalizador implica, un costo adicional. Como consecuencia, el catalizador inmovilizado siempre será más caro que el biocatalizador libre. Sin embargo, la rentabilidad del proceso se puede incrementar mediante las ventajas del uso de biocatalizadores inmovilizados, por las razones anteriormente descritas.

### 5.2.3. Métodos de inmovilización

En general, los métodos de inmovilización se pueden clasificar en dos grandes categorías [8]:

- Métodos de retención física: En éstos, la enzima queda retenida físicamente en el soporte o carrier. Los métodos físicos se pueden clasificar en: Atrapamiento y Retención en membranas (Figura 5.1).
- Métodos de unión química: El biocatalizador se mantiene unido al carrier, mediante enlaces químicos. Los métodos químicos se pueden clasificar en Enlaces covalentes, Adsorción y Entrecruzamiento (Figura 5.1).

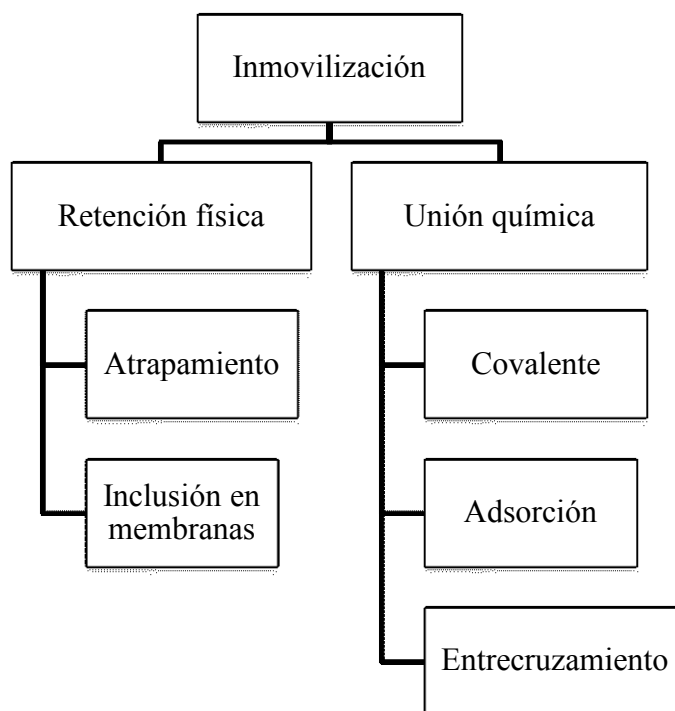


Figura 5.1. Métodos de inmovilización de biocatalizadores.

Cada uno de los métodos de inmovilización se describe brevemente a continuación [8, 14, 117]:

- Atrapamiento: Este método consiste en la retención física de la enzima en las cavidades internas de una matriz sólida porosa. Entre los polímeros más empleados se encuentran poliacrilamida, colágeno, alginato, carraginato, etc. La metodología se basa en la adición de la enzima a la solución del monómero, el cual luego se polimeriza por variaciones en la temperatura o bien por el agregado de un reactivo químico. El atrapamiento puede llevarse a cabo en geles, donde la enzima

queda retenida en el interior del gel, o bien en fibras, donde la enzima queda ocluida a las microcavidades de dicha fibra. Algunas ventajas de este método es que no altera la estructura de la enzima, requiere poca carga enzimática por unidad funcional y en general es de fácil preparación. Sin embargo, es necesario controlar las condiciones de polimerización y comprobar que no haya interacción químicas con los soportes, ya que dichas interacciones pueden alterar la estructura y funcionalidad de la enzima.

- **Inclusión en membranas:** En este método las enzimas se incluyen dentro de membranas semipermeables que permiten el paso de moléculas de sustratos y producto, pero retienen a la enzima. Un tipo específico de inclusión en membrana es la microencapsulación, la cual se logra mediante polimerización sobre la superficie de la enzima dentro de un solvente compuesto por solventes orgánicos y agentes surfactantes. Se trata de un método sencillo, que no altera la estructura y funcionalidad de la proteína, ya que la misma se encuentra libre dentro de la membrana. Además, puede adaptarse a sistemas continuos de producción a gran escala. En contraposición, debido a que las enzimas se encuentran más expuestas, pueden sufrir pérdida de actividad más fácilmente que en otros sistemas. Finalmente, dependiendo de las características de la membrana, pueden incorporar una resistencia considerable a la difusión de sustrato y producto a través de ella.
- **Enlace covalente a matrices solubles:** Este método se basa en la activación de grupos químicos del soporte, para que reaccionen con los nucleófilos de la proteína. Los aminoácidos cuyos residuos reaccionan más frecuentemente con el soporte son: lisina, cisteína, tirosina e histidina. Algunos de los soportes más empleados son los polímeros de acrilamida, polímeros basados en el estireno, polímeros metacrílicos, etc. Se trata de una tecnología flexible, que confiere elevada estabilidad a la enzima antes condiciones desfavorables del entorno. Sin embargo, el rendimiento de inmovilización es bajo y la cinética de la enzima puede ser alterada.
- **Adsorción sobre matrices insolubles:** La enzima se une al soporte mediante interacciones iónicas, de Van der Waals y puentes de hidrógeno, dependiendo de la naturaleza del carrier. Algunos factores que influyen en

la adsorción de la enzima son: el pH del medio, la fuerza iónica, el diámetro de poro, la carga enzimática, etc. Algunos carriers empleados son la alúmina, carbonato de calcio, carbón, celulosas, colágenos, tierra de diatomea, piedras de vidrio, etc. La adsorción, como método de inmovilización, tiene la ventaja de ser fácil de preparar, tiene un bajo costo, y no produce cambios de especificidad enzimática. En contraposición, son poco estables mecánicamente y la unión al soporte es débil, pudiendo perder fácilmente la carga enzimática.

- Entrecruzamiento: Esta metodología emplea reactivos bifuncionales de bajo peso molecular, los cuales se unen a la enzima mediante uniones intermoleculares. Un ejemplo de reactivo bifuncional es el glutaraldehído. El entrecruzamiento entre la enzima y los compuestos bifuncionales producen derivados insolubles, con lo cual no se requiere de un carrier para que contenga la enzima. Este método puede llevarse a cabo en la superficie de la enzima soluble (CLE), sobre la enzima cristalizada (CLEC), o bien sobre agregados de la enzima (CLEA). Este sistema tiene la ventaja de que, al no requerir de un carrier, la actividad específica del catalizador es elevada. También son resistentes a incrementos de pH y temperatura.

La elección de los métodos de inmovilización a emplear dependerá en gran medida del propósito de la bioproceso. Por ende, debe considerarse el tipo de biocatalizador, el tipo de reacción y los biorreactores empleados para su aplicación [11].

Los soportes o carriers de inmovilización, a su vez, deben cumplir una serie de requisitos, entre ellos:

- Contener grupos funcionales adecuados para inmovilizar el biocatalizador.
- Resistencia mecánica.
- Estabilidad física, química y biológica.
- No tóxicos.
- Versátiles para su uso en diferentes biorreactores.
- Elevada disponibilidad en el mercado.
- Económicos, etc.

### 5.2.4. Tipos de biorreactores para biocatalizadores inmovilizados

Existen diversos tipos de biorreactores empleados para la utilización del biocatalizador inmovilizado (Figura 5.2). Más allá de los aspectos constructivos, existen dos formas de operación: continua y discontinua o batch. En los biorreactores operados de forma continua existe un flujo constante de entrada de sustrato, así como también un flujo constante de salida de producto. De esta forma, en el interior del biorreactor se llega a un estado estacionario donde la concentración en el interior del seno del líquido es igual a la que sale del biorreactor. Por otro lado, en los biorreactores que trabajan en forma discontinua o por batch, se introduce el sustrato en el biorreactor junto con el catalizador y la reacción sigue su curso hasta que finaliza la conversión. Recién entonces se descarga el biorreactor y se obtiene el producto de interés.

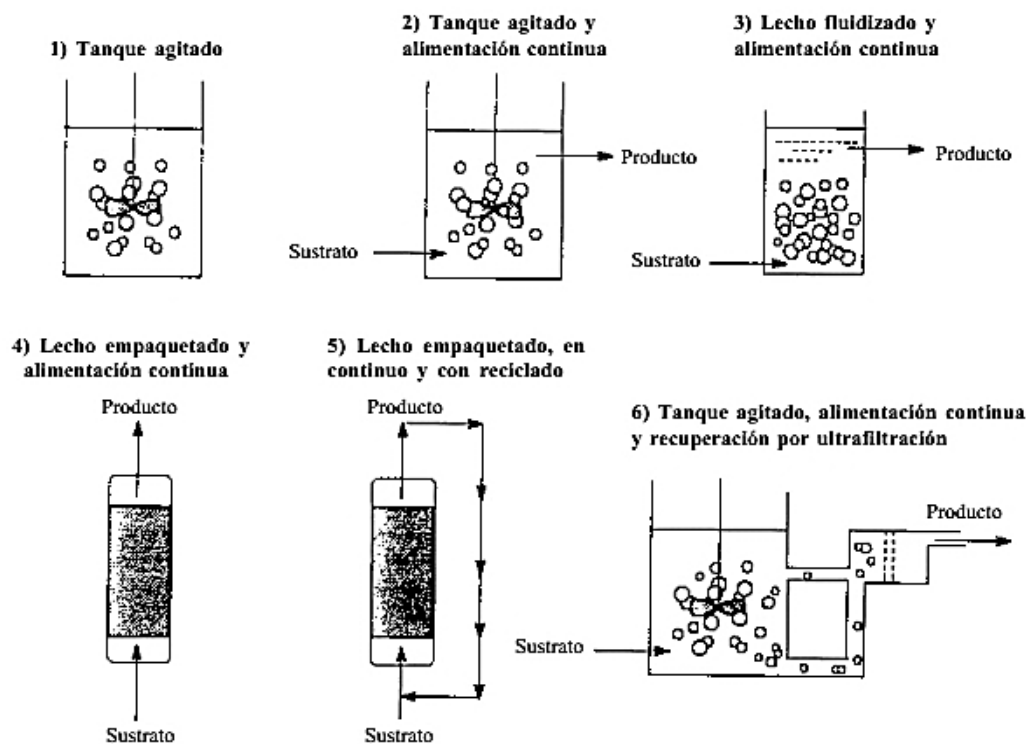


Figura 5.2. Tipos de biorreactores para biocatalizadores inmovilizado [117].

Los tanques agitados son la configuración más simple de biorreactor. Los mismos constan de un recipiente con agitación, en el cual se incorpora el biocatalizador inmovilizado y el sustrato. Pueden operar tanto de forma continua como discontinua. Otra configuración de biorreactor muy empleada es la

columna. Ésta generalmente se emplea en forma continua y puede tener diferentes configuraciones. Por un lado hay columnas de lecho empaquetado, donde el biocatalizador inmovilizado se empaca en la columna y la solución de sustrato para a través de ella, produciéndose la bioconversión. Este tipo de reacción puede tener o no recirculación de producto. Una variante de este sistema es el lecho fluidizado, donde el biocatalizador en vez de encontrarse empaquetado, tiene libertad de movimiento. En éste último, la solución pasa a través de la columna, a un flujo mayor a la velocidad mínima de fluidización. Cada uno de estos biorreactores puede tener diferentes variantes de acuerdo a su aplicación.

### **5.2.5. Efectos de la inmovilización sobre el biocatalizador**

El proceso de inmovilización puede afectar de diferente manera al biocatalizador. Dichos efectos deben tenerse en cuenta a la hora de elegir un método de inmovilización y una forma de operación. Los efectos más relevantes se resumen a continuación [14, 117]:

- Efecto en la estabilidad: se ha observado muchas veces un incremento en la estabilidad del biocatalizador una vez inmovilizado. Esto puede deberse en principio a la estabilización de la conformación de la enzima por uniones puntuales con el soporte. Como consecuencia de estas uniones, la estructura terciaria de la enzima se vuelve más rígida y resistentes a la desnaturalización por temperatura o agentes químicos. Otra causa de estabilización puede ser la protección que confiere el soporte frente al accionar de proteasas, ya que la unión de las proteasas con el soporte disminuye su capacidad de proteólisis. Finalmente, debido a la retención de la enzima en el soporte, la capacidad de agregación se pierde, lo cual a su vez también le confiere estabilidad.
- Efectos sobre la actividad enzimática: como consecuencia del proceso de inmovilización puede perderse parte o totalidad de la enzima. Esto puede deberse a varios factores, aquí se mencionarán sólo algunos de ellos. Por un lado, puede existir un problema de impedimento estérico que impide que el sustrato llegue al centro activo de la enzima. Adicionalmente es posible que algunos grupos reactivos del soporte reaccionen con un

aminoácido que forme parte del sitio activo de la enzima, en cuyo caso la reacción se verá parcial o completamente impedida. Otra posible causa puede ser la metodología de inmovilización, la cual puede ocasionar un cambio en la estructura nativa de la enzima, lo que deriva en la pérdida de su funcionalidad. Finalmente, las condiciones del entorno durante la inmovilización, o bien, durante la reacción pueden provocar la desnaturalización proteica, en cuyo caso la enzima perderá totalmente su actividad.

- Efectos difusionales: como resultado de la inmovilización es común que se evidencien problemas difusionales que afecten la velocidad de reacción, ya sea por la resistencia a la entrada del sustrato o bien por la resistencia a la salida del producto. Por un lado, tenemos resistencias externas, las cuales son independiente del soporte. Dentro de las resistencias externas se encuentra la resistencia a la transferencia de masa desde el seno del líquido hasta la partícula. En las proximidades de la partícula hay una resistencia externa adicional, la cual está constituida por una película líquida estacionaria denominada capa de Nernst. En general, las concentraciones en la capa de Nernst son menores que en el seno del líquido. Por otro lado, las resistencias difusionales internas se deben exclusivamente a la naturaleza del soporte y, de ello dependerá, la facilidad con la que el sustrato llegue al centro de la partícula (Figura 5.2). Las barreras difusionales, tanto internas como externas, pueden sortearse por ejemplo, disminuyendo el tamaño del biocatalizador, incrementando la agitación, aumentando la concentración de sustrato en el seno del líquido, etc.

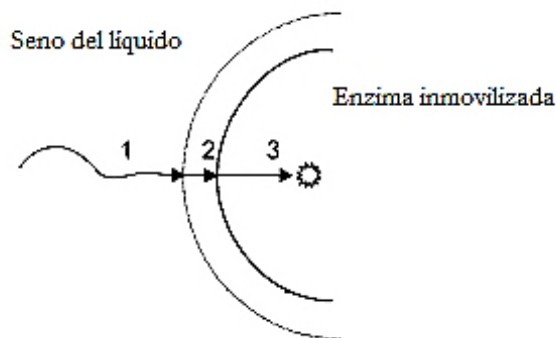


Figura 5.3. Barreras difusionales del biocatalizador inmovilizado [14].

- (1) Resistencia externa en el seno del líquido, (2) Resistencia externa en la película estanca y (3) Resistencia interna del soporte.

### 5.2.6. Antecedentes de inmovilización de PAL

Existen varios tipos de inmovilización aplicables a PAL; sin embargo, para evitar cambios conformacionales de la enzima que puedan ocasionar pérdida de actividad, se emplearán métodos físicos de inmovilización.

Para las células catalíticas se optó como método de inmovilización el atrapamiento en matrices poliméricas, donde la enzima es confinada dentro de las cavidades inertes de una matriz suficientemente compacta para retener las células en su interior. Una de las matrices poliméricas más empleadas para estos fines son los geles de alginato de calcio (Alg-Ca). Este tipo de gel se ha utilizado tanto en la inmovilización de células catalíticas, como en la inmovilización de enzimas puras. Los geles de alginato de calcio se forman a partir de la gelificación de soluciones de alginato de sodio, en presencia de calcio, en un proceso que se denomina gelificación ionotrópica. Estos geles presentan muchas ventajas para su aplicación, entre ellas:

- Tienen elevada resistencia mecánica, con lo cual pueden adaptarse a variados diseños de biorreactores.
- Tienen versatilidad de modo que pueden adquirir diversas formas y tamaños.
- Pueden contener elevada carga enzimática.
- Su preparación es simple y puede llevarse a cabo en condiciones suaves de operación.
- Son empleados en la industria alimenticia y farmacéutica, con lo cual tienen elevada disponibilidad en el mercado.
- Es económico.
- No es tóxico.
- Está habilitado su uso en alimentos por el Código alimentario Argentino (CAA) [11].
- Etc.

La inmovilización por atrapamiento en geles de Alg-Ca fue previamente empleada para células catalíticas conteniendo PAL, con diferentes propósitos. Algunos antecedentes incluyen la síntesis de L-Fenilalanina metil éster [42], la producción de L-Phe a partir de *t*-CA [118] y la terapia oral alternativa para pacientes con PKU [119]. Sin embargo, la mayoría de los estudios reportados se

enfocan en la preparación y estabilización de las células inmovilizadas de acuerdo con el propósito de uso, mientras que hay poco reportado sobre su caracterización y el empleo para fines específicos como el nuestro.

Con el propósito de contrastar el biocatalizador obtenido, se inmovilizará la enzima purificada por inclusión en membranas. Como ya se explicó anteriormente, en esta metodología la enzima es confinada dentro de una membrana semipermeable que permite el pasaje de sustrato y producto a través de ella. Esta metodología es el punto de partida para el diseño de reactores de fibra hueca.

Los reactores de fibra hueca se han empleado previamente con PAL inmovilizada para la reducción de L-Phe en sangre extracorporalmente, como terapia alternativa para pacientes con PKU [120, 121, 122]. Sin embargo, estos estudios tuvieron algunos inconvenientes, principalmente por la corta vida útil de PAL, por la presencia de respuestas inmunológicas en los pacientes y la impracticidad de su empleo, en especial en pacientes de corta edad, ya que se trata de un método muy invasivo [76].

## 5.3. Metodología

### 5.3.1. Inmovilización de células catalíticas

Las células catalíticas, cuya obtención y caracterización se describen en el Capítulo 4 de la presente tesis, fueron inmovilizadas por atrapamiento en geles de alginato de calcio (Alg-Ca).

Previo a la inmovilización, las células catalíticas a emplear se suspenden en buffer Tris-HCl (0,1 M, pH=8,5) al cual se le adicionó 5 mM EDTA y se incubaron en condiciones de refrigeración a 5°C por 4 h. La finalidad de este tratamiento es inhibir las metaloproteasas que pudieran estar presentes en la suspensión celular, previo a la inmovilización. Transcurrido dicho tiempo, la suspensión fue centrifugada a 8800 rpm por 10 min. Finalmente, las células catalíticas se resuspendieron en buffer Tris-HCl (0,1 M, pH=8,5, 1 mM EDTA) hasta alcanzar una concentración celular de 400 mg/ml.

Para la inmovilización se emplearon dos alginatos marca Wako Pure Chemicals Co. de diferente viscosidad (80 a 120 cP y 300 a 400 cP). Ambos se prepararon en una concentración de 2% p/v en buffer Tris-HCl (0,1 M, pH=8,5, 1 mM EDTA) y se mantuvieron en agitación hasta completa disolución, bajo condiciones de refrigeración.

La suspensión celular se mezcla luego con el Alg-Na en proporción 1/4, alcanzando una concentración celular final de 100 mg/ml. El sistema de inmovilización empleado se presenta en la Figura 5.4.



Figura 5.4. Sistema de inmovilización de células catalíticas.

El sistema consta de una bomba peristáltica (Perista, Atto, Tokyo) que impulsa la mezcla de alginato y células con un flujo de 230  $\mu\text{L}/\text{min}$  y las impulsa a caer en forma de pequeñas gotas sobre una solución de  $\text{CaCl}_2$  al 5% p/v, la cual se agita con ayuda de un agitador magnético. Todas las etapas anteriores se llevan a cabo a temperaturas de refrigeración. La formación del gel comienza desde el momento en que las gotas de alginato de sodio hacen contacto con la solución de calcio. Luego de finalizada la inmovilización, las esferas de Alg-Ca se mantuvieron en la solución de  $\text{CaCl}_2$  por el término de 2 h para consolidar el gel.

Finalmente, las esferas de Alg-Ca obtenidas (Figura 5.5), se filtraron con tela, se lavaron con agua destilada hasta eliminar los restos de Ca, y se colocaron en solución fresca de buffer Tris-HCl (0,1 M, pH=8,5, 1 mM EDTA), manteniéndose luego refrigeradas a menos de 4°C.

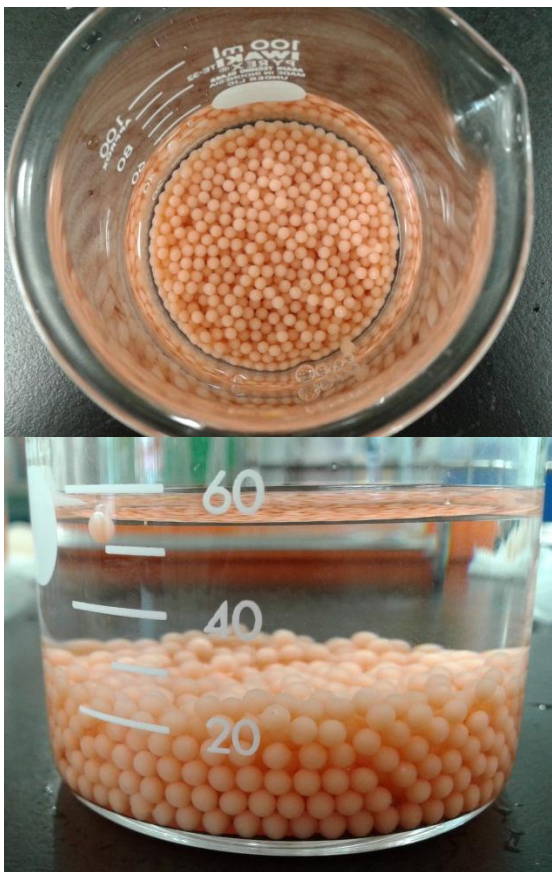


Figura 5.5. Células catalíticas inmovilizadas en Alg-Ca

Para la estandarización de la muestra, se determinó el diámetro medio de las esferas empleando un calibre electrónico y se pesaron en balanza analítica para determinar el peso medio de las esferas.

Adicionalmente se determinó la actividad de las esferas de Alg-Ca de ambas viscosidades y se compararon con la actividad de las células catalíticas de las cuales partieron. Para ello se incubaron los biocatalizadores inmovilizados y las células catalíticas a con una solución de L-Phe 1 mM en buffer Tris (0,1 M, pH=8,5, 1 mM EDTA). Una vez finalizada la incubación se detiene la reacción de dos maneras: en el caso de las células catalíticas por inactivación a 80°C por 5 min y en el caso del biocatalizador inmovilizado extrayendo el sobrenadante con una pipeta Pasteur. La actividad se determinó espectrofotométricamente por medida del *t*-CA formado a 290 nm.

De este modo se pudo calcular la actividad relativa PAL retenida de la siguiente manera:

$$\text{Actividad relativa PAL (\%)} = \frac{AE_1}{AE_0} * 100 \quad (5.1)$$

Donde  $AE_1$  es la actividad de las células catalíticas inmovilizadas, mientras que  $AE_0$  es la actividad de las células catalíticas libres.

### **5.3.2. Caracterización de las células catalíticas inmovilizadas**

#### **5.3.2.1. Efecto de la concentración de biocatalizador**

Como primer paso en la caracterización, se determinó la concentración del biocatalizador. Si bien el biocatalizador inmovilizado se agrega en cantidades discretas (esferas de alginato de calcio), se puede determinar el número o peso de esferas equivalentes a una determinada concentración celular ya que se conoce la concentración celular en la mezcla de alginato y el peso medio de las esferas.

En consecuencia, se incubó una solución 1 mM de L-Phe en Tris-HCl (0,1 M, pH=8,5, 1 mM EDTA) con cantidades de biocatalizador inmovilizado (80-120 cP) correspondientes a concentraciones celulares crecientes (5 a 20 mg/ml). En todos los casos se agregaron blancos de reacción con el sustrato únicamente y con el biocatalizador únicamente. La reacción se llevó a cabo en un baño termostático a 35°C durante 1 h. Una vez finalizada la incubación se recuperó el sobrenadante con ayuda de una pipeta Pasteur y se determina el *t*-CA formado por medida de la DO a 290 nm.

### 5.3.2.2. Cinética del biocatalizador inmovilizado

Una vez determinada la concentración óptima del biocatalizador inmovilizado, se llevó a cabo la cinética de reacción para diferentes concentraciones de L-Phe.

Para ello, se incubaron tres concentraciones de L-Phe (1, 5 y 10 mM) en buffer Tris-HCl (0,1 M, pH=8,5, 1 mM EDTA) con el equivalente a 10 mg/ml de células inmovilizadas (80-120 cP). Las muestras se incubaron a 35°C y se tomaron muestras cada 1 h para trazar la cinética de reacción. El *t*-CA formado a partir de la bioconversión de L-Phe, se determinó espectrofotométricamente a 290 nm.

En paralelo, se llevó a cabo la reacción en un biorreactor alternativo (Figura 5.6). El sistema consta de una columna de (17 mm × 120 mm), donde se colocó el biocatalizador inmovilizado a razón de 10 mg/ml de concentración celular equivalente. Luego, una solución de 1 mM de L-Phe en buffer Tris-HCl (0,1 M, pH=8,5, 1 mM EDTA) se hizo recircular mediante una bomba peristáltica a través de la columna a una velocidad de flujo de 1 ml/min. La columna se termostató a 35°C y se tomó muestras a las 2, 4 y 6 h de iniciada la reacción. Las muestras se analizaron midiendo la  $DO_{290}$  y con ello se determinó el *t*-CA formado.



Figura 5.6. Utilización de columna con recirculación para células inmovilizadas.

### 5.3.2.3. Efecto de la temperatura en las células inmovilizadas

Las células catalíticas inmovilizadas, al igual que las células libres en solución, se caracterizaron con respecto al efecto que tiene la temperatura en la actividad PAL. Como ya se explicó en el Capítulo 4, la temperatura afecta de dos maneras al biocatalizador: en su estabilidad y en su reactividad. A continuación se analizarán ambos efectos para las células catalíticas inmovilizadas.

En lo que respecta a la termoestabilidad del biocatalizador inmovilizado, se suspendió una cantidad de biocatalizador equivalente a 10 mg/ml de células en un tubo de ensayo conteniendo buffer Tris-HCl (0,1 M, pH=8,5, 1 mM EDTA) y se incubó a diferentes temperaturas (20-70°C) por el término de 10 min, bajo agitación constante. Una vez finalizado el período de incubación, los tubos se sumergieron instantáneamente en un baño de agua-hielo. Las esferas así tratadas se incubaron luego con 1mM de L-Phe en Tris-HCl (0,1 M, pH=8,5, 1 mM EDTA) a 35°C por el transcurso de 2 h, en un shaker termostatzado a 80 rpm. Transcurrido este tiempo, se determinó la formación de *t*-CA en el sobrenadante mediante la medida de DO<sub>290</sub>.

Por otro lado, la temperatura óptima de reacción para ambos biocatalizadores inmovilizados (80-120 cP y 300-400 cP) se determinó mediante la incubación de 1mM de L-Phe en buffer Tris-HCl (0,1 M, pH=8,5, 1 mM EDTA) con una concentración equivalente a 10 mg/ml de esferas de Alg-Ca, a diferentes temperaturas (20 a 70°C) por el transcurso de 2 h (Figura 5.7). Al finalizar el tiempo de incubación se determinó el *t*-CA formado en el sobrenadante por el método descrito anteriormente.

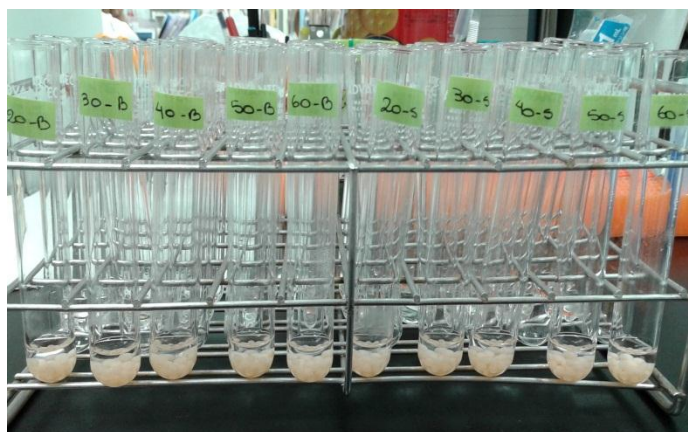


Figura 5.7. Ensayo de temperatura óptima para el biocatalizador inmovilizado.

#### **5.3.2.4. Reutilización de las células catalíticas inmovilizadas**

Finalmente, un requisito esencial para un biocatalizador inmovilizado, es poder reutilizarse en procesos consecutivos.

La capacidad de reutilización del biocatalizador se determinó incubando 1 mM de L-Phe en buffer Tris-HCl (0,1 M, pH=8,5, 1 mM EDTA) con una cantidad de biocatalizador inmovilizado equivalente a 10 mg/ml, a 35°C en shaker a 80 rpm. Transcurridas 2 h de tratamiento, se removió la mezcla de reacción con ayuda de una pipeta Pasteur y se colocó solución fresca con la misma concentración de sustrato por 2 h más. El mismo procedimiento se repitió reiteradamente con las mismas esferas de Alg-Ca. Las muestras obtenidas se analizaron midiendo espectrofotométricamente el *t*-CA formado a 290 nm. La actividad específica relativa (%) se calculó mediante la Ecuación 4.3 (Ver Capítulo 4).

Por otro lado, además de medir la actividad de las muestras, se determinó visualmente la integridad del biocatalizador inmovilizado luego de los sucesivos usos y se confirmó su textura.

#### **5.3.4. Conservación de las células catalíticas inmovilizadas**

Unos de los desafíos de los métodos de inmovilización es el mantenimiento adecuado del biocatalizador inmovilizado para que pueda conservarse en el tiempo, sin pérdida considerable de su actividad enzimática. En el caso de las esferas de Alg-Ca esto resulta ser un desafío, ya que la forma más común de almacenaje es en condiciones de refrigeración, donde las reacciones de deterioro, incluyendo el deterioro microbiano, ocurren a muy baja velocidad.

En vista de este desafío, se diseñó una técnica simple de conservación. Esta se basó en la colocación de las esferas de Alg-Ca (300-400 cP) conteniendo las células catalíticas en placas de Petri con un papel de filtro en el fondo de la placa. Las esferas se dispusieron separadas una de las otras y se llevaron a cuarto estufa, donde se dejaron incubar a 25°C hasta que no se observó disminución del tamaño. En ese momento las placas se cerraron con parafilm y no se abrieron hasta su utilización. La humedad final de las esferas deshidratadas se determinó

mediante peso seco. Para ello previamente se secaron en estufas los pesafiltros hasta peso constante. Seguidamente se colocó un peso definido de bolitas en todos los frascos y se los secó a 100°C hasta peso constante. A partir del peso seco  $m_s$ , la humedad en base húmeda del biocatalizador se calculó de la siguiente manera:

$$H_{bh} (\%) = \frac{m_w}{m_w + m_s} * 100 \quad (5.2)$$

Donde  $H_{bh}$  es la humedad en base húmeda y  $m_w$  es la masa de agua.

Para comprobar la eficiencia del método, las esferas de Alg-Ca deshidratadas se rehidrataron a temperatura ambiente hasta recuperar su tamaño original y se les determinó la actividad PAL. Luego, se contrastó dicha actividad con la obtenida a partir células inmovilizadas del mismo batch que nunca fueron deshidratadas y con células inmovilizadas frescas. Para ello, se incubaron los biocatalizadores a una concentración equivalente a 7 mg/ml de células catalíticas, con una solución de L-Phe de 1 mM en buffer Tris-HCl (0,1 M, pH=8,5, 1 mM EDTA) a 50°C por 2 h. Finalmente se repitió el procedimiento anteriormente descrito con las esferas de Alg-Ca deshidratadas y almacenadas durante 2 años a temperatura ambiente, para determinar si la metodología fue eficiente en la conservación del biocatalizador.

### **5.3.5 Inmovilización de PAL pura por inclusión en membrana**

Ya se ha hecho énfasis anteriormente en la necesidad de la obtención de un biocatalizador de bajo costo, teniendo presente los fines específicos de este trabajo. Si bien la metodología de recuperación y permeabilización de células resultó muy prometedora, dependerá del soporte elegido para la inmovilización, la eficiencia global del proceso.

Para contrastar la metodología descrita hasta el momento, la enzima pura obtenida a partir del protocolo del Prof. Adachi (Ver Capítulo 4), se inmovilizó por inclusión en membrana.

Previo a la inmovilización, PAL pura liofilizada se reconstituyó en buffer Tris-HCl (0,1 M, pH=8,5, 1 mM EDTA), a razón de 128 mg/ml. Luego, la enzima fue inmovilizada en tubos de diálisis constituidos por membranas de celulosa (Viskase Corp., UC 8-32-25) con un espesor de 0,0508 mm. La enzima incluida

dentro de la membrana semipermeable se mantuvo en condiciones de refrigeración en buffer hasta su utilización.

### 5.3.6. Utilización de PAL pura inmovilizada

En esta sección se llevará a cabo la biotransformación de PAL inmovilizada en un biorreactor de columna con recirculación y en un tanque agitado, a fin de poder contrastarla con la metodología propuesta al inicio de este capítulo.

#### 5.3.6.1. Bioconversión en columna con recirculación

Para llevar a cabo el proceso, la membrana conteniendo la enzima pura fue colocada en un reactor columna (17 mm × 120 mm) con una solución de 1 mM de L-Phe en buffer Tris-HCl (0,1 M, pH=8,5, 5 mM 2NaEDTA). Se emplearon para este fin 100 µl de la enzima pura (2 U totales). La solución conteniendo el sustrato (30 ml) fue recirculada mediante una bomba peristáltica (Perista, Atto, Tokyo) con un flujo de 1,3 ml/min (Figura 5.8).

La reacción se siguió espectrofotométricamente ( $DO_{290}$ ) y se correlacionó la cinética de producción de *t*-CA con la reducción del contenido de L-Phe, ya que la reacción es mol a mol.



Figura 5.8. PAL pura inmovilizada en columna con recirculación.

### 5.3.6.2. Bioconversión en tanque agitado

Para la bioconversión en tanque agitado, la enzima pura inmovilizada en membrana fue colocada en un recipiente (50-100 ml de capacidad) con agitación magnética en contacto con la mezcla de reacción.

Para este sistema se estudiaron dos variables. Por un lado, se evaluó la influencia del espesor de la membrana, el cual podría tener influencia en la velocidad de difusión. Para ello, se emplearon dos membranas con diferente espesor: UC 8-32-25 (0,0508 mm de espesor) y UC 20-32-100 (0,0203 mm de espesor). Luego, un volumen de 100  $\mu$ L (2U totales) de PAL fue incluido en cada membrana y se colocaron en 10 mL de mezcla de reacción consistente en una solución de 0,1 mM L-Phe en buffer Tris-HCl (0,1 M, pH=8,5, 5 mM EDTA). La biotransformación se llevó a cabo a 30°C y se tomó muestra cada 20 min para registrar la cinética. La cuantificación del *t*-CA formado se llevó a cabo mediante la determinación de DO a 290 nm. Debido a que la *t*-CA tiene una relación mol a mol con la L-Phe, se puede trazar la cinética de eliminación de L-Phe.

Otra variable estudiada en este sistema fue la cantidad de enzima inmovilizada en la membrana. Con esto se desea determinar si se puede hallar una mejora del proceso mediante el aumento de la cantidad de biocatalizador. Con este fin se colocaron volúmenes de PAL diferentes para alcanzar concentraciones dentro de la membrana expresadas en actividad total de 2 U y 6 U. Las membranas (0,0203 mm de espesor), conteniendo la enzima, se incubaron en 10 ml de una solución 0,1 mM de L-Phe en buffer Tris-HCl (0,1 M, pH=8,5, 5 mM EDTA), a 25°C. Se tomaron muestras periódicamente y se analizaron midiendo DO<sub>290</sub>, de la misma forma descripta anteriormente.

## 5.4. Resultados y Discusión

### 5.4.1. Células catalíticas inmovilizadas en Alg-Ca

Las células catalíticas se inmovilizaron en esferas de Alg-Ca debido a su simplicidad de preparación, bajo costo, seguridad alimenticia, flexibilidad, disponibilidad comercial, etc. En esta sección evaluaremos algunos de los parámetros más importantes a tener en cuenta, a la hora de determinar si el biocatalizador inmovilizado es apto para su aplicación. Adicionalmente, se describirá el uso de la enzima pura inmovilizada como alternativa y se contrastará con el método propuesto.

#### 5.4.1.1. Características del biocatalizador obtenido

Una vez obtenido el biocatalizador inmovilizado a partir de los dos alginatos de sodio de diferente viscosidad (80-120 cP y 300-400 cP), se caracterizaron respecto al tamaño de las esferas obtenidas y al peso de las esferas. Adicionalmente, se determinó la actividad relativa de las esferas de alginato, respecto a la suspensión celular libre de la cual provienen.

Tabla 5.1. Características del biocatalizador obtenido.

<i>Identificación</i>	<i><math>\phi</math> (mm)</i>	<i>Peso (mg)</i>	<i>AER (%)</i>
Alg-Ca 80-120 cP	2,2	6,57	62
Alg-Ca 300-400 cP	2,0	5,62	72

A partir de la Tabla 5.1 podemos concluir que el Alg-Ca de mayor viscosidad no sólo logró obtener esferas de menor tamaño sino que las mismas tienen una actividad relativa mayor. El gel obtenido adicionalmente tiene mayor consistencia y resistencia mecánica. El hecho que tengan mayor actividad relativa puede deberse en principio al menor tamaño de las esferas lo que les confiere mayor superficie específica por unidad de biocatalizador. Si bien se asumía que una elevada viscosidad del polímero podía resultar en un mayor impedimento al flujo de sustratos y productos al interior de la esfera, esto no se evidenció.

#### 5.4.1.2. Efecto de la concentración del biocatalizador inmovilizado

Para determinar el efecto de la concentración del biocatalizador en la bioconversión de L-Phe, se evaluaron cantidades crecientes del biocatalizador equivalentes a concentraciones de 5 a 20 mg/ml de células catalíticas.

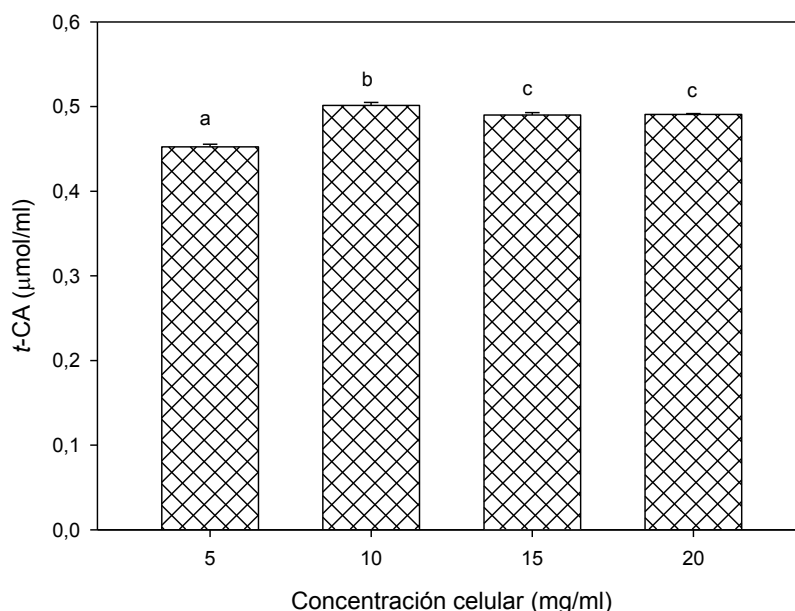


Figura 5.9. Efecto de la cantidad de biocatalizador inmovilizado.

Sustrato: 1 mM de L-Phe en buffer Tris-HCl (0,1 M, pH=8,5, 1 mM EDTA), temperatura de reacción: 35°C y tiempo de reacción: 1 h.

Letras distintas indican diferencia significativa según Test de Tukey ( $p < 0,01$ ).

En la Figura 5.9 podemos ver que el incremento en la cantidad de biocatalizador no confiere mejoras significativas al sistema. Esto podría indicar que existen otros parámetros que están gobernando el sistema.

Por otro lado, si observamos la Figura 5.9 podemos ver que hay un incremento hasta los 10 mg/ml de concentración celular equivalente y luego decae a partir de allí. Este comportamiento ya lo habíamos observado previamente en sistemas en donde el incremento de esferas por ml de mezcla de reacción produce el empaquetamiento de las mismas.

Considerando estos aspectos, se decidió trabajar en el futuro con una cantidad de biocatalizador inmovilizado equivalente a 10 mg/ml de células catalíticas. Esta concentración representa el doble de la cantidad de biocatalizador empleado cuando las células catalíticas se encontraban libres en solución.

### 5.4.1.3. Cinética del biocatalizador inmovilizado

Se llevaron a cabo las cinéticas de reacción empleando el biocatalizador inmovilizado en concentraciones equivalentes a 10 mg/ml de células catalíticas, con soluciones de L-Phe de 1, 5 y 10 mM. Las cinéticas correspondientes, se muestra a continuación:

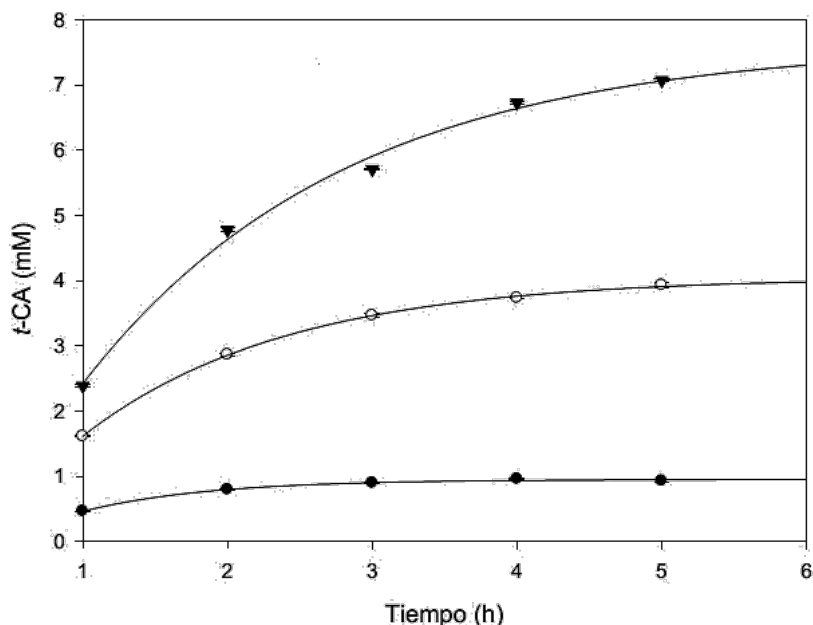


Figura 5.10. Cinética de reacción empleando el biocatalizador inmovilizado.

Concentración de L-Phe: 1 mM (●), 5 mM (○) y 10 mM (▼).

A partir del análisis de la Figura 5.10 se puede observar que el biocatalizador fue eficiente en la reducción completa de una solución 1 mM de L-Phe en 3 h de reacción. En el caso de la mezcla de reacción conteniendo 5 mM de L-Phe, luego de transcurridas 5 h de reacción se redujo aproximadamente el 80% de la totalidad de L-Phe. Sin embargo, la cinética se vuelve asintótica a partir de este punto. En el caso de la solución 10 mM, la reducción fue de casi el 70%, luego de 5 h de reacción e igualmente que en el caso anterior, la curva se vuelve asintótica.

En el ensayo análogo con las células catalíticas libres en solución (Ver Capítulo 4) se observaba un comportamiento similar aun cuando la cinética era más lineal. En el caso de las células catalíticas libres se llegó a la conclusión de que la reducción parcial, en concentraciones mayores a 1 mM, se debía a limitaciones en la concentración del biocatalizador. En este caso, las conversiones alcanzadas fueron mucho más grandes, pero el sistema se satura antes de alcanzar

la conversión total. Podemos suponer que en este caso la cantidad de biocatalizador no es una limitante, sino que más bien, existen limitaciones de otra índole (probablemente difusionales), que están limitando la velocidad de reacción.

Paralelamente, se llevó a cabo el ensayo en columna con recirculación. Para ello se colocó dentro de la columna una cantidad de biocatalizador equivalente a 10 mg/ml de células catalíticas en contacto con una solución 1 mM de L-Phe, la cual fue recirculada a una velocidad de 1 ml/min. Se tomaron muestras a las 2, 4 y 6 h de iniciada la reacción. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 5.11.

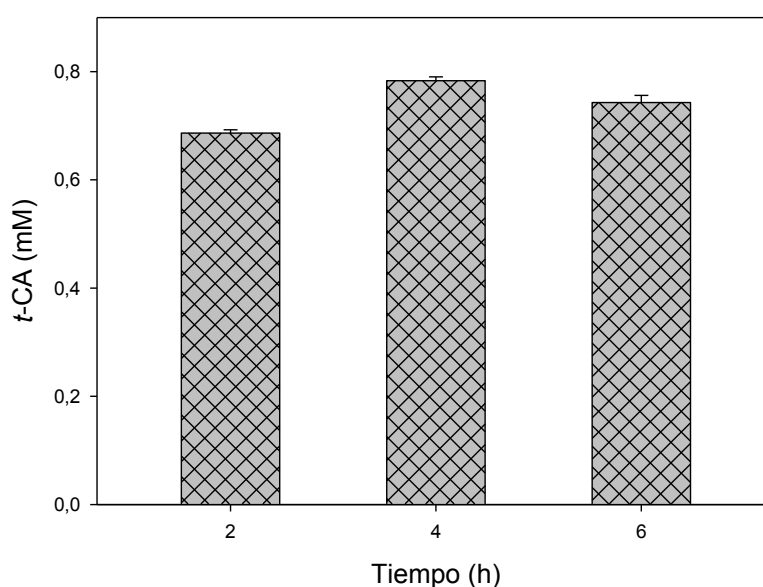


Figura 5.11. Bioconversión en columna empleando el biocatalizador inmovilizado.

Como podemos ver en la Figura 5.11, la bioconversión en columna, a diferencia del sistema anterior, no logró la bioconversión total luego de 6 h de tratamiento. Luego de las 4 h de reacción no se observan cambios, obteniéndose una conversión máxima del 80%. Debido a que tanto las concentraciones de L-Phe como la del biocatalizador inmovilizados fueron las mismas en ambos casos, se asume que las diferencias observadas en el biorreactor columna se deben a otro tipo de limitaciones, probablemente difusionales.

En resumen, se pudo lograr la conversión completa de una solución 1 mM de L-Phe en 3 h de reacción en tubos de ensayo. Estos resultados son muy prometedores en vista de su aplicación futura. Sin embargo, cuando se replicaron las mismas condiciones en una columna con recirculación, no se obtuvieron los

mismos resultados debido a que entraron en juego otras variables del sistema. Algo similar ocurre con concentraciones más elevadas de sustrato en sistema batch sin agitación. Se ha atribuido estos inconvenientes a posibles limitaciones de otra naturaleza, probablemente difusionales.

#### 5.4.1.4. Efecto de la temperatura en las células inmovilizadas

El efecto de la temperatura en la estabilidad y la reactividad del biocatalizador inmovilizado se determinó en condiciones análogas a las células catalíticas libres.

En lo que respecta a la estabilidad del biocatalizador inmovilizado, las esferas de Alg-Ca se trataron a diferentes temperaturas (20-70°C) durante 10 min. Finalizado el tratamiento, se incubaron con la mezcla de reacción conteniendo 1 mM de L-Phe, de la forma descrita en la sección metodológica. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 5.12.

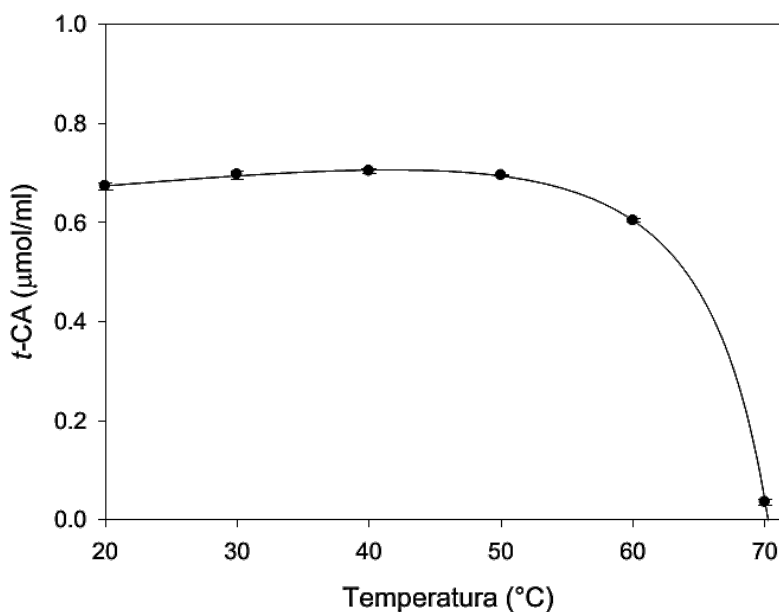


Figura 5.12. Termoestabilidad del biocatalizador inmovilizado.

Biocatalizador inmovilizado: 10 mg/ml y sustrato: 1 mM L-Phe, en Tris-HCl (0,1 M, pH=8,5, 1 mM EDTA). Incubación: 35°C, 80 rpm por 2 h.

El biocatalizador inmovilizado resultó estable hasta temperaturas cercanas a los 60°C, luego de lo cual la actividad cae abruptamente. La inactivación completa del biocatalizador ocurre cuando el mismo se expone a una temperatura de 70°C por 10 min. Si comparamos el patrón obtenido con el de las células libres

(Ver Capítulo 4), podemos observar que, a diferencia de las células catalíticas libres donde la actividad comienza a disminuir lentamente con el aumento de la temperatura hasta los 60°C, en este caso la actividad se mantuvo constante hasta los 50°C. Este comportamiento deja en evidencia que la técnica de inmovilización empleada confiere estabilidad a las células catalíticas, frente a la temperatura.

Por otro lado, en lo que concierne a la temperatura óptima, las células inmovilizadas se incubaron a diferentes temperaturas (20 a 70°C) por 2 h con una solución 1 mM de L-Phe. En este ensayo se evaluaron además los biocatalizadores obtenidos a partir de los dos alginatos (80-120 cP y 300-400 cP). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 5.13.

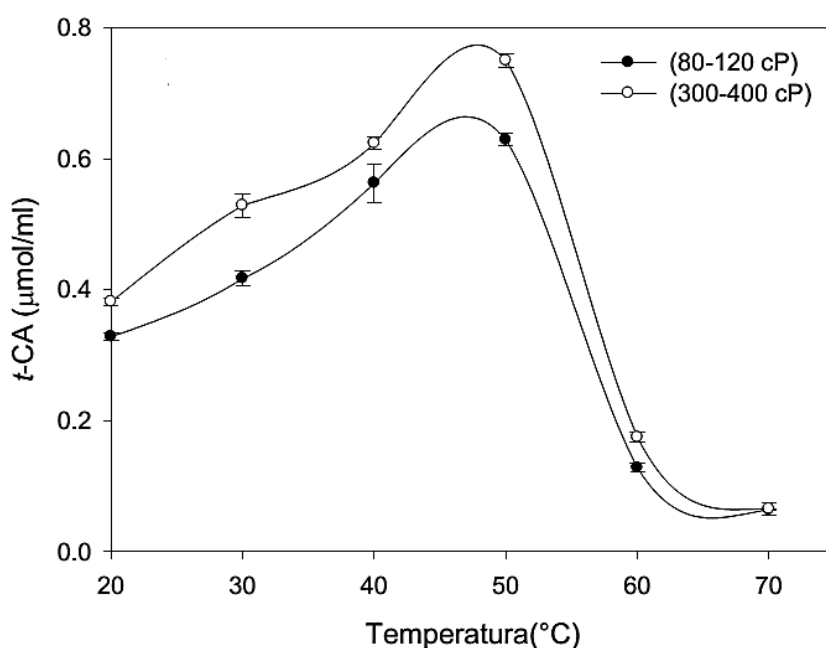


Figura 5.13. Temperatura óptima del biocatalizador inmovilizado.

Biocatalizador inmovilizado: 10 mg/ml y sustrato: 1 mM L-Phe, en Tris-HCl (0,1 M, pH=8,5, 1 mM EDTA). Incubación: 2 h.

En la Figura 5.13 puede observarse que el biocatalizador inmovilizado en ambos alginatos tiene una temperatura óptima cercana a los 50°C. Estos patrones de temperatura coinciden con el obtenido para células catalíticas libres (Ver Capítulo 4). Esto implica que si bien la inmovilización logró estabilizar el biocatalizador frente a la temperatura en tiempos cortos de exposición, dicho efecto no se traduce en la temperatura óptima de reacción.

Por otro lado, el aumento de temperatura desde 20 a 50°C, incrementa considerablemente la actividad. Esto resulta muy ventajoso para el sistema, ya que

se puede lograr mejoras considerables de la reacción, únicamente aumentando la temperatura. Esto no ocurría con la enzima purificada (Ver Capítulo 4), donde el aumento de 30°C no aportaba mejoras significativas en el sistema.

Otra observación importante al respecto es que las esferas sometidas a tratamiento a 50°C en condiciones de agitación (80 rpm) no sufrieron daños aparentes en su estructura durante el proceso.

Por último, es importante tener en cuenta de que si bien ambos tipos de alginatos tienen el mismo patrón global de temperatura, en el caso del alginato más viscoso (300-400 cP) la actividad alcanzada fue mayor. Esto concuerda con los datos de AER obtenidos en la caracterización del biocatalizador (Tabla 5.1).

#### 5.4.1.5. Reutilización de las células catalíticas inmovilizadas

Las células catalíticas inmovilizadas se reutilizaron sucesivamente para determinar cuántos usos efectivos se le puede dar al biocatalizador, sin que pierda actividad. Para ello se incubó el biocatalizador con 1 mM de L-Phe durante 2 h, se extrajo la solución tratada y se reemplazó por una mezcla de reacción fresca. Este último protocolo se repitió reiteradamente.

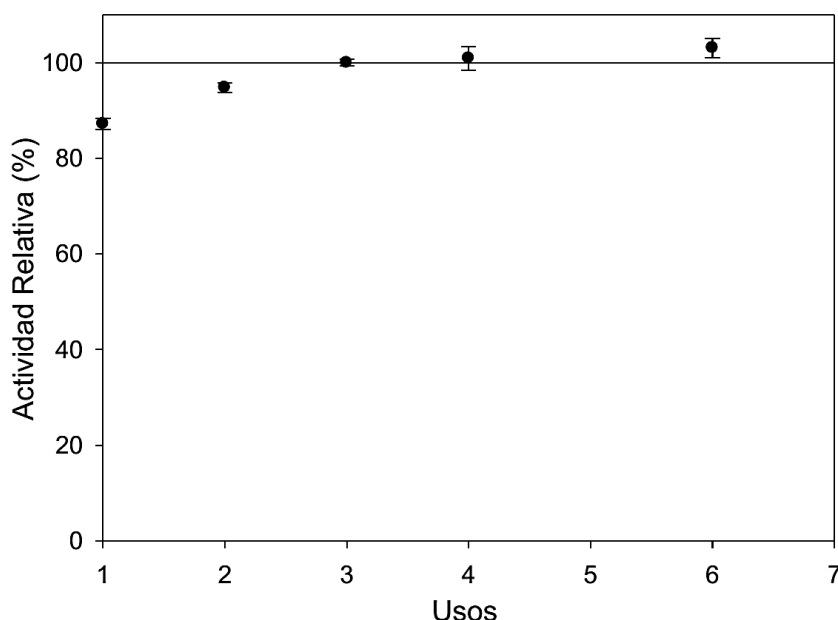


Figura 5.14. Reutilización del biocatalizador.

En la Figura 5.14 podemos ver que la actividad PAL se mantuvo alrededor de su valor máximo en los sucesivos usos, con lo cual se puede concluir que no

hubo pérdida de actividad debido al uso reiterado del biocatalizador. El primer uso del biocatalizador se halla por debajo del resto. Esto probablemente se deba a la retención de L-Phe y *t*-CA por absorción dentro de la esfera de alginato. En consecuencia, esto podría ocasionar la reducción de *t*-CA en la mezcla de reacción, y por ende, la actividad medida es más baja que la real. Además esto explicaría por qué este efecto no se evidencia tan marcadamente en los usos posteriores.

Por otro lado, el uso número cinco correspondió a un ensayo de toda la noche, por lo cual no se pudo incluir en la tabla, ya que su actividad no se podía comparar al resto. Con el uso n°5 intentamos demostrar que la enzima puede actuar en largos períodos de reacción y aun así mantener actividad, lo que se puede comprobar en el uso n°6. A partir del sexto uso, sin embargo, se pudo notar la presencia de material adherido a las paredes del tubo, lo cual indicaría una cierta degradación de las esferas (Figura 5.15).



Figura 5.15. Degradación del biocatalizador del sexto uso .

Cuando se sometieron las esferas a esfuerzo de compresión, las mismas se deshicieron. Aun así se midió nuevamente su actividad y seguía siendo del 100%. Esto implica que la limitación del uso del biocatalizador no está en su actividad sino que está ligada directamente a su estabilidad mecánica, la cual se ve afectada en períodos muy largos de reacción (~18-20 h). Esta última observación se debe tener en cuenta a la hora de diseñar el proceso de bioconversión.

Sin embargo, no se requeriría en principio períodos tan largos de incubación, ya que, como se demostró anteriormente, se puede alcanzar la bioconversión completa de una solución 1 mM de L-Phe en 3 h de reacción.

#### 5.4.1.6. Conservación de las células catalíticas inmovilizadas

Las células catalíticas se deshidrataron a 25°C para determinar si es un método factible de conservación de las mismas. El objetivo final de este método es lograr almacenarlas por largos períodos de tiempo, a temperatura ambiente. Las esferas dentro de las placas tardaron 48 h en deshidratarse completamente. Durante este tiempo se controlaron visualmente, hasta que no se percibió variación de tamaño.

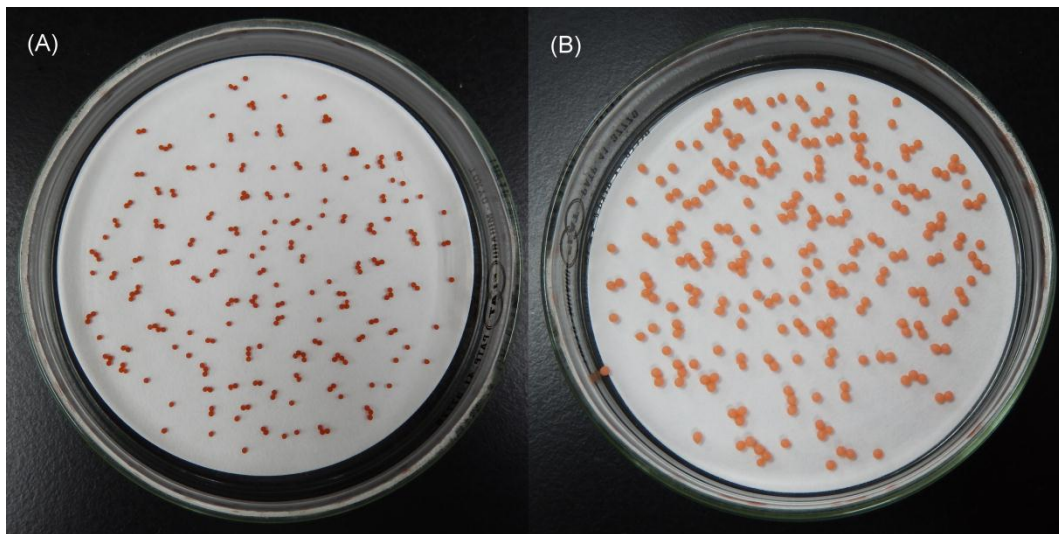


Figura 5.16. Deshidratación del biocatalizador inmovilizado.

(A) Biocatalizador deshidratado, (B) Biocatalizador sin deshidratar.

Como puede apreciarse en la Figura 5.16 hay una reducción considerable del tamaño del biocatalizador. Sin embargo, debido a que la deshidratación fue lenta, las esferas conservan su integridad.

Al biocatalizador inmovilizado se le determinó la humedad mediante peso seco, resultando ser del 87%. A esta humedad, gran parte de las reacciones de deterioro ocurren más lentamente.

Por otro lado, para la rehidratación del biocatalizador, se colocaron las esferas deshidratadas en buffer Tris-HCl (0,1 M, pH=8,5, 1 mM EDTA) y se dejaron agitando a temperatura ambiente hasta que no se evidencian cambios de volumen (Figura 5.17). Una alternativa es la rehidratación en condiciones de refrigeración durante toda la noche.



Figura 5.17. Biocatalizador inmovilizado rehidratado.

Seguidamente, se determinó la actividad del biocatalizador rehidratado (BID), del biocatalizador sin deshidratar, perteneciente al mismo batch y con 3 días de almacenamiento (BI3), de las células inmovilizadas frescas (BI0) y del biocatalizador deshidratado y almacenado a temperatura ambiente, durante 2 años (BID2). Los resultados obtenidos se expresan como actividad enzimática relativa.

Tabla 5.2. Actividad relativa el biocatalizador deshidratado.

<i>Biocatalizador</i>	<i>AE relativa (%)</i>
BI0	100
BI3	94
BID	97
BID2	58

Si observamos la Tabla 5.2, podemos ver que, tomando como referencia las células catalíticas inmovilizadas recién preparadas (BI0), el biocatalizador deshidratado, rehidratado y almacenado durante 3 días a temperatura ambiente (BID) mantiene el 97% de la actividad original, valor superior al observado para las células inmovilizadas del mismo batch, las cuales se mantuvieron en condiciones de refrigeración (BI3). Un resultado aún más significativo es el obtenido a partir de las células inmovilizadas deshidratadas y mantenidas a temperatura ambiente por más de 2 años (BID2). Éstas mantienen el 58% de la actividad original del biocatalizador sin deshidratar y el 60% de la actividad del biocatalizador deshidratado original. Adicionalmente, el biocatalizador

deshidratado y almacenado por 2 años, mantiene su forma y textura original una vez rehidratado y no presenta signos de contaminación microbiana.

La técnica de conservación diseñada para el biocatalizador inmovilizado es una técnica económica, simple y eficiente para el mantenimiento activo del biocatalizador a temperatura ambiente, por largos períodos de tiempo. Para el escalado de esta técnica debe pensarse por ejemplo en el diseño de túneles de secado a baja temperatura o bien alguna tecnología de lecho fluidizado.

En resumen, a partir de la caracterización de las células catalíticas inmovilizadas en Alg-Ca, se pusieron en manifiesto algunas propiedades que son de interés para el proceso propuesto:

- El biocatalizador inmovilizado tienen el equivalente de hasta el 70% de la actividad respecto al catalizador libre.
- No requiere cargas celulares muy elevadas para alcanzar la bioconversión total de soluciones 1 mM de L-Phe en 3 h.
- Es estable hasta los 60°C en tiempos cortos de exposición.
- Tiene una temperatura óptima de 50°C, pudiendo lograr amplias ventajas respecto a las temperaturas normales de trabajo.
- Puede reutilizarse reiteradamente sin perder actividad, siempre y cuando no se afecte su estructura exponiéndolo a esfuerzos mecánicos por largos períodos de incubación.
- Puede deshidratarse mediante una técnica simple y económica hasta un 87% de humedad y almacenarse a temperatura ambiente por largos períodos de tiempo, manteniéndose activo.

Sin embargo, se han observado algunos inconvenientes, por ejemplo, problemas difusivos en cuanto a su empleo en columna. Los mejores resultados se obtuvieron en sistema batch con agitación.

Si bien esta metodología tiene muchos puntos a favor para su posterior empleo en la reducción de L-Phe en hidrolizados proteicos, se contrastará con la enzima pura inmovilizada por retención en membrana, para determinar si puede obtenerse mejores resultados que con el biocatalizador inmovilizado obtenido.

## 5.4.2. Enzima pura inmovilizada por inclusión en membrana

### 5.4.2.1. Bioconversión en columna con recirculación

La enzima pura se inmovilizó por inclusión en membranas y se empleó en un biorreactor de columna con recirculación. La solución a tratar contenía 1 mM de L-Phe y se emplearon para estos fines 100  $\mu$ l de la enzima, la cual contiene 2U totales.

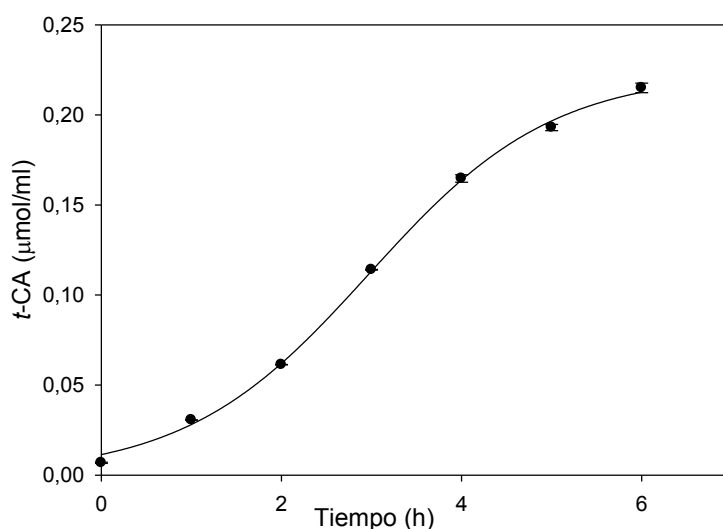


Figura 5.18. Cinética de reacción con PAL pura inmovilizada en columna.

Del análisis de la cinética de reacción en la columna (Figura 5.18) podemos ver que existe un retardo al principio de la reacción. Luego de ese retardo la producción de t-CA comienza a aumentar linealmente, pero transcurridas las 4 h de iniciada la reacción la velocidad de reacción comienza a decrecer.

Mediante la determinación de la cantidad de producto en la muestra, podemos calcular la cantidad de sustrato remanente en la muestra (Ecuación 5.3).

$$L - Phe (\%) = \frac{\left( C_{Phe} - \frac{\Delta D_{0,290}}{\varepsilon} \right)}{C_{Phe}} * 100 \quad (5.3)$$

A continuación se muestran los resultados de la reducción de L-Phe en columna (Figura 5.19).

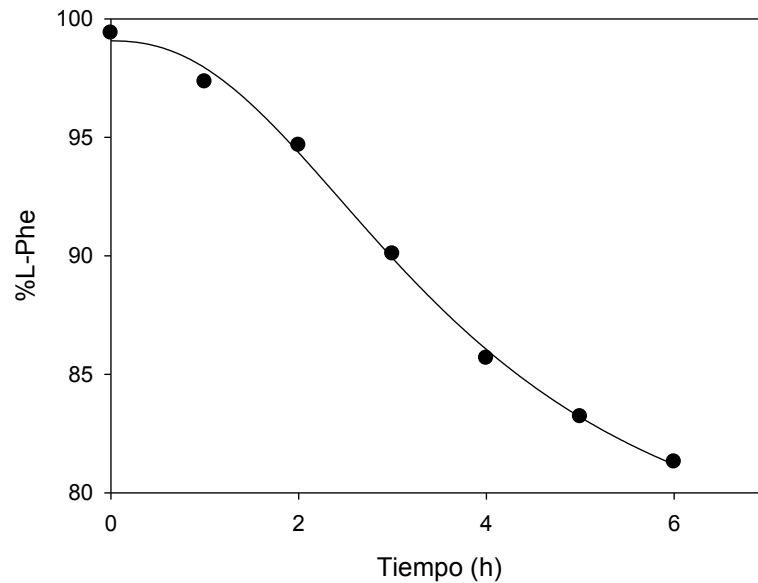


Figura 5.19. Reducción de L-Phe con PAL inmovilizada en columna.

Luego de 6 h de reacción sólo el 20% de la L-Phe inicial fue eliminada de la mezcla de reacción. En este gráfico, al igual que en el anterior, se puede observar un retardo al principio de reacción y el desaceleramiento al final. En el caso hipotético que la reacción hubiese transcurrido a velocidad inicial, la enzima colocada en la membrana debería producir la completa biotransformación de toda la L-Phe contenida en la mezcla de reacción en aproximadamente 15 min. Los tiempos se incrementan en estos casos porque la velocidad disminuye en el transcurso de la reacción y adicionalmente estamos incorporando una barrera de difusión hacia la enzima, que es la membrana en la cual está contenida. Aun cuando el tiempo de reacción fue mucho más elevado que el teórico, el 80% de la L-Phe permaneció en la mezcla. El incremento en el tiempo de reacción no es una opción en este caso particular, ya que se trata de uno de los parámetros que se desea optimizar. Adicionalmente, como puede apreciarse en la Figura 5.18 y 5.19, la velocidad de reacción decrece entre las 4 y 6 h de reacción, con lo cual el incremento de tiempo no se traducirá en mejoras considerables.

A partir de estos resultados podemos inferir que existen factores independientes a la enzima que están ocasionando una reducción de la velocidad de reacción. Estos factores pueden tratarse de barreras difusionales tanto externas como internas. Desde el punto de vista de las barreras externas de difusión, es probable que la agitación del sistema no sea suficiente para asegurar la correcta

difusión del soluto a través de la membrana. La agitación en la columna está restringida al goteo de la mezcla de reacción, con lo cual ésta es una mejora que puede incorporarse al sistema. Por otro lado, y en cuanto a la difusión interna, la membrana constituye por sí misma una barrera a la libre difusión. En este sentido, puede optarse por emplear una membrana de menor espesor y determinar si tiene un efecto significativo en la velocidad de reacción. En general, el sistema en columna, no logró resultados satisfactorios.

#### 5.4.2.2. Bioconversión en tanque agitado

Para estudiar los problemas observados en el sistema continuo se simuló un sistema en tanque agitado mediante la incorporación de membranas en la mezcla de reacción contenida en un vaso de precipitado con agitación magnética. La concentración de L-Phe en la muestra se disminuyó 10 veces para facilitar la bioconversión en un menor tiempo. Para mejorar el sistema se estudiaron dos variables: el espesor de la membrana y la cantidad de enzima incluida en la misma.

En lo que respecta a la primera variable, se evaluaron dos membranas de diferente espesor (0,0508 mm y 0,0203 mm). Los resultados de la cinética obtenida, se muestran a continuación:

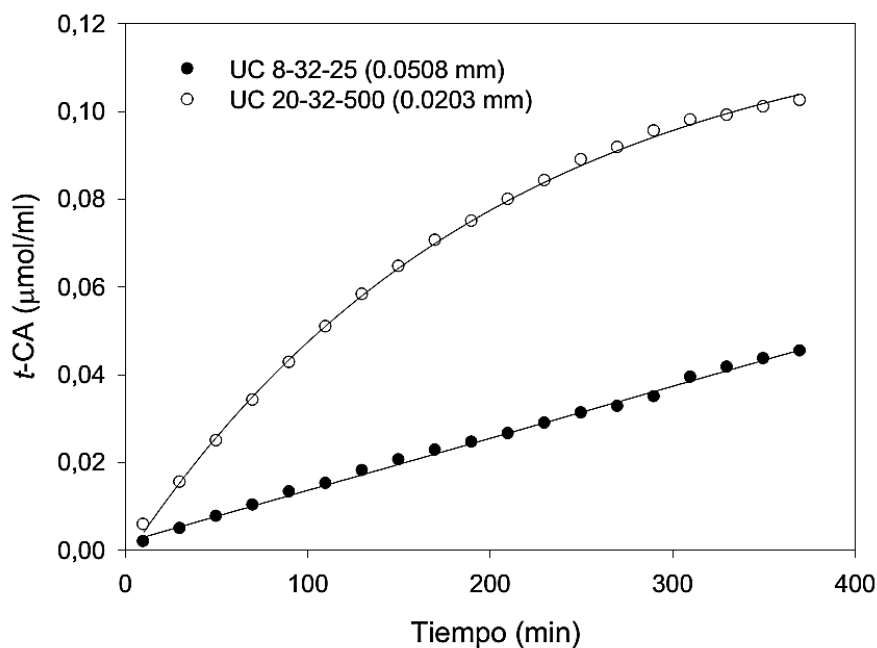


Figura 5.20. Cinética de reacción con PAL pura inmovilizada en tanque agitado.

PAL inmovilizada: 2U y sustrato: 10 ml de 0,1 mM L-Phe, en Tris-HCl (0,1 M, pH=8,5, 5 mM EDTA). Incubación: 30°C.

Como puede verse en la Figura 5.20, la cinética de reacción para la membrana que se utilizó desde un principio es, en esta oportunidad, lineal. Esta mejora respecto a la cinética en columna (Figura 5.18) se atribuye a la agitación del sistema, la cual probablemente disminuyó el espesor de la película estanca alrededor de la membrana y, con ello, la resistencia de difusión externa.

En lo que respecta al espesor de la membrana, se observa que al emplear una membrana de menor espesor, la velocidad inicial de reacción aumenta considerablemente. Luego de unas horas, esta velocidad se desacelera debido a la disminución de las concentraciones de L-Phe en la mezcla de reacción. La reducción total de L-Phe para ambos sistemas, se presenta en la Figura 5.21.

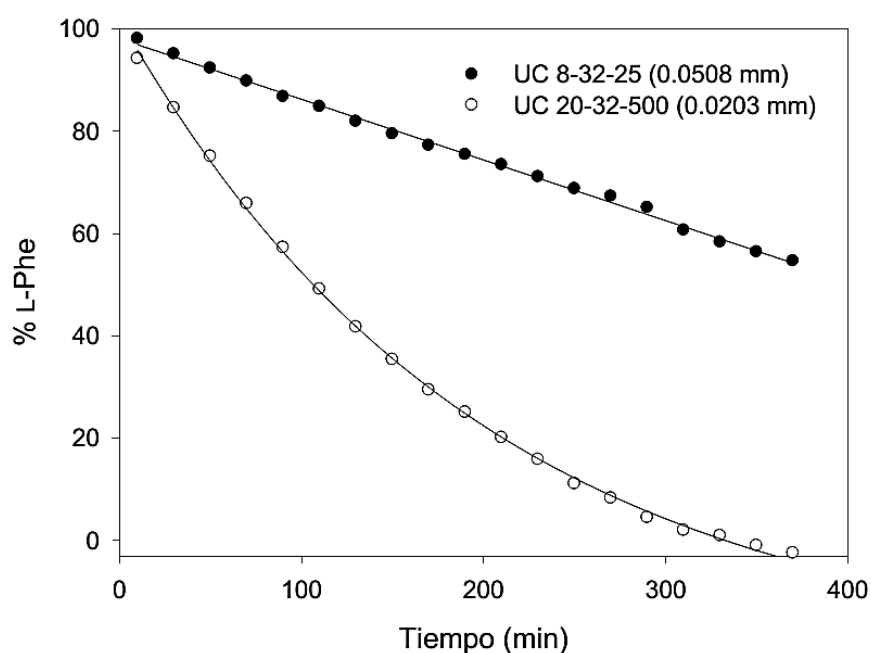


Figura 5.21. Reducción de L-Phe con PAL inmovilizada en tanque agitado.

A partir de la reducción del espesor de la membrana, se lograron mejoras significativas. En el caso de la membrana original (0,0508 mm de espesor), se pudo reducir alrededor del 46% del valor original de L-Phe, tras 6 h de reacción. Debido a que la cinética es lineal, esta reducción puede ser mayor. Por otro lado, con la membrana de menor espesor se logró la reducción del 100% del contenido de L-Phe en un poco más de 5 h. La mejora alcanzada es la prueba del efecto del espesor de la membrana como barrera de difusión interna.

Por otro lado, se determinó la influencia de la concentración de enzima en la velocidad de reacción, aumentando en 3 veces la cantidad original de enzima

incluida en la membrana. En la Figura 5.22 pueden observarse los resultados obtenidos.

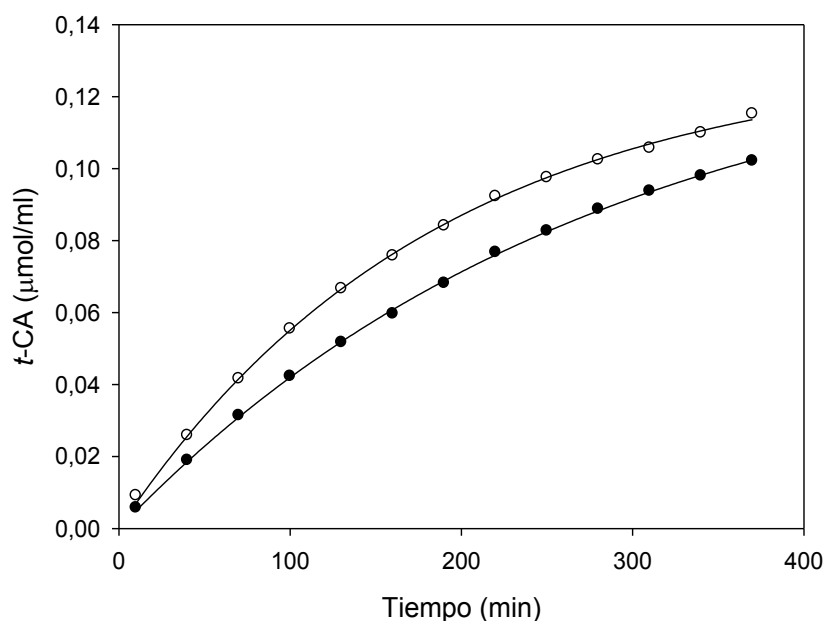


Figura 5.22. Efecto de la cantidad de enzima en la cinética de PAL inmovilizada.

PAL inmovilizada: 2U (●) y 6U (○) y sustrato: 10 ml de 0,1 mM L-Phe, en Tris-HCl (0,1 M, pH=8,5, 5 mM EDTA). Incubación: 25°C.

El incremento de 3 veces en la cantidad de PAL incluida en la membrana, no logró mejoras substanciales en la cinética de PAL inmovilizada.

En conclusión, la enzima pura inmovilizada por inclusión es un método factible para la reducción de soluciones diluidas de L-Phe, del orden de 0,1 mM. Las barreras difusionales externas se pudieron reducir mediante el uso del tanque agitado. Se presume que dicha mejora se debe al incremento en la agitación. Finalmente, en lo que respecta a la barrera de difusión interna, la cinética de PAL se incrementó notablemente reduciendo, a más de la mitad, el espesor de la membrana. Una vez que se disminuyeron los problemas difusivos, se encontró que el incremento en 3 veces de la concentración de PAL, no logró mejoras substanciales.

Si bien este es un sistema factible de utilizar para la reducción de L-Phe, no presenta ventajas significativas respecto a las células catalíticas inmovilizadas. Por el contrario, la obtención y purificación total de la enzima es un proceso muy costoso, con lo cual este método se descarta totalmente para su aplicación en hidrolizados proteicos.

# Parte IV

## *Aplicación del biocatalizador*



# Capítulo 6

## Empleo de PAL en la reducción de L-Phe en hidrolizados proteicos

---

### 6.1. Objetivos

Los objetivos del presente capítulo son:

- Optimizar las condiciones de reacción de PAL soluble parcialmente purificada, empleando hidrolizados proteicos como sustratos.
- Determinar la factibilidad de uso de la enzima parcialmente purificada, en la reducción de L-Phe en hidrolizados proteicos tipos, como alternativa a las células catalíticas inmovilizadas.
- Evaluar la eficiencia de las células catalíticas inmovilizadas en la reducción de L-Phe en hidrolizados proteicos tipos.

### 6.2. Fundamentos

#### 6.2.1. Hidrolizados proteicos: generalidades

Los hidrolizados proteicos son los productos obtenidos por hidrólisis de proteínas, ya sea por método ácido, alcalino o enzimático [123]. La hidrólisis da lugar a una mezcla variable de péptidos y aminoácidos libres. Adicionalmente, los hidrolizados pueden contener otros componentes (minerales, carbohidratos, lípidos, etc), dependiendo de la procedencia de la fuente proteica.

El proceso de hidrólisis puede producir una amplia gama de productos, desde una mezcla de oligopéptidos de elevado peso molecular, hasta una mezcla de aminoácidos libres, dependiendo de las condiciones de hidrólisis [124]. Un parámetro que permite caracterizar a los hidrolizados proteicos es el grado de hidrólisis (DH), el cual se define como el número de enlaces peptídicos hidrolizados, sobre el número total de enlaces peptídicos (Ecuación 6.1).

$$DH (\%) = \frac{n^{\circ} \text{ enlaces peptídicos hidrolizados}}{n^{\circ} \text{ enlaces peptídicos totales}} * 100 \quad (6.1)$$

El n° de enlaces peptídicos hidrolizados se calcula a partir de la determinación del nitrógeno amínico (AN) y del nitrógeno total (TN) [123]. El AN, se puede determinar por titulación con formol, por el método OPA, o por el método del ácido trinitrobenceno sulfónico. El nitrógeno total, por su parte, se determina usualmente por Kjeldahl.

Dependiendo del grado de hidrólisis, los hidrolizados proteicos tienen diferentes propiedades fisicoquímicas y biológicas. En general, podemos hacer una clasificación basados en el grado de hidrólisis, de la siguiente manera [124]:

- Hidrolizados de primera generación: tienen un DH > 70% y los péptidos en general tienen entre 7 u 8 residuos.
- Hidrolizados de segunda generación: tienen un DH entre 40% y 60%, y los péptidos en general tienen hasta 12 residuos.
- Hidrolizados de tercera generación: tienen un DH de hasta el 20% y los péptidos en general tienen una media de 15 residuos.

### **6.2.2. Propiedades funcionales de los hidrolizados proteicos**

Independientemente de la clasificación, existen algunos efectos comunes del proceso de hidrólisis sobre las proteínas. Por un lado, se incrementa la cantidad de grupos ionizados, modificando la carga total y la hidrofiliidad. Además, al disminuir el peso molecular de los péptidos, disminuye la antigenicidad. Finalmente, la estructura nativa de la proteína cambia, con lo cual los residuos de los aminoácidos hidrofóbicos quedan expuestos en la superficie de los péptidos. Estos efectos de la hidrólisis conllevan a que algunas propiedades de los hidrolizados proteicos difieran respecto a la proteína de origen. Dichas diferencias pueden resultar, en algunos casos, ventajosas.

Las propiedades funcionales más importantes se detallan brevemente a continuación [124, 125]:

- Solubilidad: Los hidrolizados proteicos, independientemente del grado de hidrólisis, son más hidrosolubles que las proteínas que los originaron. Esto generalmente se debe a la reducción del peso molecular, junto con el

incremento de los grupos polares. En general, los hidrolizados son solubles a un amplio rango de pH y concentración. Este incremento en la solubilidad, es importante a la hora de utilizarlos como ingredientes alimenticios y para la preparación de bebidas como suplementos dietarios.

- Estabilidad a la temperatura: los hidrolizados proteicos son más estables a la temperatura que la proteína de la cual provienen, aun a bajos DH. Esto es importante a la hora de pasteurizar el producto, ya que confiere mayor versatilidad tecnológica.
- Capacidad emulsionante y espuma: En general, estas propiedades dependerán del pH y, en el caso de hidrólisis enzimática, de la enzima utilizada con este propósito. Por ejemplo, para hidrolizados de soja con bajos DH, se ha reportado un incremento en su capacidad emulsionante [124]. Sin embargo, en general, en los hidrolizados proteicos la capacidad emulsionante y espumante decrece a medida que aumenta el DH.
- Propiedades reológicas: Debido al proceso de hidrólisis, los hidrolizados de proteínas tienen menor viscosidad que las proteínas originales. Otra propiedad que se ve afectada por la hidrólisis es la gelificación. Sin embargo, la disminución de ambas propiedades facilita muchas de las operaciones del downstream del proceso, por ejemplo el secado final del producto.
- Propiedades organolépticas: Si bien algunos péptidos obtenidos por hidrólisis se emplean como saborizantes, hay hidrolizados que presentan gustos amargos. Esto se ha observado en hidrolizados de ciertas fuentes proteicas como la caseína y la lactoalbúmina, o en aquellos donde se han empleado determinadas proteasas. Se ha propuesto que el sabor amargo de los hidrolizados proteicos se debe a la presencia de péptidos con aminoácidos hidrofóbicos terminales, como la isoleucina, tirosina, fenilalanina y triptófano [124]. Sin embargo, se ha observado que a altos DH, el sabor amargo se hace menos perceptible. Esto indicaría que, al liberar los aminoácidos hidrofóbicos de los péptidos, se puede subsanar este problema. La eliminación del sabor amargo es importante cuando se utilizará dicho hidrolizado para consumo humano, en forma de suplementos dietarios.

### **6.2.3. Fuentes proteicas para la obtención de hidrolizados**

Las fuentes proteicas utilizadas para la producción de hidrolizados proteicos pueden ser de origen animal, vegetal o microbiológico.

Entre las fuentes animales, una de las más empleadas es el pescado, especialmente en países orientales con abundancia de esta materia prima. También se suelen utilizar desechos de la industria cárnica, como tendones o huesos, especialmente para pienso animal [125]. En lo que respecta a hidrolizados para uso medicinal, las proteínas de la leche suelen ser las más empleadas [126].

Por otro lado, en lo que respecta a fuentes proteicas de origen vegetal, las más comúnmente empleadas son la soja, el trigo y el arroz y algunas legumbres como los guisantes y los garbanzos. Las fuentes de origen vegetal tienen un alto contenido de proteínas y un bajo contenido en polifenoles, azúcares e inhibidores de proteasas, lo cual facilita el control del proceso de hidrólisis. Sin embargo, tienen la desventaja de poseer un bajo contenido de aminoácidos esenciales [126].

Finalmente, en cuanto a las fuentes microbianas de proteínas, algunas microalgas y levaduras se han empleado para la fabricación de hidrolizados proteicos [125].

A la hora de elegir una fuente proteica, se debe tener en cuenta el destino que se le va a dar al hidrolizado proteico. Por ejemplo, para la obtención de hidrolizados con propiedades gelificantes debe emplearse colágeno o gelatina. Otro factor a tener en cuenta, es la estructura tridimensional y la secuencia de aminoácidos de la proteína. Esto último tendrá marcada influencia en lo que respecta al proceso, más específicamente el tipo de péptidos que se pueden obtener y la sensibilidad al ataque proteolítico.

### **6.2.4. Tipos de hidrólisis proteica**

Como ya se mencionó anteriormente, existen tres tipos de hidrólisis: ácida, alcalina y enzimática.

La hidrólisis ácida es uno de los métodos más tradicionales de hidrólisis, y aun cuando la hidrólisis enzimática ha copado gran parte del mercado, la hidrólisis ácida se continúa utilizando [127]. Los ácidos más empleados para estos fines son el ácido clorhídrico y el ácido sulfúrico. Generalmente, estos ácidos escinden los

enlaces peptídicos de la proteína, dando lugar a una mezcla de aminoácidos y una mínima cantidad de pequeños péptidos. La reacción se lleva a cabo en reactores de acero inoxidable revestidos en vidrio, que pueden soportar las condiciones extremas de trabajo. Los parámetros de trabajo incluyen temperaturas de 120°C a 140°C, presiones de 2,2 a 3,1 bar, tiempo de hidrólisis de 2 a 8 h y concentración proteica de 50-65% (p/v). Los hidrolizados ácidos son muy empleados en la industria de alimentos y de alimentación animal, como resaltadores del sabor [127].

En lo que respecta a la hidrólisis alcalina, el proceso es muy simple. En principio la fuente proteica se solubiliza mediante tratamiento térmico, y luego se le agrega el álcali y se mantiene la temperatura de 27 a 55°C. Estas condiciones se continúan por unas horas hasta que se alcanza el DH deseado, para finalmente evaporarlo, pasteurizarlo y secarlo en spray. Los agentes alcalinos más empleados para estos fines son el hidróxido de sodio, el hidróxido de calcio y el hidróxido de potasio. Estos tipos de hidrolizados son también empleados en la industria alimenticia [127].

La hidrólisis enzimática, por su parte, es el tipo de hidrólisis más empleada en la actualidad. Este tipo de hidrólisis brinda mayor control del proceso, pudiendo obtenerse una amplia gama de productos, gracias a su especificidad. Adicionalmente, las condiciones de reacción son leves, empleándose generalmente pH entre 6 y 9, y temperaturas entre 40 y 60°C [126]. En general, este proceso comienza con la solubilización del producto y la estandarización del pH y la temperatura. Luego, se adiciona la proteasa, y con esto se da comienzo a la reacción. La ruptura de enlaces peptídicos ocasiona una disminución del pH, con lo cual, para que la reacción transcurra a un pH óptimo, debe controlarse externamente el mismo. Una vez finalizada la reacción, la enzima se inactiva, generalmente por tratamiento térmico [125].

Las proteasas empleadas para la hidrólisis enzimática se clasifican de acuerdo a [128]:

- Su origen: pueden ser de origen animal, vegetal o microbiano.
- Su acción catalítica: pueden ser endopeptidasas, si cortan al azar el interior de las cadenas polipeptídicas o exopeptidasas, si separan aminoácidos o dipéptidos de los extremos de la cadena polipeptídica.

- La naturaleza del sitio activo: de este modo las endopeptidasas pueden ser serin-, cisteín-, metalo-, o asparto-proteasas. Por otro lado, las exoproteasas pueden ser amino-, carboxi- o dipeptidasas.

Algunas de las proteasas comerciales más utilizadas, se presentan en la Tabla 6.1.

Tabla 6.1. Proteasas comerciales más comúnmente empleadas [9].

<i>Fuente</i>	<i>Tipo</i>	<i>Nombre</i>	<i>Especificidad</i>
Páncreas porcino	serin	Tripsina	Lys, Arg
Páncreas porcino	serin	Quimotripsina	Phe, Tyr, Trp
Páncreas porcino	aspartic	Pepsina	Aromáticos, Leu, Asp, Glu
Papaya	cisteín	Papaína	Amplio espectro
Piña	cisteín	Bromelina	Lys, Arg, Phe, Tyr
Higos	cisteín	Fisina	Phe y Tyr

### 6.2.5. Proceso de obtención de hidrolizados proteicos

El proceso general de producción se presenta en la Figura 6.1.

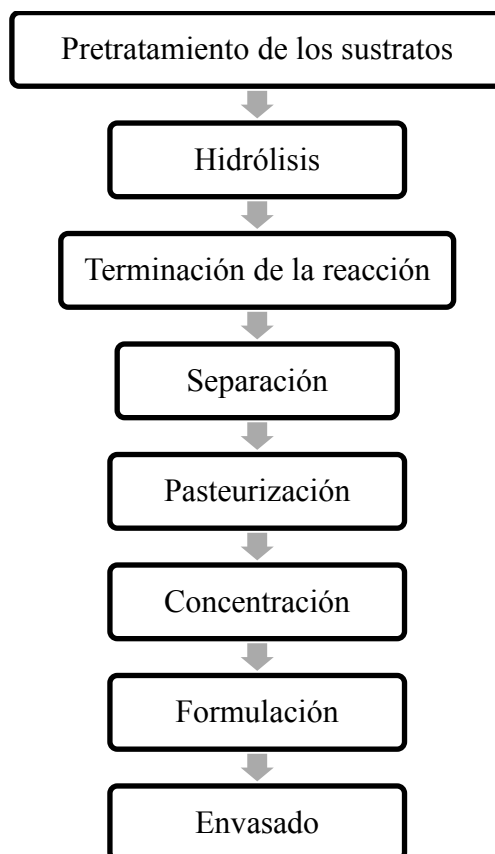


Figura 6.1. Proceso de obtención de hidrolizados proteicos [9].

A continuación se describirá brevemente cada etapa [9, 127]:

- **Pretratamiento de los sustratos:** Un correcto pretratamiento de los sustratos proteicos es fundamental para asegurar un buen rendimiento de proceso. El pretratamiento a utilizar dependerá de la fuente proteica. Así, por ejemplo, si se trata de recortes de carne, se debe proceder a una molienda. El objetivo último de esta etapa es la solubilización del material proteico en agua, hasta concentraciones proteicas donde la viscosidad no ocasiona problemas, esto es hasta aproximadamente un 10%. Si es necesario, las muestras son tratadas térmicamente, ya sea para ayudar a la solubilización del material, o bien para disminuir la carga microbiana inicial. Finalizada la solubilización del sustrato, se ajusta el pH y la temperatura para la consiguiente etapa de hidrólisis.
- **Hidrólisis:** Como ya se mencionó anteriormente, la hidrólisis puede ser enzimática o química (ácida o alcalina). En general, los sustratos se ingresan en tanques para la hidrólisis, se lleva a cabo el agregado del agente hidrolizante y se comienza la reacción. La misma puede tardar un tiempo variable. Durante el proceso se monitorea el DH en línea. En general, los procesos enzimáticos son más controlables que los químicos.
- **Terminación de la reacción:** Una vez alcanzado el DH deseado, la reacción se debe detener. Para ello, en el caso de procesos químicos, se normalizan las variables de reacción, esto es presión y temperatura. Por otro lado, en la hidrólisis enzimática, las proteasas se inactivan mediante desnaturalización a elevadas temperaturas o bien con variación del pH de la mezcla. El proceso de inactivación enzimática debe asegurar que la muestra contenga una actividad residual de proteasas igual o muy cercana a cero. Para el consumo humano, la concentración de proteasas ingeridas a partir de los hidrolizados proteicos, para la cual no se observan efectos adversos, es de 0,44 U/kg/día. Un tratamiento térmico de 80°C durante 9 min asegura la una reducción de la actividad proteolítica en 1000 veces. La inactivación enzimática por tratamiento térmico puede llevarse a cabo en un tanque encamisado, agregando agua caliente sobre el hidrolizado (diluyendo de la muestra) o bien mediante la inyección directa de vapor sanitario. El proceso de calentamiento puede, a su vez, exaltar el flavor del producto, debido a la ocurrencia de reacciones de Maillard.

- **Separación:** La etapa de separación depende en gran medida de la fuente de proteínas empleada. En general, se basa en la recuperación de la fase soluble conteniendo la proteína. Para ello debe separarse dicha fase de la fase oleosa y de los sedimentos de material no hidrolizado. La separación de estas tres fases se puede llevar a cabo mediante el uso de decantadores o centrífugas de tres fases. La separación de la grasa se facilita con el incremento de la temperatura a 95°C. Una vez separadas las fases, se pueden utilizar otras operaciones para estandarizar el producto en el tamaño de los péptidos, como ser la filtración en membrana o la ultrafiltración. Por otra parte, algunos procesos incluyen el pasaje del hidrolizado por sistemas de filtración por membranas para eliminar endotoxinas. Para ello, se usan membranas que separan moléculas de más de 10 kDa.
- **Pasteurización:** El hidrolizado soluble estandarizado se pasteuriza para reducir la carga microbiana y eliminar los posibles patógenos presentes. Estos procesos frecuentemente emplean baremos de temperatura-tiempo menores a los indicados para alimentos, ya que en general, esta etapa se vuelve a repetirse más adelante. Adicionalmente, varias etapas a lo largo del proceso reducen la carga microbiana. Los tratamientos térmicos son los más empleados para pasteurizar el producto.
- **Concentración:** Con la finalidad de estabilizar el producto y facilitar su manipulación, se procede a la concentración del hidrolizado proteico. Dos tipos de operaciones se utilizan para este fin: la ósmosis inversa y la evaporación. Por un lado, la concentración por ósmosis inversa tiene una limitación en cuanto a la concentración proteica final, la cual no puede ser mayor al 20%. En cuanto a la evaporación, es una operación muy utilizada ya que puede obtener soluciones concentradas de proteínas de hasta el 50%. Cuando se desea evitar la reacción de Maillard, la evaporación se lleva a cabo a presión reducida.
- **Formulación:** El producto puede comercializarse en forma líquida o sólida. La forma de presentación líquida comprende un concentrado de 50°Bx, el cual se estabiliza agregándole 10% de NaCl. Para la comercialización del producto en forma sólida, se procede a secar la

solución concentrada del hidrolizado por medio de secador spray. En hidrolizados de elevado DH, esta operación se dificulta debido a la higroscopicidad de la mezcla, lo que puede derivar en agregados húmedos. Para evitarlo, se suele aditivar el hidrolizado con maltodextrinas, previo al secado.

- Envasado: En el caso del producto líquido, se envasa a 80°C en contenedores, colocándolos luego boca abajo para pasteurizar la tapa y evitar el desarrollo de hongos. Luego, se enfría para evitar el desarrollo desmedido de reacciones del tipo Maillard. Por otro lado, el producto sólido se envasa asépticamente en bolsas o en contenedores plásticos.

### **6.2.6. Aplicaciones de los hidrolizados proteicos**

Los hidrolizados proteicos tienen variadas aplicaciones en el campo de la medicina, la agricultura, la alimentación humana y animal, la biotecnología, etc.

Una de las aplicaciones más extendidas de los hidrolizados proteicos es su uso medicinal como fuente de nitrógeno. Éstos están destinados a la dieta de pacientes que no pueden ingerir adecuada cantidad de alimentos en forma convencional, entre ellos niños, ancianos, pacientes con problemas del tracto digestivo o desórdenes metabólicos. Hay dos maneras de suministrar los aminoácidos esenciales: mediante fórmulas basadas en una mezcla de aminoácidos sintéticos o bien mediante hidrolizados proteicos. En general, estos últimos son preferibles debido a su disponibilidad a gran escala, su costo moderado y su mayor calidad biológica y digestibilidad [126]. La utilización de hidrolizados proteicos en fórmulas medicinales es una tendencia industrial en expansión e incluye una amplia diversificación. Algunas aplicaciones medicinales pueden clasificarse en:

- Suplementos dietarios: productos geriátricos, productos energéticos, productos para control de peso, etc.
- Suplementos para usos clínicos: fórmulas hipoalergénicas para bebés, fórmulas para problemas hepáticos agudos y crónicos, pancreatitis, colitis ulcerosa, dietas entéricas, desórdenes metabólicos de aminoácidos, etc.

Los hidrolizados proteicos también son ampliamente empleados en la industria de alimentos, ya que como resaltadores del sabor, son la base de muchos

saborizantes empleados en la industria. En cuanto a hidrolizados provenientes de desechos industriales, tales como pluma, pelo, cuero, huesos, etc. son muy utilizados en la fabricación de pienso para animales [124].

### **6.2.7. Hidrolizados proteicos en la dieta de pacientes con PKU**

Como ya se mencionó en el Capítulo 2 (Ver Tabla 2.5), los pacientes con PKU clásica, deben consumir una cantidad máxima de  $\sim 2,5 - 3$  g/kg/día de proteínas contenidas en fórmulas, con reducido o nulo contenido de L-Phe.

Dichas fórmulas, normalmente se tratan de una mezcla de aminoácidos sintéticos, con nulo contenido de L-Phe y fortificados en L-Tyr.

Sin embargo, en las últimas décadas se han desarrollado algunas fórmulas basadas en hidrolizados proteicos con reducido o nulo contenido de L-Phe. La ingesta de estos hidrolizados puede ser beneficiosa en cuando a la incorporación de proteínas de alto valor biológico en la dieta del paciente [126]. Algunas de ellas han sido empleadas en la alimentación de pacientes con PKU, permitiendo un desarrollo físico y mental normal [129, 130]. Debido a que los pacientes con PKU tiene totalmente o parcialmente interrumpida la ruta de biosíntesis de la L-Tyr, los hidrolizados proteicos tienen que ser suplementados con L-Tyr para proveer entre 100 - 120 mg/kg/día [126].

Para la remoción de L-Phe de los hidrolizados proteicos, se han empleado diversos métodos, entre ellos columnas de carbón activado y resinas de intercambio iónico [131, 132]. Particularmente existe un producto comercial, Lofenalac, comercializado en EEUU, el cual se basa en hidrolizados de caseína con un contenido de L-Phe de 0,06-0,1% (75 mg/100 g de producto) [126].

Estos antecedentes, entre otros, nos indican que es factible el uso de hidrolizados proteicos para la fabricación de mezcla de aminoácidos de procedencia natural, libres de L-Phe, por métodos biotecnológicos.

## 6.3. Metodología

### 6.3.1. Empleo de PAL parcialmente purificada

Como ya se mencionó anteriormente, una alternativa al biocatalizador propuesto es emplear PAL parcialmente purificada (Ver Capítulo 4), debido a que su método de obtención es simple y relativamente económico, por las escasas etapas que intervienen en su purificación.

Como vimos en el Capítulo 5, la enzima purificada e inmovilizada en membranas celulósicas, no resultó ser eficiente para nuestros propósitos, ya que únicamente se pudo utilizar para soluciones muy diluidas. Como la actividad de la enzima parcialmente purificada es muy inferior a la de la enzima purificada, se evaluará su utilización en solución. La utilización de extractos enzimáticos, aplicados en forma directa en solución, es un procedimiento habitual en bioprocesos, cuando se intentan obtener productos de bajo costo. Sin embargo, PAL en solución no puede ser reutilizada, debiendo ser inactivada y extraída de la mezcla de reacción. En consecuencia, se requiere la optimización de las variables de proceso, para lograr una mayor conversión en menos tiempo, y de este modo, incrementar su rentabilidad.

#### 6.3.1.1. Determinación de actividad en sustratos complejos

El primer paso para llevar a cabo la reacción con sustratos complejos es diseñar una técnica de determinación rápida de la actividad enzimática, ya que el protocolo empleado en los capítulos anteriores no es aplicable a este propósito. Esto se debe fundamentalmente a la complejidad de la matriz empleada como sustrato. Los hidrolizados proteicos contienen una serie de aminoácidos libres y algunos péptidos de cadena corta, los cuales producen interferencias significativas en la longitud de onda medida (290 nm). En la técnica original, la L-Phe produce interferencia en el pico máximo de actividad del *t*-CA (~270 nm), con lo cual la determinación se lleva a cabo a 290 nm, donde la L-Phe no produce interferencia. Sin embargo, en el caso de hidrolizados proteicos, esta metodología no es factible, ya que, el triptófano y la tirosina tienen un pico de absorción en 280 nm.

Para determinar la actividad PAL en sustratos complejos como éste, se desarrolló una técnica basada en la extracción con solventes orgánicos, empleando acetato de etilo. Esta técnica aprovecha la elevada solubilidad del *t*-CA en

solventes orgánicos. Si bien los aminoácidos hidrofóbicos pueden pasar a la fase orgánica, solamente el triptófano y la fenilalanina pueden causar interferencia en la fase orgánica. Adicionalmente, el triptófano es menos soluble que la L-Phe en solventes orgánicos, con lo cual su concentración en la fase orgánica será menor. Para disminuir la interferencia que pueden causar estos aminoácidos, la muestra se diluye (20 veces), aprovechando que el *t*-CA tiene una elevada absorbancia a bajas concentraciones. Como la absorbancia de la L-Phe no representa interferencia a 290 nm, se puede emplear el extracto orgánico a tiempo cero como blanco de reacción. En soluciones muy concentradas de *t*-CA la utilización de solventes orgánicos no es necesaria, ya que diluyendo la muestra 100 veces, y utilizando como blanco de reacción el hidrolizado a tiempo cero, se puede obtener un pico de *t*-CA bien definido.

Finalmente, debido a la presencia de L-Tyr en la mezcla de reacción, se formará *p*-CA el cual estará presente también en la fase orgánica. Debido a esto, la actividad de PAL no se puede expresar simplemente por la presencia de *t*-CA, sino que será la mezcla de ambas sustancias. Es por ello, que no podemos definir la U de PAL, pero aun así, el incremento de DO a 290 nm tiene una relación directa con la misma. La única diferencia es que no podemos calcular la concentración de L-Phe remanente en la mezcla, por correlación con la DO a 290 nm. Para este propósito se emplearán otras técnicas, las cuales se describirán más adelante.

#### 6.3.1.2. Optimización de las variables de reacción

Para la optimización de las variables de reacción de PAL parcialmente purificada con sustratos complejos, se empleó un hidrolizado ácido de caseína (CAH, Oxoid L41).

Como ensayo preliminar, se incubó 5 g/l de CAH en buffer Tris-HCl (0,1 M, pH=8,0) con PAL a una concentración final de 140 U/ml de mezcla de reacción, a 30°C por 2 h. Una vez finalizada la reacción, la misma se detuvo con el agregado de TCA a una concentración final de 2% (p/v) y la proteína precipitada se eliminó por centrifugación a 10000 rpm por 10 min. Seguidamente, se agregó acetato de etilo en proporción 20:1 respecto a la mezcla de reacción y se agitó vigorosamente en un vortex durante 1 min. Luego, la mezcla se centrifugó a 4000 rpm por 5 min para una correcta separación de las fases. Finalmente, se

determinó la DO a 290 nm en la fase orgánica. Los resultados obtenidos se tomaron como referencia para la posterior optimización.

Seguidamente, se optimizaron 4 variables de proceso: la concentración de enzima, la concentración de sustrato, la temperatura y el pH de la reacción.

Por un lado, la concentración de la enzima (0 a 280 mU/ml) y la concentración de sustrato (0 a 50 g/l) se optimizaron mediante metodología superficie respuesta, empleando el diseño hexagonal de Doehlert (Tabla 6.2). La incubación se llevó a cabo a 30°C utilizando como disolvente buffer Tris-HCl (0,1 M, pH=8,0). Luego de transcurridas 2 h de incubación, la reacción se detuvo con TCA (2% p/v), se adicionó acetato de etilo y se midió la DO a 290 nm en la fase orgánica.

Tabla 6.2. Diseño de Doehlert para optimización de CAH vs. PAL.

<i>Exp</i>	<i>Valores codificados</i>		<i>Valores reales</i>	
	X	Y	CAH (g/l)	PAL (mU/ml)
1	1	0	50	140
2	0,5	0,866	37,5	280
3	-0,5	0,866	12,5	280
4	-1	0	0	140
5	-0,5	-0,866	12,5	0
6	0,5	-0,866	37,5	0
7	0	0	25	140
8	0	0	25	140
9	0	0	25	140
10	0	0	25	140

En paralelo, se llevó a cabo la optimización del pH (7 a 9) y de la temperatura (30-70°C). Nuevamente, se utilizó RSM por medio del diseño hexagonal de Doehlert (Tabla 6.3). La mezcla de reacción contenía 10 g/l de CAH en buffer Tris-HCl (0,1 M) y 140 mU/ml de PAL parcialmente purificada. Debido a que el pH del buffer Tris varía considerablemente con la temperatura, se procedió a corregir este efecto a cada temperatura y concentración de CAH, para que la mezcla final tenga el pH correcto de acuerdo a la temperatura de incubación. Luego de transcurridas 2 h de incubación, se detuvo la reacción y se

determinó la DO a 290 nm, con el mismo procedimiento empleado en el caso anterior.

Tabla 6.3. Diseño de Doehlert para optimización de temperatura vs. pH.

<i>Exp</i>	<i>Valores codificados</i>		<i>Valores reales</i>	
	X	Y	Temperatura (°C)	pH
1	1	0	70	8
2	0,5	0,866	60	9
3	-0,5	0,866	40	9
4	-1	0	30	8
5	-0,5	-0,866	40	7
6	0,5	-0,866	60	7
7	0	0	50	8
8	0	0	50	8
9	0	0	50	8
10	0	0	50	8

La respuesta observada en ambos casos se describió por medio de un modelo cuadrático, con los correspondientes coeficientes calculados por ANOVA, de la forma descrita en el Capítulo 3 de la presente tesis.

Finalmente, se comparó la reacción llevada a cabo en condiciones óptimas, con las condiciones empleadas al principio de la reacción y se calculó el % de optimización alcanzado, de la misma forma que en el Capítulo 3.

### 6.3.1.3. Cinética de reacción en condiciones óptimas

Una vez definida las condiciones óptimas de reacción, se determinó la cinética para dicha reacción. Para ello, se incubó 35 g/l de CAH en Tris-HCl (0,1 M, pH=8,3, 5 mM EDTA) con 800 mU/ml de PAL, a 42°C. Se tomó muestra cada 1 h, deteniendo la reacción en las mismas con TCA al 2% p/v, se llevó a cabo la extracción con acetato de etilo y se determinó la DO a 290 nm.

Para corroborar la producción de *t*-CA y *p*-CA, como resultado de la bioconversión, se tomaron las muestras de las 0, 3 y 6 h, y se determinó cualitativamente la presencia de ambos ácidos por cromatografía en capa fina (TLC).

Para ello se utilizó el protocolo de Sharma *et al.* [133]. La cromatografía se llevó a cabo en placas de sílica gel (10 × 15 cm), con una fase móvil constituida por cloroformo-metanol-ácido acético (90:10:1). Como solución reveladora se empleó FeCl<sub>3</sub>.

Las soluciones patrones de *t*-CA y *p*-CA se prepararon disolviendo 8 mg y 4 mg de las respectivas drogas en 1 ml de metanol. En cuanto a las muestras, se dejaron secar en campana de extracción hasta completa eliminación del acetato de etilo, y luego se re disolvieron en metanol.

#### 6.3.1.4. Efecto de las proteasas en la bioconversión

Tanto los hidrolizados obtenidos por hidrólisis enzimática, como la enzima parcialmente purificada, pueden contener proteasas remanentes en su composición. Estas proteasas pueden afectar a la enzima inactivándola, en especial en largos períodos de incubación. Para evitar que esto suceda, es costumbre incorporar a la mezcla de reacción determinados inhibidores de proteasas. Esto puede realizarse, en la medida que los mismos no afecten la actividad de la enzima.

Con este propósito, se estudiaron dos inhibidores de proteasas: el ácido etilendiaminotetraacético, en forma de su sal disódica (EDTA-Na<sub>2</sub>), que actúa como inhibidor de metaloproteasas y el fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), un inhibidor de serin proteasas.

Para el ensayo se empleó una muestra de reacción conteniendo 35 g/l de CAH en buffer Tris-HCl (0,1 M, pH=8,3) con 800 mU/ml de PAL, a la cual se le agregó los inhibidores de la siguiente manera:

- 1) 0,5 mM PMSF.
- 2) 5 mM EDTA-Na<sub>2</sub>.
- 3) 0,5 mM PMSF + 5 mM EDTA-Na<sub>2</sub>
- 4) Control sin inhibidor.

Las muestras se incubaron toda la noche a 42°C.

Para el monitoreo de la reacción se llevó a cabo la cuantificación de L-Phe, por cromatografía gaseosa de alta resolución (HPLC), por método adaptado de Atherton and Green [134].

Para esto, se empleó un inyector Waters 717 Plus Autosampler, con un volumen de inyección de 20 µl por muestra. La separación cromatográfica se

llevó a cabo en una columna de fase reversa C18 (Waters, 150 × 4,6 mm, tamaño de partícula 5 µm). La fase móvil fue una mezcla de solventes conteniendo ácido fosfórico (pH = 2):metanol en proporción 80:20, la cual se suministró a un flujo isocrático de 1 ml/min. El detector de absorbancia Vis-UV de fotodiodos (Waters 2996) fue operado a 257 nm.

Par el trazado de la curva estándar de L-Phe (0 a 1000 µmol/l) se utilizó una droga patrón de 99% de pureza (Biopack, Argentina). Las muestras fueron ajustadas, para que se encuentren en este rango de concentraciones.

### 6.3.1.5. Bioconversión de L-Phe en hidrolizados proteicos

Para la bioconversión de L-Phe en sustratos complejos, se emplearon como modelos, una serie de hidrolizados proteicos comerciales, de grado biotecnológico (Tabla 6.4).

Tabla 6.4. Hidrolizados proteicos empleados.

<i>Hidrolizado</i>	<i>Marca</i>	<i>Tipo de hidrólisis</i>
Peptona ácida de caseína	Britania	Ácida
Bacto peptona	Difco	Enzimática
Peptona de carne	Sigma-Aldrich	Enzimática
Peptona de gelatina	Merck	Enzimática
Triptona	Biokar	Enzimática

Los sustratos se prepararon en concentraciones de 35 g/l en buffer Tris-HCl (0,1 M, pH=8,3, 5 mM EDTA) y se incubaron con 800 mU/ml a 42°C por toda la noche. Las concentraciones iniciales y finales de L-Phe se determinaron por HPLC, de acuerdo a la técnica descripta más arriba.

Con estos datos se calculó el % reducción de L-Phe, como (Ecuación 6.2):

$$\% \text{ reducción } L - Phe = \frac{C_0 - C_{ON}}{C_0} \quad (6.2)$$

Donde  $C_0$  es la concentración inicial de L-Phe y  $C_{ON}$  es la concentración luego de la reacción “overnight”.

Otro parámetro que se calculó fue la relación Phe/Pr, que es la cantidad de mg de L-Phe contenida por g de fórmula proteica.

### **6.3.2. Aplicación del biocatalizador inmovilizado**

El biocatalizador inmovilizado, consistente en células catalíticas inmovilizadas en esferas de Alg-Ca, fue empleado en la reducción de L-Phe en hidrolizados proteicos.

#### **6.3.2.1. Pretratamiento de los sustratos proteicos**

Los sustratos a emplear en la bioconversión de L-Phe en *t*-CA, se prepararon en concentraciones de 35 g/l y se sometieron a dos tratamientos previos a la bioconversión:

- **Eliminación de turbidez:** Se observó en ensayos previos con hidrolizados obtenidos por métodos ácidos, la formación de turbidez cuando se incorporaban las esferas de Alg-Ca. Luego de estudiar este problema se descubrió que agregando  $\text{CaCl}_2$  concentrado (5 M) al hidrolizado, éste producía la misma turbidez, la cual podía ser eliminada mediante centrifugación a 8800 rpm por 10 min. Se concluyó que dicha turbidez se puede deber a la formación de  $\text{Ca SO}_4$ , ya que muchos de estos productos son hidrolizados con  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , con lo que se podría presumir la presencia de restos de sulfato en el producto comercial. Para estandarizar el tratamiento, todos los hidrolizados, independientemente de su origen, fueron sometidos a este tratamiento.
- **Inactivación de proteasas:** Los sustratos obtenidos por hidrólisis enzimática pueden contener actividad proteolítica residual y, por ende, afectar la enzima. Para evitarlo, los hidrolizados se sometieron a tratamiento térmico a 80°C por 15 min, en constante agitación. Con la finalidad de estandarizar las muestras, este mismo tratamiento se repitió en todos los hidrolizados, independientemente de su origen.

### 6.3.2.2. Bioconversión de L-Phe en hidrolizados proteicos

Para determinar la eficacia del biocatalizador inmovilizado, en la reducción de L-Phe en hidrolizados proteicos, se emplearon como hidrolizados modelo, los sustratos que se muestran en la Tabla 6.5.

Tabla 6.5. Sustratos proteicos empleados en la bioconversión de PAL.

<i>Hidrolizado</i>	<i>Marca</i>	<i>Tipo de hidrólisis</i>
Tripticasa de soja	Becton	Enzimática
Hidrolizado de soja y caseína	Daigo	Enzimática
Hidrolizado ácido de caseína	Oxoid	Ácida
Casaminoácidos	Daigo	Ácida

Estos hidrolizados fueron preparados en concentraciones de 35 g/l en buffer Tris-HCl (0,1 M, pH=8,5, 1 mM de EDTA). Por otro lado, las esferas se agregaron en una concentración equivalente a 10 mg/ml de células catalíticas. La incubación se llevó a cabo a 50°C y se tomó muestra cada 1 h. La cinética de reacción se siguió mediante la dilución 1:100 de las muestras y la determinación de la DO a 290 nm.

Adicionalmente, se cuantificó la L-Phe en las muestras iniciales y finales (6 h), mediante HPLC. El cromatógrafo usado para estos ensayos es Shimadzu, con una columna Mightysil RP-18 GP (4.6 × 250 mm). Se inyectó un volumen de muestra de 5 µl y se corrió con una fase móvil consistente en ácido fosfórico (pH=2,5): metanol en una proporción 80:20, con un flujo isocrático de 0,6 ml/min. Se utilizó un detector de fotodiodos Shimadzu el cual fue operado a 257 nm. La curva de calibración de L-Phe (0 a 1000 µmol/l) fue preparada con una droga patrón de 99% de pureza (Wako).

Finalmente, con los resultados al inicio y al final de la reacción, se determinó el % de reducción de L-Phe, empleando la fórmula 6.1.

## 6.4. Resultados y Discusión

### 6.4.1. Empleo de PAL parcialmente purificada

PAL parcialmente purificada fue empleada en forma soluble, como alternativa a la utilización de las células catalíticas inmovilizadas, para la reducción de L-Phe en hidrolizados proteicos.

#### 6.4.1.1. Optimización de las variables de reacción

La reacción de bioconversión de L-Phe en hidrolizados proteicos se optimizó en cuanto a: concentración del biocatalizador, concentración de sustrato, pH y temperatura.

Primeramente, se optimizó la concentración de PAL en la mezcla de reacción (0-280 mU/ml) y la concentración de CAH (0-50 g/l), empleando RSM mediante diseño de Doehlert. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 6.6.

Tabla 6.6. Resultados obtenidos a partir de RMS de CAH vs. PAL.

<i>Exp.</i>	<i>DO<sub>290</sub></i>
1	11,34 ± 0,19
2	16,42 ± 0,12
3	10,73 ± 0,12
4	0,06 ± 0,01
5	0,03 ± 0,01
6	0,08 ± 0,01
7	9,73 ± 0,09
8	9,85 ± 0,12
9	9,68 ± 0,17
10	9,77 ± 0,12

A partir del análisis ANOVA para el RSM, se obtuvo que tanto la concentración de CAH como la concentración de PAL son factores estadísticamente significativos en la  $DO_{290}$  (Tabla 6.7), directamente relacionada con la actividad ( $p < 0,05$ ).

Tabla 6.7. Significancia de CAH y PAL, analizados por RMS ( $R^2 = 0,9823$ ).

<i>Factor</i>	<i>p</i>
CAH	0,002
PAL	0,000
Lack of fit	0,000

Como podemos ver en la Tabla 6.7. el lack of fit es significativo, sin embargo el  $R^2$  es lo suficientemente grande para desestimarlos.

A partir de los coeficientes de regresión, obtenidos a partir del ANOVA (Tabla 6.8), se puede armar el modelo cuadrático, de acuerdo a la Ecuación 3.9 (Ver Capítulo 3). En este modelo  $i = 1$  es CAH e  $i = 2$  es el PAL.

Tabla 6.8. Coeficientes de regresión para RMS de CAH y PAL.

<i>Coficiente</i>	<i>Valor</i>
$\beta_0$	9,76
$\beta_1$	4,72
$\beta_2$	7,80
$\beta_{11}$	-4,06
$\beta_{22}$	-2,57
$\beta_{12}$	3,25

El modelo cuadrático que representa la respuesta observada, se muestra a continuación:

$$DO_{290} = 9,8 + 4,7CAH + 7,8PAL - 4,1CAH^2 - 2,6PAL^2 + 3,2CAH PAL \quad (6.3)$$

Esta respuesta ( $OD_{290}$ ), expresada en función de los factores (concentración de CAH y PAL), se puede visualizar en un gráfico de contorno.

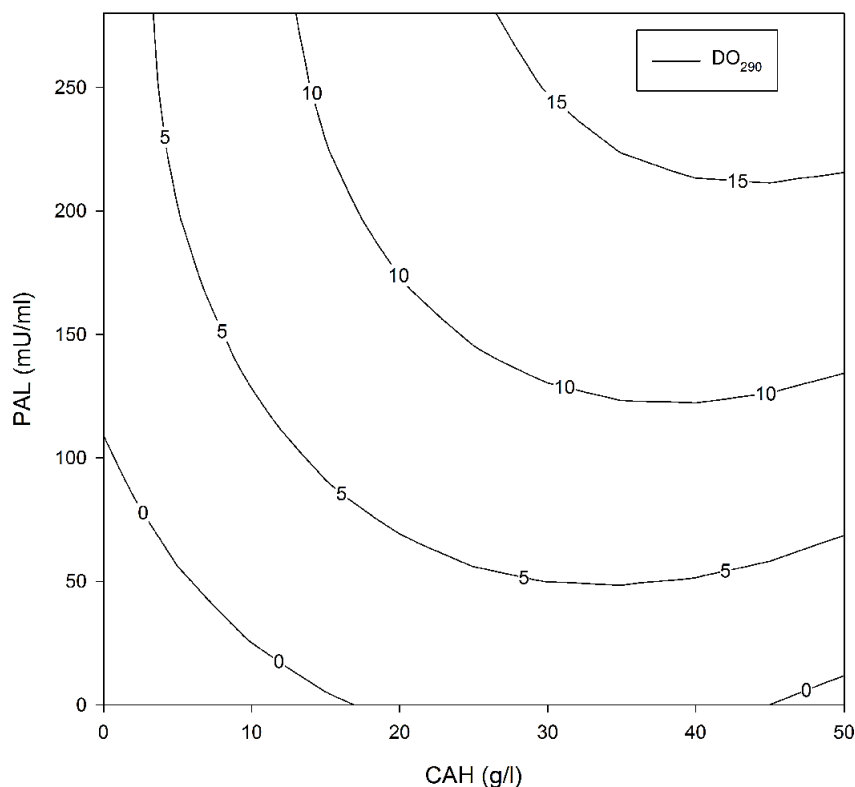


Figura 6.2. Gráfico de contorno de la influencia del CAH y PAL en la  $DO_{290}$ .

Incubación: 30°C, pH=8, 2 h de reacción.

Como podemos ver en la Figura 6.2, el modelo propuesto no es aplicable a concentraciones bajas de CAH y PAL. Por otro lado, la  $DO_{290}$  se incrementa, a medida que aumenta la concentración de CAH y PAL. Es lógico pensar que a mayor concentración de ambos reactantes, mayor será el *t*-CA y *p*-CA formado. Teniendo en vista la aplicación, es preferible aumentar la concentración de sustrato lo más posible, ya que no es conveniente diluir el sustrato para el tratamiento enzimático para luego tener que volver a concentrarlo o bien secarlo para su envasado. Incremento de concentraciones de CAH, mayores a los empleados en el diseño, no son posibles debido a que 50 g/l es el límite de la solubilidad de este sustrato, a temperatura ambiente. Es por ello, que para mejorar el sistema, una alternativa es incrementar aún más la concentración enzimática. Como la enzima se encuentra libre en solución, el agregado de la misma producirá un cambio de volumen, es por ello que se utilizará como máximo concentraciones de 35 g/l. Para esta concentración fija de CAH, se ensayaron incrementos sucesivos de PAL.

Como puede verse en la Figura 6.3, a valores cercanos a los 800 mU/ml la curva se comienza a volver asintótica. Por ende mayores concentraciones de PAL no significarán un incremento significativo de la  $OD_{290}$ .

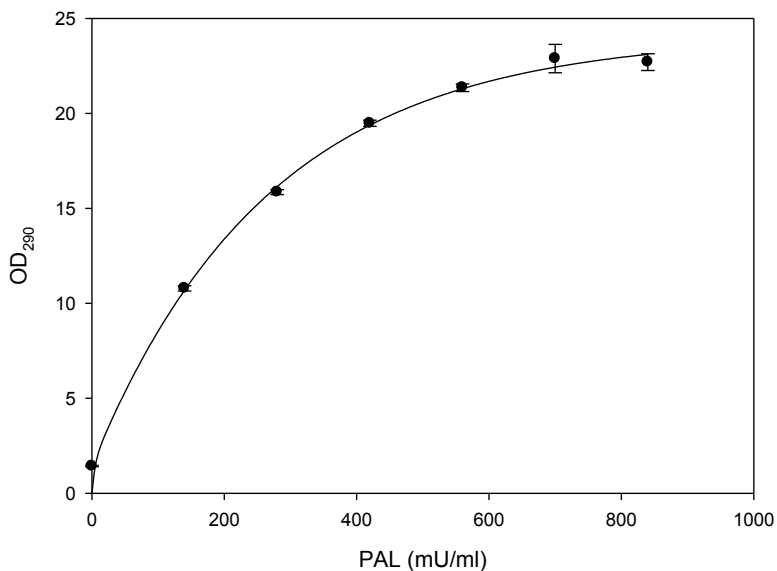


Figura 6.3. Efecto de la concentración de PAL en la  $DO_{290}$ .

Por otro lado, se optimizó el pH (7 a 9) y la temperatura (30-70°C), de forma similar que en el ensayo anterior, empleando el diseño hexagonal de Doehlert. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 6.9.

Tabla 6.9. Resultados obtenidos a partir de RMS de temperatura vs. pH.

<i>Exp.</i>	$DO_{290}$
1	$0,05 \pm 0,01$
2	$4,55 \pm 0,03$
3	$10,91 \pm 0,05$
4	$4,85 \pm 0,03$
5	$4,21 \pm 0,01$
6	$2,50 \pm 0,07$
7	$9,14 \pm 0,04$
8	$9,57 \pm 0,08$
9	$9,51 \pm 0,03$
10	$9,72 \pm 0,04$

A partir del análisis ANOVA para el RSM, se obtuvo que tanto la temperatura como el pH, son factores estadísticamente significativos ( $p < 0,05$ ) en la  $DO_{290}$  y por lo tanto, en la actividad PAL (Tabla 6.10).

Tabla 6.10. Significancia de temperatura y pH, analizados por RMS ( $R^2 = 0,9842$ ).

<i>Factor</i>	<i>p</i>
Temperatura	0,002
pH	0,003
Lack of fit	0,012

Si bien el lack of fit es significativo ( $p < 0,05$ ), el  $R^2$  es lo suficientemente elevado para desestimarlos.

A partir de los coeficientes de regresión obtenidos por ANOVA (Tabla 6.11), se puede armar el modelo cuadrático, de acuerdo a la ecuación 3.9 (Ver Capítulo 3). En este modelo  $i = 1$  es Temperatura e  $i = 2$  es pH.

Tabla 6.11. Coeficientes de regresión para RMS de temperatura y pH.

<i>Coficiente</i>	<i>Valor</i>
$\beta_0$	9.485
$\beta_1$	-2.944
$\beta_2$	2.525
$\beta_{11}$	-7.037
$\beta_{22}$	-2.909
$\beta_{12}$	-2.684

El modelo cuadrático que representa la respuesta observada, se muestra a continuación:

$$DO_{290} = 9,5 - 2,9T + 2,5pH - 7,0T^2 - 2,9pH^2 - 2,7T pH \quad (6.4)$$

Esta respuesta ( $OD_{290}$ ), expresada en función de los factores (temperatura y pH), se puede visualizar en un gráfico de contorno.

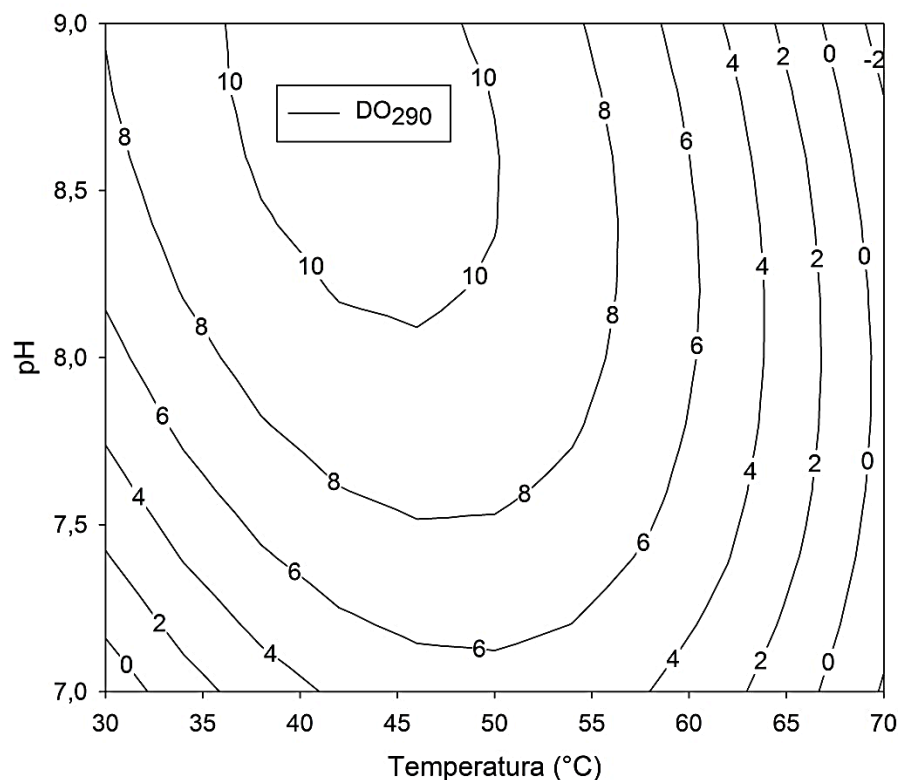


Figura 6.4. Gráfico de contorno de la influencia de temperatura y pH en la  $DO_{290}$ .

CAH: 10 g/l y PAL: 140 mU/ml.

Como puede apreciarse en la Figura 6.4, el efecto conjunto del pH y temperatura tiene un punto óptimo de operación de  $\sim 42\text{-}43^\circ\text{C}$  y un pH de  $\sim 8,6\text{-}8,7$ . En cuanto a la temperatura, se puede observar que tiene un óptimo de temperatura muy similar al determinado previamente para la enzima pura (Ver Capítulo 4). Respecto al pH, se encuentra en el rango reportado como óptimo por Ogata *et al.* [30]. Para determinar el efecto de ambas variables (temperatura y pH) en la bioconversión de PAL, se compara la reacción en condiciones estándar de ensayo respecto a las condiciones óptimas (Tabla 6.12).

Tabla 6.12. Mejora alcanzada mediante la optimización de la temperatura y el pH.

CAH: 35 g/l y PAL: 800 mU/ml.

<i>Parámetro</i>	<i>Condición inicial</i>	<i>Condición óptima</i>
Temperatura ( $^\circ\text{C}$ )	30	42
pH	8	8,5
$DO_{290}$	25,46	57,28
% optimización	100	224

La optimización de la temperatura y el pH permitieron aumentar más de dos veces, la  $DO_{290}$  y, por ende, la actividad PAL.

#### 6.4.1.2. Cinética de reacción en condiciones óptimas

La cinética de reacción en condiciones óptimas (35 g/l CAH, 800 mU/ml PAL, pH: 8,3 y temperatura: 42°C), se determinó por medida de  $DO_{290}$  a diferentes tiempos de reacción.

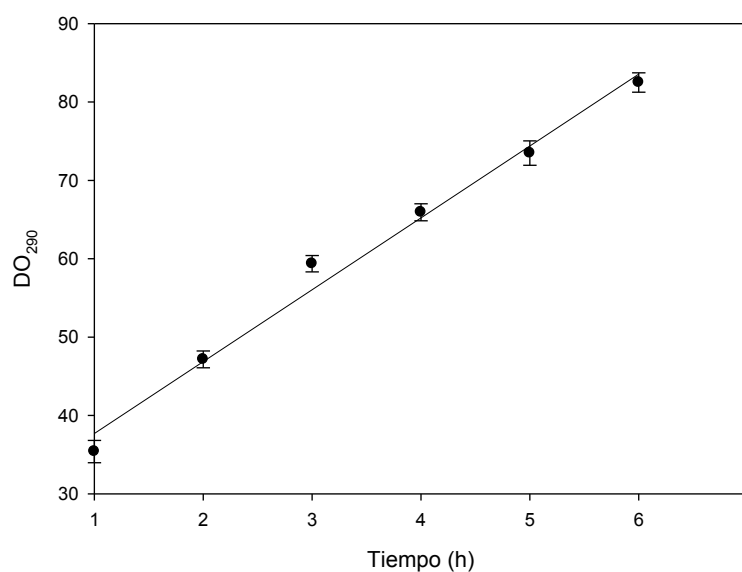


Figura 6.5. Cinética de reacción de PAL en condiciones óptimas.

$$\text{Correlación: } y=9,172 x + 28,345 \text{ (R}^2=0,987\text{)}.$$

Como puede observarse en la Figura 6.5, la cinética de reacción en las primeras horas muestra una tendencia lineal, con lo cual, se puede inferir que no hay limitaciones de ningún tipo (difusivas, inhibición).

Con la finalidad de determinar si en la fase orgánica analizada está presente el *t*-CA y el *p*-CA, se llevó a cabo una TLC, a las 0, 3 y 6 h. Los resultados pueden observarse en la Figura 6.6.

En la Figura 6.6 pueden distinguirse dos compuestos coloreados (naranja y amarillo), los cuales coinciden con los patrones de *t*-CA (color amarillo) y *p*-CA (color naranja). Los compuestos identificados como tales sólo se encuentran presentes a las 3 h de reacción y a las 6 h de reacción, no encontrándose en la muestra inicial a tiempo 0 h.

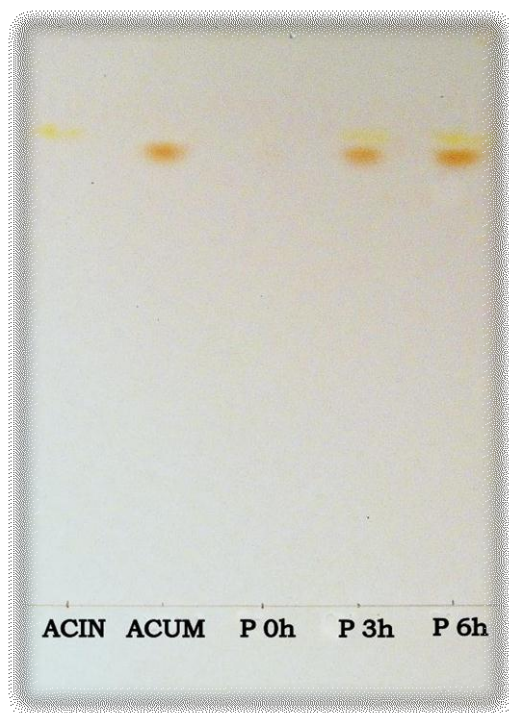


Figura 6.6. TLC para identificar los productos de reacción.

ACIN: *t*-CA y ACUM: *p*-CA.

Estos resultados demuestran que en la reacción se lleva a cabo simultáneamente la conversión de L-Phe en *t*-CA y la L-Tyr en *p*-CA. El hecho que se verifiquen ambas reacciones a la vez es indeseable, ya que la L-Tyr es un aminoácido esencial para los pacientes con PKU. Debido a que PAL (EC 4.3.1.25), actúa sobre ambos sustratos, se deberá adicionar este aminoácido al producto final obtenido. Si bien existe la alternativa de emplear PAL (EC 4.3.1.24), la cual únicamente actúa sobre L-Phe, ésta enzima está presente en plantas superiores, las cuales se caracterizan por tener una actividad considerablemente menor y su aislamiento y purificación resulta más engorroso [29].

#### 6.4.1.3. Efecto de las proteasas en la bioconversión

El efecto de las metaloproteasas y las serin proteasas en la bioconversión empleando PAL parcialmente purificada se evaluó mediante una reacción durante toda la noche, en la cual se adicionaron EDTA y PMSF como inhibidores, así como la combinación de ambos.

Tabla 6.13. Tratamiento con inhibidores de proteasas.

CAH: 35 g/l, PAL: 800 mU/ml, pH: 8,3, temperatura:42°C y tiempo de incubación: overnight.

Concentraciones de inhibidores: 5 mM de EDTA y 0,5 mM de PMSF.

<i>Tratamiento</i>	<i>L-Phe inicial (<math>\mu\text{mol/l}</math>)</i>	<i>L-Phe final (<math>\mu\text{mol/l}</math>)</i>	<i>% Reducción</i>
PMSF	4805	1164	76
PMSF+EDTA	4917	376	92
EDTA	4891	369	92
Sin inhibidor	4992	1134	77

Analizando la Tabla 6.13, podemos observar que se obtuvo una mayor conversión (92%) empleando EDTA, como inhibidor de metaloproteasas. Por otro lado, no se obtuvo ningún beneficio respecto al uso combinado con PMSF. Por su parte, el tratamiento solo con PMSF alcanzó prácticamente la misma conversión que el sistema sin inhibidor (76-77%). A partir de estos resultados podemos inferir la presencia de metaloproteasas en la mezcla de reacción. Debido a que el CAH es obtenido por hidrólisis ácida, es probable que la metaloproteasa esté presente en la enzima parcialmente purificada. Al comparar los % de reducción, podemos concluir que, en períodos largos de incubación, la se ve afectada por la presencia de proteasas.

#### 6.4.1.4. Bioconversión de L-Phe en hidrolizados proteicos

PAL parcialmente purificada se empleó en forma soluble en la reducción del contenido de L-Phe en sustratos complejos. Como modelo de estudio se emplearon diferentes hidrolizados proteicos comerciales. Dichos hidrolizados, en concentraciones de 35 g/l en buffer Tris-HCl (0,1 M, pH=8,3, 5 mM EDTA) fueron tratados con 800 mU PAL/ml, a 42°C, por el transcurso de la noche.

Se cuantificó la L-Phe mediante HPLC, empleando una curva estándar de L-Phe ( $R^2 = 0,9998$ ).

Como podemos ver en la Tabla 6.14, en general se lograron elevados % de reducciones (80-100%). Las diferencias entre uno y otro son atribuibles a múltiples factores, entre ellos, la diversificación entre las fuentes proteicas, el proceso de hidrólisis, la presencia de proteasas no identificadas, sustancias inhibidoras, etc.

Tabla 6.14. Bioconversión en sustratos proteicos con PAL parcialmente purificada.

<i>Tratamiento</i>	<i>Reducción (%)</i>	<i>L-Phe final (<math>\mu\text{mol/l}</math>)</i>	<i>Phe/Pr (mg/g)</i>
Peptona ácida de caseína	94	172	1,6
Bacto peptona	84	806	7,6
Peptona de carne	81	852	8,0
Peptona de gelatina	100	ND	0
Triptona	100	ND	0

Aun en aquellos hidrolizados en los cuales la reducción no fue completa, la máxima concentración de L-Phe libre remanente es del 850  $\mu\text{mol/l}$ . En el caso hipotético en el que consideremos que de los 35 g/l de sustrato, 50% son proteínas, la máxima relación Phe/Pr que podría alcanzarse es de 8 mg/g. Si observamos en la Tabla 2.5 (Ver Capítulo 2), podemos ver que para la variante más severa de la enfermedad (PKU clásica), se recomienda un consumo de proteína, contenida en fórmulas de aminoácidos (PrXPhe), de hasta 2,5-3 g/kg/día, para un niño de < 1 año de vida. A su vez, los pacientes deben consumir un mínimo de L-Phe, para el desarrollo físico y mental normal, equivalente a 35-50 mg/kg/día. El cociente más exigente obtenido a partir de estos índices, da un valor Phe/Pr = 12. Este valor es mayor que la cantidad de L-Phe suministrada a partir de las muestras tratadas, con lo cual no constituiría un problema per se.

En resumen, la enzima parcialmente purificada resultó ser una alternativa interesante para la reducción de L-Phe en sustratos de origen proteico. A partir de la optimización de las variables de proceso, se obtuvieron ventajas considerables respecto a las condiciones estándar de reacción.

Si bien se lograron % de reducción elevados, el hecho de colocar enzima en forma soluble en la mezcla de reacción trae aparejado una serie de inconvenientes, a saber:

- Presencia de actividad proteolítica residual en el extracto de PAL parcialmente purificado.
- Pérdida de la enzima. Debido a que la enzima se encuentra en solución, debe ser inactivada para extraerla de la mezcla de reacción. Esto hace que el proceso se vuelva poco rentable, al no poder reutilizar el biocatalizador.

- Hay reportes publicados de que la presencia de enzimas exógenas en alimentos ha provocado algunas reacciones alérgicas.

### 6.4.2. Aplicación del biocatalizador inmovilizado

El biocatalizador consistente en células catalíticas inmovilizadas en esferas de Alg-Ca, se caracterizó previamente para la reducción de L-Phe (Ver Capítulo 5). En este capítulo se aplicará dicho biocatalizador en la reducción de L-Phe en sustratos complejos, empleando como modelo hidrolizados proteicos.

#### 6.4.2.1. Cinética de bioconversión

Como ya se detalló previamente, se emplearon hidrolizados proteicos modelos, a saber: tripticasa de soja (TS), hidrolizado de soja y caseína (CSH), hidrolizado ácido de caseína (CAH) y casaminoácidos (CAAS).

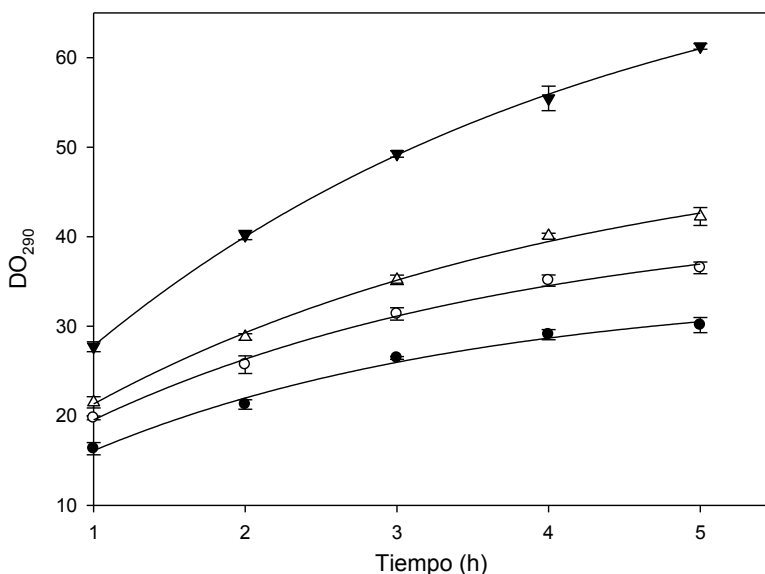


Figura 6.7. Cinética de reacción con sustratos complejos.

Sustratos: TS (●), CSH (○), CAAS (Δ) y CAH (▼). CAH: 35 g/l, biocatalizador: 10 mg/ml equivalente de células catalíticas, pH: 8,5 y temperatura: 50°C.

En la Figura 6.7 podemos observar que las cinéticas de todos los sustratos empleados comienzan a estacionarse en un valor máximo a partir de las 5 h. El hecho que la cinética de reacción no sea lineal, puede deberse a alguna inhibición o bien a que la concentración de L-Phe decreció y, por ende, la velocidad de reacción. Para determinar la razón y debido a la presencia de interferencias, debe

llevarse a cabo la cuantificación de L-Phe por HPLC, en las muestras finales obtenidas.

#### 6.4.2.2. Bioconversión del biocatalizador inmovilizado con sustratos complejos

El contenido de L-Phe en las muestras obtenidas luego de 6 h de tratamiento de los hidrolizados proteicos con células catalíticas inmovilizadas se cuantificó por HPLC. La cuantificación se llevó a cabo mediante contraste con curva patrón de L-Phe (0,9998).

Tabla 6.15. Bioconversión en sustratos proteicos con el biocatalizador inmovilizado. CAH: 35 g/l, biocatalizador: 10 mg/ml equivalente de células catalíticas, pH: 8,5, temperatura: 50°C y tiempo de reacción: 6h.

<i>Tratamiento</i>	<i>L-Phe inicial (<math>\mu\text{mol/l}</math>)</i>	<i>L-Phe final (<math>\mu\text{mol/l}</math>)</i>	<i>% reducción</i>
TS	3240	ND	100
CSH	4270	ND	100
CAH	4890	ND	100
CAAS	4320	ND	100

Como podemos ver en la Tabla 6.15, todos los tratamientos lograron un % de reducción del 100% de L-Phe, luego de 6 h de tratamiento.

A modo de ejemplo, se presenta el cromatograma de CAAS, antes y después del tratamiento (Figura 6.8). En éste, podemos ver la desaparición del pico de L-Phe presente en la muestra original, luego de someter al sustrato al tratamiento propuesto.

A partir de los resultados obtenidos con las células catalíticas inmovilizadas se puede concluir que el biocatalizador obtenido es eficiente en conversión de L-Phe, aun en sustratos complejos. La bioconversión total de la L-Phe libre se logró obtener en 6 h de tratamiento, mejorando contundentemente los tiempos requeridos por la enzima parcialmente purificada en solución. Además, debido a que el biocatalizador se encuentra inmovilizado, puede recuperarse fácilmente de la mezcla de reacción y volverse a utilizar.

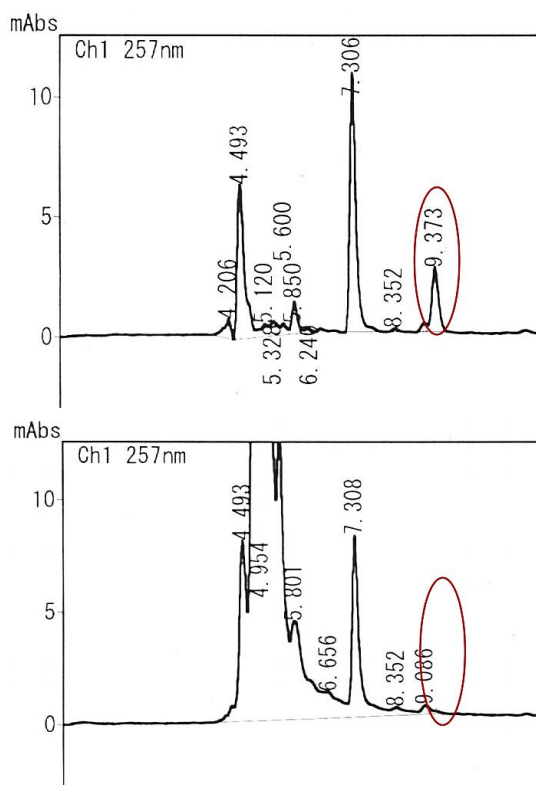


Figura 6.8. Cromatograma de CAAS tratada con el biocatalizador inmovilizado.

Adicionalmente, ni el sustrato ni el producto de reacción son contaminados por el biocatalizador, el cual es retirado de la mezcla de reacción sin dejar residuos. Este hecho reviste importancia para el producto final, ya que cualquier sustancia endógena, podría ocasionar reacciones alérgicas a los consumidores.

Este proceso biotecnológico para la reducción de L-Phe en hidrolizados proteicos puede ser fácilmente incorporado en la línea de producción de hidrolizados proteicos, luego de la inactivación de enzimas proteolítica y la separación de fases. Debido a que PAL actúa sobre la L-Phe libre, se requiere un elevado DH o bien, es posible separar la mezcla de aminoácidos del resto de los péptidos por medio de membranas filtrantes o columnas de filtración en gel. Estos procesos son habituales cuando se intenta estandarizar el hidrolizado en determinados patrones de pesos molecular.

Una alternativa a la adaptación del proceso biotecnológico a los hidrolizados comerciales, es el diseño completo de un hidrolizado proteico obtenido por proteólisis específica, para los fines propuestos. Una alternativa podría ser el uso de quimotripsina como endopeptidasa, específica para Phe, Tyr, Trp (Ver Tabla 6.1), seguido por el tratamiento con exopeptidasas específicas,

como podría ser una carboxipeptidasa A, para liberar la L-Phe. Seguidamente, la L-Phe presente en el hidrolizado, se eliminaría mediante el método biotecnológico propuesto. Esto podría conservar algunos péptidos en el producto final, lo cual es importante para la obtención de un producto con propiedades funcionales más similares a la proteína original.

En definitiva, existen infinitas alternativas a explorar, para la fabricación de hidrolizados proteicos libres en L-Phe, las cuales son factibles de adaptar en las industrias locales.

# Parte V

## *Conclusiones*



# Capítulo 7

## Conclusiones y proyecciones

---

### 6.1. Conclusiones generales

En esta tesis se propuso el desarrollo de un método biotecnológico, para la reducción del contenido de L-Phe en hidrolizados proteicos. Para alcanzar este objetivo, se llevaron a cabo 3 pilares fundamentales: la obtención del biocatalizador, la inmovilización y caracterización del mismo y su aplicación en sustratos proteicos complejos.

En lo que respecta a la obtención del biocatalizador, se logró diseñar un medio de cultivo semi-sintético óptimo para la producción de PAL. Dicho medio se obtuvo a partir de la optimización de sus componentes, resultando ser el  $Mg^{+2}$  el factor más significativo en las mejoras logradas. Con la optimización de las concentraciones de  $Mg^{+2}$  y tiempo de cultivo, se logró mejoras de hasta el 230% en lo que respecta a actividad volumétrica PAL, tomando como referencia un medio de cultivo óptimo reportado previamente. Una vez obtenido el medio, se cultivó la cepa productora y se recuperó el biocatalizador en forma de células catalíticas, mediante permeabilización selectiva de la membrana, por liofilización. Las células obtenidas resultaron tener características óptimas para su empleo como catalizador, a la vez que su tecnología de obtención es sencilla y económica.

El segundo pilar abordado en la tesis fue la inmovilización y caracterización del biocatalizador. Las células catalíticas fueron eficientemente inmovilizadas por atrapamiento en Alg-Ca. El biocatalizador inmovilizado fue caracterizado evidenciando determinadas propiedades que lo hacen apto para su empleo de acuerdo a los fines establecidos. En contraste, la enzima purificada inmovilizada por inclusión en membranas, fue eficiente en la remoción de L-Phe para soluciones diez veces más diluidas, con lo cual se lo descartó para su empleo.

Finalmente, en lo que respecta a la aplicación, el biocatalizador, consistente en células catalíticas inmovilizadas en Alg-Ca, resultó eficiente para la

remoción de L-Phe en hidrolizados proteicos, logrando la completa eliminación de L-Phe libre en 6 h de tratamiento. La enzima parcialmente purificada también logró buenos resultados; sin embargo, la reducción en muchos casos no fue completa y requirió largos períodos de incubación.

Por todo lo expresado anteriormente se concluye que el método biotecnológico diseñado es una alternativa factible, económica y sencilla para la reducción de L-Phe en sustratos proteicos. Este método es fácilmente incorporable a las líneas de producción de hidrolizados proteicos, en las industrias locales.

## 6.2. Conclusiones particulares

A lo largo del desarrollo de la tesis, se pueden extraer una serie de conclusiones particulares, las cuales se mencionan a continuación:

- En lo que respecta a la inducción de PAL, ninguna de las estrategias analizadas resultó eficaz en la producción y estabilización de la enzima. Debido a ello, se concluyó que el sistema batch con inducción durante el crecimiento, es el método más conveniente para la producción de la enzima.
- Las FCE más aptas para la producción de la enzima fueron el sorbitol y la melaza de soja, debido a que permitieron obtener elevadas actividades volumétricas, resultante de una alta actividad específica y una elevada productividad de biomasa. La melaza de soja resultó ser una FCE muy atractiva, ya que constituye un residuo industrial. En cuanto a las FN, no tuvieron influencia considerable en la actividad PAL; sin embargo, se obtuvieron buenos resultados empleando peptona de caseína.
- La utilización de diseños experimentales logró facilitar el análisis de una gran cantidad de variables de forma sencilla, rápida y con un reducido número de experimentos.
- El  $Mg^{+2}$  fue el único componente del medio de cultivo que introdujo mejoras significativas en la actividad PAL. Sin embargo, no se evidenció el efecto estabilizador de PAL, observado durante el almacenamiento de la enzima *in vitro*. Por su parte, el tiempo de cultivo es un parámetro que debe tenerse en cuenta, ya que la actividad específica de la enzima presenta un máximo en la fase exponencial tardía. El medio de cultivo

óptimo desarrollado logró incrementar en hasta 243% la producción de biomasa, 150% la actividad específica de PAL y 230% la actividad volumétrica de PAL.

- En lo que respecta a la recuperación y caracterización del biocatalizador, se logró obtener células catalíticas permeabilizadas mediante liofilización. Esta técnica resultó ser sencilla e inocua para la permeabilización de la cepa en cuestión. Las células permeabilizadas presentan elevada actividad específica, logrando la bioconversión total de una solución de L-Phe 1 mM en menos de 3 h. En cuanto al efecto de la temperatura, las células catalíticas son relativamente estables hasta 60°C, en cortos tiempos de exposición. La temperatura óptima de las mismas resultó cercana a los 50°C, brindando mejoras considerables, respecto a la temperatura de trabajo normal. Adicionalmente, las células resultaron estables durante el almacenamiento en condiciones de refrigeración, manteniendo el 90% de su actividad luego de 5 días.
- El soporte empleado para la inmovilización de las células catalíticas resultó ser de fácil preparación, económico, inocuo y versátil, y su vez, permitió retener un equivalente de hasta 70% de la actividad respecto a la células libres. El biocatalizador inmovilizado resultó ser eficaz para la bioconversión total de soluciones 1 mM de L-Phe en 3 h, empleando bajas concentraciones celulares. En cuanto al efecto de la temperatura, el biocatalizador inmovilizado confiere mayor estabilidad a las células catalíticas, en relación a su estado libre. La temperatura óptima para el sistema inmovilizado es prácticamente la misma que para las células libres. Por otro lado, el biocatalizador inmovilizado logró ser reutilizado reiteradamente sin perder actividad. Sin embargo, en largos tiempos de incubación, el biocatalizador se vio afectado en su estructura, debido a los esfuerzos mecánicos a los que fue expuesto. Por último, las células catalíticas inmovilizadas en Alg-Ca lograron deshidratarse mediante una técnica simple y económica, hasta un 87% de humedad y se almacenaron a temperatura ambiente por extensos períodos de tiempo, manteniendo el 60% de su actividad original, luego de transcurridos 2 años.
- La enzima pura inmovilizada en membranas no logró el desempeño esperado, debido a problemas de índole difusivos. Cambiando el reactor de

columna por el tanque agitado, se lograron eliminar los problemas de difusión externa. Por otra parte, el efecto de la barrera de difusión interna se logró disminuir, mediante la utilización de membranas de menor espesor, logrando así la bioconversión de una solución 0,1 mM de L-Phe en ~5 h. Debido al costo implicado en las múltiples etapas de purificación del biocatalizador, sumado a la necesidad de emplear sustratos diluidos para alcanzar bioconversiones totales en tiempos razonables, se concluyó que este sistema no es aplicable para nuestros propósitos.

- La técnica desarrollada para medir indirectamente la actividad en sustratos complejos, basada en la extracción de *t*-CA con solventes orgánicos y la dilución de hasta 100 veces de la mezcla de reacción, permitió llevar a cabo el seguimiento de la misma, en forma rápida y sencilla.
- Para la enzima parcialmente purificada en solución, se obtuvo una mejora considerable mediante la optimización de los parámetros de reacción, sumado a la incorporación de inhibidores de proteasas. Una vez concretadas estas mejoras, se logró una reducción entre el 80 y 100% de L-Phe en hidrolizados proteicos concentrados, luego de una noche de incubación.
- Finalmente, las células catalíticas inmovilizadas resultaron eficaces en la remoción completa de L-Phe libre en hidrolizados proteicos concentrados, tras 6 h de reacción. El biocatalizador inmovilizado pudo recuperarse fácilmente y reutilizarse nuevamente, ofreciendo claras ventajas respecto a la enzima parcialmente purificada.

### 6.3. Proyecciones futuras

El aporte realizado en esta tesis, es sólo el primer paso para el desarrollo en nuestro país de hidrolizados proteicos libres en L-Phe, aptos para pacientes con PKU.

Como se explicó al final del Capítulo 6, existen amplias alternativas, que tienen que ver con la adecuación del sustrato, las cuales requieren estudios más profundos, que escapan al alcance de esta tesis.

Es fundamental en estos casos, la vinculación con expertos en las áreas de estudio. Nuestro trabajo fue muy enriquecido mediante los valiosos aportes del

Prof. Adachi, Profesor Emérito de la Universidad de Yamaguchi, con el cual tuve la oportunidad de trabajar reiteradamente, tanto en el CINDEFI, como en su laboratorio en Japón.

Dado que la temática está directamente relacionada con la medicina, y teniendo en cuenta nuestras limitaciones en este campo, nos contactamos oportunamente con el Dr. Osvaldo Borrajo, quien se despeña como Director del Programa de Detección de Errores Congénitos del Metabolismo en la Fundación Bioquímica Argentina. El Dr. Borrajo nos viene asesorando en cuestiones vinculadas a PKU, desde hace ya un par de años. Actualmente, nos encontramos trabajando en conjunto en el desarrollo de materiales de referencia para la pesquisa neonatal de PKU, empleando PAL inmovilizada [135].

PAL tiene mucho potencial relacionado a PKU, tanto en cuestiones vinculadas al tratamiento clínico, como en la producción de sustitutos dietarios. Para el abordaje de estos temas, considero fundamental la formación de un grupo de trabajo multidisciplinario.



# Bibliografía

---

- [1] Ministerio de Salud (2015). *Anomalías congénitas: Enfoque para la Atención Primaria de la Salud*. Recuperado de <http://www.msal.gov.ar/congenitas/wp-content/uploads/sites/2/2015/02/manual-epf.pdf>.
- [2] Registro Nacional de Anomalías Congénitas de Argentina (2014). *Análisis epidemiológico sobre las anomalías congénitas en recién nacidos, registradas durante 2013 en la república Argentina*. Recuperado de [http://www.msal.gob.ar/images/stories/bes/graficos/0000000581cnt-reporte\\_operativo\\_renac\\_2014.pdf](http://www.msal.gob.ar/images/stories/bes/graficos/0000000581cnt-reporte_operativo_renac_2014.pdf).
- [3] Asociación Fenilcetonuria Argentina (2015). *Fenilcetonuria: ¿Qué es?*. Recuperado de [http://www.fenilcetonuria.org/que\\_es/que\\_es.html](http://www.fenilcetonuria.org/que_es/que_es.html).
- [4] Asociación Fenilcetonuria Argentina (2015). *Fenilcetonuria: Legislación*. Recuperado de <http://www.fenilcetonuria.org/legislacion/legislacion.html#>
- [5] Asociación Fenilcetonuria Argentina (2015). *Banco de Alimentos*. Recuperado de [http://www.fenilcetonuria.org/imagenes/carta\\_banco\\_alimentos.jpg](http://www.fenilcetonuria.org/imagenes/carta_banco_alimentos.jpg).
- [6] Cleary, M. A. (2015). Phenylketonuria. *Paediatrics and Child Health*, 25(3), 108-112.
- [7] Soltanizadeh, N., & Mirmoghtadaie, L. (2014). Strategies Used in Production of Phenylalanine-Free Foods for PKU Management. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(3), 287-299.
- [8] Illanes, A. (Ed.). (2008). *Enzyme biocatalysis: principles and applications*. Springer Science & Business Media.
- [9] Whitehurst, R. J., & Van Oort, M. (Eds.). (2010). *Enzymes in food technology* (Vol. 388). Chichester: Wiley-Blackwell.
- [10] Buchholz, K., Kasche, V., & Bornscheuer, U. T. (2012). *Biocatalysts and enzyme technology*. John Wiley & Sons.
- [11] Aehle, W. (Ed.). (2006). *Enzymes in industry: products and applications*. John Wiley & Sons.
- [12] Copeland, R. A. (2000). *Enzymes: a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis*. John Wiley & Sons.

- [13] Brown, A. J. (1902). Enzyme action. *Journal of the chemical society, transactions*, 81, 373-388.
- [14] Dutta, R. (2008). *Fundamentals of biochemical engineering* (pp. 198-220). India: Ane Books India.
- [15] Michaelis, L., & Menten, M. L. (1913). Die kinetik der invertinwirkung. *Biochem. z*, 49(333-369), 352.
- [16] Briggs, G. E., & Haldane, J. B. S. (1925). A note on the kinetics of enzyme action. *Biochemical journal*, 19(2), 338.
- [17] Whitaker, J. R., Voragen, A. G., & Wong, D. W. (2003). *Handbook of food enzymology*. Marcel Dekker.
- [18] Cleland, W. (1963). The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products: I. Nomenclature and rate equations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Specialized Section on Enzymological Subjects*, 67, 104-137.
- [19] Marangoni, A. G. (2003). *Enzyme kinetics: a modern approach*. John Wiley & Sons.
- [20] Lineweaver, H., & Burk, D. (1934). The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of the American Chemical Society*, 56(3), 658-666.
- [21] Tejeda, A., Rosa María Montesinos C., & Guzmán, R. (2011). *Bioseparaciones*. Pearson.
- [22] Straathof, A. J., & Adlercreutz, P. (Eds.). (2000). *Applied biocatalysis*. CRC Press.
- [23] Nip, W. K., Nollet, L. M., Paliyath, G., & Simpson, B. K. (2008). *Food biochemistry and food processing*. Y. H. Hui (Ed.). John Wiley & Sons.
- [24] Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (2015). *Orthology: Phenylalanine ammonia-lyase and phenylalanine/tyrosine ammonia-lyase*. Recuperado de [http://www.genome.jp/dbget-bin/www\\_bget?ec:4.3.1.25](http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?ec:4.3.1.25).
- [25] Kong, J. Q. (2015). Phenylalanine ammonia-lyase, a key component used for phenylpropanoids production by metabolic engineering. *RSC Advances*, 5(77), 62587-62603.
- [26] Hemmati, S. (2015). Phenylalanine ammonia-lyase through evolution: A bioinformatic approach. *Trends in Pharmaceutical Sciences*, 1(1), 10-14.

- [27] Emiliani, G., Fondi, M., Fani, R., & Gribaldo, S. (2009). A horizontal gene transfer at the origin of phenylpropanoid metabolism: a key adaptation of plants to land. *Biol Direct*, 4(7).
- [28] Koukol, J., & Conn, E. E. (1961). The metabolism of aromatic compounds in higher plants IV. Purification and properties of the phenylalanine deaminase of *Hordeum vulgare*. *Journal of Biological Chemistry*, 236(10), 2692-2698.
- [29] Cui, J. D., Qiu, J. Q., Fan, X. W., Jia, S. R., & Tan, Z. L. (2014). Biotechnological production and applications of microbial phenylalanine ammonia lyase: a recent review. *Critical reviews in biotechnology*, 34(3), 258-268.
- [30] Ogata, K., Uchiyama, K., & Yamada, H. (1966). Microbial formation of cinnamic acid from phenylalanine. *Agricultural and Biological Chemistry*, 30(3), 311-312.
- [31] Ogata, K., Uchiyama, K., & Yamada, H. (1967). Metabolism of Aromatic Amino Acid in Microorganisms: Part I. Formation of Cinnamic Acid from Phenylalanine. *Agricultural and Biological Chemistry*, 31(2), 200-206.
- [32] Moore, K., Rao, P. S., & Towers, G. H. N. (1967). Degradation of phenylalanine and tyrosine by *Basidiomycetes*. *Life sciences*, 6(24), 2629-2633.
- [33] Bezanson, G. S., Desaty, D., Emes, A. V., & Vining, L. C. (1970). Biosynthesis of cinnamamide and detection of phenylalanine ammonia-lyase in *Streptomyces verticillatus*. *Canadian journal of microbiology*, 16(3), 147-151.
- [34] Williams, J. S., Thomas, M., & Clarke, D. J. (2005). The gene *stlA* encodes a phenylalanine ammonia-lyase that is involved in the production of a stilbene antibiotic in *Photorehabdus luminescens* TT01. *Microbiology*, 151(8), 2543-2550.
- [35] Berner, M., Krug, D., Bihlmaier, C., Vente, A., Müller, R., & Bechthold, A. (2006). Genes and enzymes involved in caffeic acid biosynthesis in the actinomycete *Saccharothrix espanaensis*. *Journal of bacteriology*, 188(7), 2666-2673.

- [36] Calabrese, J. C., Jordan, D. B., Boodhoo, A., Sariaslani, S., & Vannelli, T. (2004). Crystal structure of phenylalanine ammonia lyase: multiple helix dipoles implicated in catalysis. *Biochemistry*, *43*(36), 11403-11416.
- [37] Hyun, M. W., Yun, Y. H., Kim, J. Y., & Kim, S. H. (2011). Fungal and plant phenylalanine ammonia-lyase. *Mycobiology*, *39*(4), 257-265.
- [38] Hodgins, D. S. (1971). Yeast phenylalanine ammonia-lyase purification, properties, and the identification of catalytically essential dehydroalanine. *Journal of Biological Chemistry*, *246*(9), 2977-2985.
- [39] Fritz, R. R., Hodgins, D. S., & Abell, C. W. (1976). Phenylalanine ammonia-lyase. Induction and purification from yeast and clearance in mammals. *Journal of Biological Chemistry*, *251*(15), 4646-4650.
- [40] Abell, C. W., & Shen, R. S. (1987). [31] Phenylalanine ammonia-lyase from the yeast *Rhodotorula glutinis*. *Methods in enzymology*, *142*, 242-248.
- [41] Adachi, O., Matsushita, K., Shinagawa, E., & Ameyama, M. (1990). Crystallization and properties of L-phenylalanine ammonia-lyase from *Rhodospiridium toruloides*. *Agricultural and biological chemistry*, *54*(11), 2839-2843.
- [42] D'Cunha, G. B., Satyanarayan, V., & Nair, P. M. (1996). Purification of phenylalanine ammonia lyase from *Rhodotorula glutinis*. *Phytochemistry*, *42*(1), 17-20.
- [43] MacDonald, M. J., & D'Cunha, G. B. (2007). A modern view of phenylalanine ammonia lyase. *Biochemistry and Cell Biology*, *85*(3), 273-282.
- [44] Louie, G. V., Bowman, M. E., Moffitt, M. C., Baiga, T. J., Moore, B. S., & Noel, J. P. (2006). Structural determinants and modulation of substrate specificity in phenylalanine-tyrosine ammonia-lyases. *Chemistry & biology*, *13*(12), 1327-1338.
- [45] Baedeker, M., & Schulz, G. E. (2002). Autocatalytic peptide cyclization during chain folding of histidine ammonia-lyase. *Structure*, *10*(1), 61-67.
- [46] Givot, I. L., Smith, T. A., & Abeles, R. H. (1969). Studies on the mechanism of action and the structure of the electrophilic center of histidine ammonia lyase. *Journal of Biological Chemistry*, *244*(23), 6341-6353.

- [47] Schuster, B., & Rétey, J. (1995). The mechanism of action of phenylalanine ammonia-lyase: the role of prosthetic dehydroalanine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(18), 8433-8437.
- [48] Gloge, A., Langer, B., Poppe, L., & Rétey, J. (1998). The behavior of substrate analogues and secondary deuterium isotope effects in the phenylalanine ammonia-lyase reaction. *Archives of biochemistry and biophysics*, 359(1), 1-7.
- [49] Langer, B., Langer, M., & Rétey, J. (2001). Methylidene-imidazolone (MIO) from histidine and phenylalanine ammonia-lyase. *Advances in protein chemistry*, 58, 175-214.
- [50] Alunni, S., Cipiciani, A., Fioroni, G., & Ottavi, L. (2003). Mechanisms of inhibition of phenylalanine ammonia-lyase by phenol inhibitors and phenol/glycine synergistic inhibitors. *Archives of biochemistry and biophysics*, 412(2), 170-175.
- [51] Havir, E. A., & Hanson, K. R. (1968). L-Phenylalanine ammonia-lyase. II. Mechanism and kinetic properties of the enzyme from potato tubers. *Biochemistry*, 7(5), 1904-1914.
- [52] 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(5), 773-778.
- [53] Evans, C. T., Hanna, K., Payne, C., Conrad, D., & Misawa, M. (1987). Biotransformation of *trans*-cinnamic acid to L-phenylalanine: Optimization of reaction conditions using whole yeast cells. *Enzyme and microbial technology*, 9(7), 417-421.
- [54] Jia, S. R., Cui, J. D., Li, Y., & Sun, A. Y. (2008). Production of L-phenylalanine from *trans*-cinnamic acids by high-level expression of phenylalanine ammonia lyase gene from *Rhodospiridium toruloides* in *Escherichia coli*. *Biochemical Engineering Journal*, 42(3), 193-197.
- [55] D'Cunha, G. B., Satyanarayan, V., & Nair, P. M. (1996). Stabilization of phenylalanine ammonia lyase containing *Rhodotorula glutinis* cells for the continuous synthesis of L-phenylalanine methyl ester/96. *Enzyme and Microbial Technology*, 19(6), 421-427.

- [56] Nakamichi, K., Nabe, K., Yamada, S., & Chibata, I. (1983). Induction and stabilization of L-phenylalanine ammonia-lyase activity in *Rhodotorula glutinis*. *European journal of applied microbiology and biotechnology*, 18(3), 158-162.
- [57] Gilbert, H. J., & Tully, M. I. C. H. A. E. L. (1982). Synthesis and degradation of phenylalanine ammonia-lyase of *Rhodospiridium toruloides*. *Journal of bacteriology*, 150(2), 498-505.
- [58] D'Cunha, G. B. (2005). Enrichment of phenylalanine ammonia lyase activity of *Rhodotorula* yeast. *Enzyme and microbial technology*, 36(4), 498-502.
- [59] Buck, J. W., & Andrews, J. H. (1999). Attachment of the yeast *Rhodospiridium toruloides* is mediated by adhesives localized at sites of bud cell development. *Applied and environmental microbiology*, 65(2), 465-471.
- [60] NITE Biological Resource Center (2015). *Catalogue Detail Information*. Recuperado de <http://www.straininfo.net/strains/336029/browser>.
- [61] Meng, X., Yang, J., Xu, X., Zhang, L., Nie, Q., & Xian, M. (2009). Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable energy*, 34(1), 1-5.
- [62] Guamán-Burneo, C., & Carvajal-Barriga, J. (2009). Caracterización e identificación de aislados de levaduras carotenogénicas de varias zonas naturales del Ecuador. *Universitas Scientiarum*, 14(2-3), 187-197.
- [63] National Collection of Yeast Cultures (2015). *Rhodospiridium toruloides*. Recuperado de <https://catalogue.ncyc.co.uk/rhodospiridium-toruloides-1576>.
- [64] Bio-Omics (2015). *Rhodospiridium toruloides*. Recuperado de <http://bio-omics.ex.ac.uk/home/rhodo>.
- [65] López-Gálvez, G., Saltveit, M., & Cantwell, M. (1996). Wound-induced phenylalanine ammonia lyase activity: factors affecting its induction and correlation with the quality of minimally processed lettuces. *Postharvest Biology and Technology*, 9(2), 223-233.
- [66] Abell, C. W., Stith, W. J., & Hodgins, D. S. (1972). The effects of phenylalanine ammonia-lyase on leukemic lymphocytes in vitro. *Cancer research*, 32(2), 285-290.

- [67] Abell, C. W., Hodgins, D. S., & Stith, W. J. (1973). An *in vivo* evaluation of the chemotherapeutic potency of phenylalanine ammonia-lyase. *Cancer research*, 33(10), 2529-2532.
- [68] Wang, Z., Chen, Y. Z., Zhang, S., & Zhou, Z. (2006, January). Investigation of a phenylalanine-biosensor system for phenylketonuria detection. In *Engineering in Medicine and Biology Society, 2005. IEEE-EMBS 2005. 27th Annual International Conference of the* (pp. 1913-1916). IEEE.
- [69] Sarkissian, C. N., Shao, Z., Blain, F., Peevers, R., Su, H., Heft, R., ... & Scriver, C. R. (1999). A different approach to treatment of phenylketonuria: phenylalanine degradation with recombinant phenylalanine ammonia lyase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(5), 2339-2344.
- [70] Liu, J., Jia, X., Zhang, J., Xiang, H., Hu, W., & Zhou, Y. (2002). Study on a novel strategy to treatment of phenylketonuria. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 30(4), 243-257.
- [71] Sarkissian, C. N., Gámez, A., Wang, L., Charbonneau, M., Fitzpatrick, P., Lemontt, J. F., ... & Lambert, A. (2008). Preclinical evaluation of multiple species of PEGylated recombinant phenylalanine ammonia lyase for the treatment of phenylketonuria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(52), 20894-20899.
- [72] Sarkissian, C. N., Kang, T. S., Gámez, A., Scriver, C. R., & Stevens, R. C. (2011). Evaluation of orally administered PEGylated phenylalanine ammonia lyase in mice for the treatment of Phenylketonuria. *Molecular genetics and metabolism*, 104(3), 249-254.
- [73] Longo, N., Harding, C. O., Burton, B. K., Grange, D. K., Vockley, J., Wasserstein, M., ... & Gu, Z. (2014). Single-dose, subcutaneous recombinant phenylalanine ammonia lyase conjugated with polyethylene glycol in adult patients with phenylketonuria: an open-label, multicentre, phase 1 dose-escalation trial. *The Lancet*, 384(9937), 37-44.
- [74] Devlin, T. M. (1997). *Textbook of biochemistry with clinical correlations*. John Wiley & Sons.
- [75] Castañeda, M. T., Adachi, O., & Hours, R. A. (2015). Reduction of L-phenylalanine in protein hydrolysates using l-phenylalanine ammonia-

- lyase from *Rhodospiridium toruloides*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 42(10), 1299-1307.
- [76] Kim, W., Erlandsen, H., Surendran, S., Stevens, R. C., Gamez, A., Michols-Matalon, K., ... & Matalon, R. (2004). Trends in enzyme therapy for phenylketonuria. *Molecular Therapy*, 10(2), 220-224.
- [77] Martínez-Pardo, M., Bélanger-Quintana, A., García Muñoz, M. J., Desviat, L., Pérez, B., & Ugarte, M. F. (1998). Protocolo de diagnóstico, tratamiento y seguimiento de las hiperfenilalaninemias. *An Esp Pediatr*, 114, 3-8.
- [78] Surtees, R., & Blau, N. (2000). The neurochemistry of phenylketonuria. *European Journal of Pediatrics*, 159(2), S109-S113.
- [79] Borrajo, G. J. (2012). Panorama epidemiológico de la fenilcetonuria (PKU) en Latinoamérica. *Acta Pediátrica de México*, 33(6), 279-287.
- [80] Williams, R. A., Mamotte, C. D., & Burnett, J. R. (2008). Phenylketonuria: an inborn error of phenylalanine metabolism. *metabolism*, 12, 13.
- [81] Campistol, J., Gassio, R., Artuch, R., & Vilaseca, M. A. (2011). Neurocognitive function in mild hyperphenylalaninemia. *Developmental Medicine & Child Neurology*, 53(5), 405-408.
- [82] Feillet, F., van Spronsen, F. J., MacDonald, A., Trefz, F. K., Demirkol, M., Giovannini, M., ... & Blau, N. (2010). Challenges and pitfalls in the management of phenylketonuria. *Pediatrics*, 126(2), 333-341.
- [83] MacDonald, A. (1999). *The dietary management of phenylketonuria* (Doctoral dissertation, The University of Birmingham).
- [84] Guthrie, R., & Susi, A. (1963). A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics*, 32(3), 338-343.
- [85] Bhattacharya, K., Wotton, T., & Wiley, V. (2014). The evolution of blood-spot newborn screening. *Translational Pediatrics*, 3(2), 63-70.
- [86] Ahring, K., Bélanger-Quintana, A., Dokoupil, K., Ozel, H. G., Lammardo, A. M., MacDonald, A., ... & van Rijn, M. (2009). Dietary management practices in phenylketonuria across European centres. *Clinical nutrition*, 28(3), 231-236.
- [87] Vockley, J., Andersson, H. C., Antshel, K. M., Braverman, N. E., Burton, B. K., Frazier, D. M., ... & Berry, S. A. (2013). Phenylalanine hydroxylase

- deficiency: diagnosis and management guideline. *Genetics in Medicine*, 16(2), 188-200.
- [88] MacDonald, A., Harris, G., Rylance, G., Asplin, D., & Booth, I. W. (1997). Abnormal feeding behaviours in phenylketonuria. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, 10(3), 163-170.
- [89] MacDonald, A. (2000). Diet and compliance in phenylketonuria. *European Journal of Pediatrics*, 159(2), S136-S141.
- [90] Aguiar, A., Ahring, K., Almeida, M. F., Assoun, M., Quintana, A. B., Bigot, S., ... & Caris, A. (2015). Practices in prescribing protein substitutes for PKU in Europe: No uniformity of approach. *Molecular genetics and metabolism*, 115(1), 17-22.
- [91] Ney, D. M., Gleason, S. T., Van Calcar, S. C., MacLeod, E. L., Nelson, K. L., Etzel, M. R., ... & Wolff, J. A. (2009). Nutritional management of PKU with glycomacropeptide from cheese whey. *Journal of inherited metabolic disease*, 32(1), 32-39.
- [92] van Spronsen, F. J., de Groot, M. J., Hoeksma, M., Reijngoud, D. J., & van Rijn, M. (2010). Large neutral amino acids in the treatment of PKU: from theory to practice. *Journal of inherited metabolic disease*, 33(6), 671-676.
- [93] Fang, B., Eisensmith, R. C., Li, X. H., Finegold, M. J., Shedlovsky, A., Dove, W., & Woo, S. L. (1994). Gene therapy for phenylketonuria: phenotypic correction in a genetically deficient mouse model by adenovirus-mediated hepatic gene transfer. *Gene therapy*, 1(4), 247-254.
- [94] Weiss, B., Hui, M., & Lajtha, A. (1977). Entrapment of phenylalanine hydroxylase in a polyacrylamide matrix. *Biochemical medicine*, 18(3), 330-343.
- [95] Levy, H. L. (1999). Phenylketonuria: old disease, new approach to treatment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(5), 1811-1813.
- [96] Hoskins, J., Jack, G., Peiris, R. D., Starr, D. T., Wade, H., Wright, E., & Stern, J. (1980). Enzymatic control of phenylalanine intake in phenylketonuria. *The Lancet*, 315(8165), 392-394.
- [97] Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J., Fernández, M. G., Fernández, C. R., & Pérez, M. S. (2004). *Brock Biología de los microorganismos* (Vol. 10). Prentice hall.

- [98] Bamforth, C. W. (2008). *Food, fermentation and micro-organisms*. John Wiley & Sons.
- [99] Ertola, R., Yantorno, O., & Mignone, C. (2010). Medios de fermentación. *Monografía. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico de la OEA*. <http://www.biologia.edu.ar/microind/medios.htm>. Consultado, 68-74.
- [100] Badii, M. H., Castillo, J., Rodríguez, M., Wong, A., & Villalpando, P. (2007). Diseños experimentales e investigación científica (Experimental designs and scientific research).
- [101] Vander Heyden, Y., Nijhuis, A., Smeyers-Verbeke, J., Vandeginste, B. G. M., & Massart, D. L. (2001). Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 24(5), 723-753.
- [102] Lundstedt, T., Seifert, E., Abramo, L., Thelin, B., Nyström, Å., Pettersen, J., & Bergman, R. (1998). Experimental design and optimization. *Chemometrics and intelligent laboratory systems*, 42(1), 3-40.
- [103] Plackett, R. L., & Burman, J. P. (1946). The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika*, 33(4), 305-325.
- [104] Ferré, J. (2004). El diseño factorial completo 2k. *Técnicas de Laboratorio*, 292, 430-434.
- [105] Box, G. E., & Draper, N. R. (2007). *Response surfaces, mixtures, and ridge analyses* (Vol. 649). John Wiley & Sons.
- [106] Doehlert, D. H. (1970). Uniform shell designs. *Applied statistics*, 231-239.
- [107] Dong, F. (1993). On the identification of active contrasts in unreplicated fractional factorials. *Statistica Sinica*, 209-217.
- [108] Šidák, Z. (1967). Rectangular confidence regions for the means of multivariate normal distributions. *Journal of the American Statistical Association*, 62(318), 626-633.
- [109] Fiechter, A. (1984). *Physical and chemical parameters of microbial growth* (pp. 7-60). Springer Berlin Heidelberg.
- [110] Marusich, W. C., Jensen, R. A., & Zamir, L. O. (1981). Induction of L-phenylalanine ammonia-lyase during utilization of phenylalanine as a carbon or nitrogen source in *Rhodotorula glutinis*. *Journal of bacteriology*, 146(3), 1013-1019.

- [111] Wall, M. J., Quinn, A. J., & D’Cunha, G. B. (2008). Manganese (Mn<sup>2+</sup>)-dependent storage stabilization of *Rhodotorula glutinis* phenylalanine ammonia-lyase activity. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(3), 894-902.
- [112] Box, G. E., & Draper, N. R. (1987). *Empirical model-building and response surfaces* (Vol. 424). New York: Wiley.
- [113] Flores, M. V., Voget, C. E., & Ertola, R. J. J. (1994). Permeabilization of yeast cells (*Kluyveromyces lactis*) with organic solvents. *Enzyme and Microbial Technology*, 16(4), 340-346.
- [114] Felix, H. (1982). Permeabilized cells. *Analytical biochemistry*, 120(2), 211-234.
- [115] Felix, H. (1990). Bioconversions in permeabilized cells. *Extractive Bioconversions*, 259-278.
- [116] Food and drugs administration (2015). *Code of Federal Regulations*. <http://www.fda.gov/food/ingredientspackaginglabeling/foodadditivesingredients/ucm091048.htm>
- [117] Arroyo, M. (1998). Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharmaceutica*, 39(2), 23-39.
- [118] Evans, C. T., Conrad, D., Hanna, K., Peterson, W., Choma, C., & Misawa, M. (1987). Novel stabilization of phenylalanine ammonia-lyase catalyst during bioconversion of *trans*-cinnamic acid to L-phenylalanine. *Applied microbiology and biotechnology*, 25(5), 399-405.
- [119] Zhang, Y., Jia, X., Wang, L., Liu, J., & Ma, G. (2011). Preparation of Calcium alginate microparticles and its application for phenylketonuria oral therapy. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 50(7), 4106-4112.
- [120] Larue, C., Munnich, A., Charpentier, C., Saudubray, J. M., Frezal, J., Remy, M. H., & Rivat, C. (1985). An extracorporeal hollow-fiber reactor for phenylketonuria using immobilized phenylalanine ammonia lyase. *Developmental pharmacology and therapeutics*, 9(2), 73-81.
- [121] Ambrus, C. M., Anthone, S., Horvath, C., Kalghatgi, K., Lele, A. S., Eapen, G., ... & Li, P. (1987). Extracorporeal enzyme reactors for depletion of phenylalanine in phenylketonuria. *Annals of internal medicine*, 106(4), 531-537.

- [122] Ambrus, C. M., Sharma, S. D., Horváth, C. S. A. B. A., Kalghatgi, K. R. I. S. H. N. A., Anthone, S. I. D. N. E. Y., Ambrus, J. L., ... & Mirand, E. A. (1983). In vivo safety of hollow fiber enzyme-reactors with immobilized phenylalanine ammonia-lyase in a large animal model for phenylketonuria. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 224(3), 598-602.
- [123] Pasupuleti, V. K., Holmes, C., & Demain, A. L. (2008). Applications of protein hydrolysates in biotechnology. In *Protein Hydrolysates in Biotechnology* (pp. 1-9). Springer Netherlands.
- [124] Neklyudov, A. D., Ivankin, A. N., & Berdutina, A. V. (2000). Properties and uses of protein hydrolysates (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 36(5), 452-459.
- [125] Benítez, R., Ibarz, A., & Pagan, J. (2008). Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 42(2), 227-236.
- [126] Clemente, A. (2000). Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends in Food Science & Technology*, 11(7), 254-262.
- [127] Pasupuleti, V. K., & Braun, S. (2008). State of the art manufacturing of protein hydrolysates. In *Protein hydrolysates in biotechnology* (pp. 11-32). Springer Netherlands.
- [128] Guadix, A., Guadix, E. M., Dueñas, M. P., González-Tello, P., & Camacho, F. (2000). Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. *Ars Pharmaceutica*, 41(1), 79-89.
- [129] Berry, H. K., Sutherland, B. S., Hunt, M. M., Fogelson, M. H., & O'Grady, D. (1976). Treatment of children with phenylketonuria using a phenylalanine-free protein hydrolysate (Albumaid XP). *The American journal of clinical nutrition*, 29(4), 351-357.
- [130] Acosta, P. B., Yannicelli, S., Marriage, B., Mantia, C., Gaffield, B., Porterfield, M., ... & Kuehn, M. (1998). Nutrient intake and growth of infants with phenylketonuria undergoing therapy. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 27(3), 287-291.
- [131] Heindorff, M., Becker, M., Schuster, W., Bruegmann, F., & Fiedrich, M. Manufacture of phenylalanine-free protein hydrolysates. *East German Patent DD*, 262(674), 07.

- [132] Matsuo, T., Hashimoto, Y., & Arai, S. (1986). Preparation of paptides with low content of phenylalanine for the treatment of phenylketonuria. *Japonese Patent*, 6168426(08), 04.
- [133] Sharma, O. P., Bhat, T. K., & Singh, B. (1998). Thin-layer chromatography of gallic acid, methyl gallate, pyrogallol, phloroglucinol, catechol, resorcinol, hydroquinone, catechin, epicatechin, cinnamic acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid and tannic acid. *Journal of Chromatography A*, 822(1), 167-171.
- [134] Atherton, N. D., & Green, A. (1988). HPLC measurement of phenylalanine in plasma. *Clinical chemistry*, 34(11), 2241-2244.
- [135] Borrajo, G., Castañeda, M. & Hours, R. (2015). Obtention of Low Phenylalanine Whole Blood for Preparation of Reference Materials and Calibrators for Newborn Screening Using Phenylalanine ammonia lyase. *X Congreso Latinoamericano de Errores Innatos del Metabolismo y Pesquisa Neonatal (SLEIMPN)*.



# *Anexos*



# Anexo 1

## Correlación DO<sub>660</sub>-peso seco

Para la determinación de la correlación entre el peso seco de la biomasa y la medida de DO, se llevó a cabo una cinética de crecimiento y se extrajeron muestras a diferentes tiempos por duplicado. A cada muestra se le determinó, por un lado, la DO a 660 nm, empleando un espectrofotómetro Beckman modelo DU, llevando a cabo las diluciones necesarias para que la muestra se encuentre en un rango de DO = 0,1-0,7, donde se cumple la ley de Beer de proporcionalidad entre DO y concentración. Por otro lado se determinó el peso seco de la muestra, lavando la biomasa tres veces con agua destilada para eliminar restos de medio de cultivo, y finalmente colocando 1 ml de cada muestra en un recipiente previamente tarado. Estos recipientes se colocan en estufa a 100°C por 24 h hasta peso constante. La diferencia entre el peso total y la tara del recipiente, es el peso seco. Con estas dos medidas se construye una curva de calibración como se muestra a continuación:

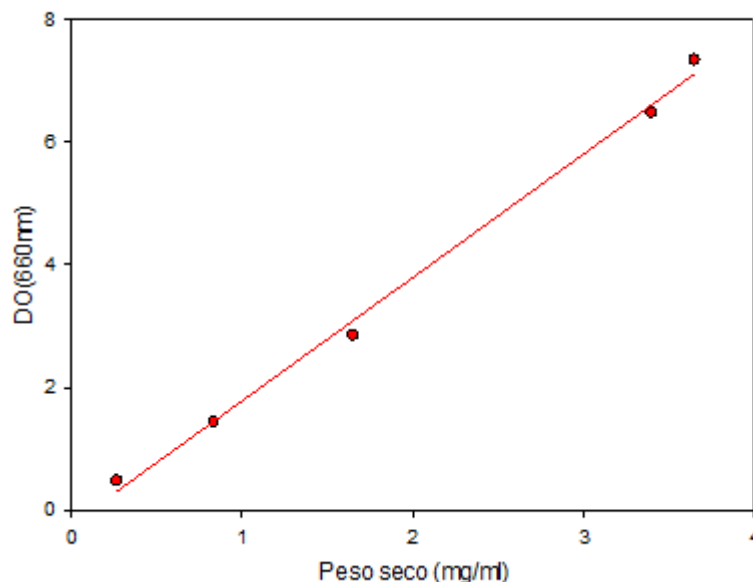


Figura A1. Curva de calibración DO<sub>660</sub> y peso seco.

$$\text{Correlación: } y=1,9315 x \text{ (R}^2=0,9936)$$



# Anexo 2

## Recuento en cámara de Neubauer

---

Para la estandarización del inóculo, se suele preparar una suspensión celular sobre la cual se lleva a cabo el recuento de unidades formadoras de colonias en cámara de Neubauer. Este término no es el más adecuado en este caso, ya que el recuento efectuado es total, por lo tanto incluye células que pudieran estar muertas. Para un recuento más preciso puede llevarse a cabo la tinción con azul de metileno, la cual colorea las células muertas, con lo cual puede determinarse la viabilidad. Sin embargo en células frescas (no más de una semana) la viabilidad es más del 99%, con lo cual puede obviarse este paso.

La cámara de Neubauer es una placa gruesa en forma de portaobjeto, la cual en general presenta dos retículas de recuento, una superior y una inferior, separadas por una ranura de rebalse (Figura A2).

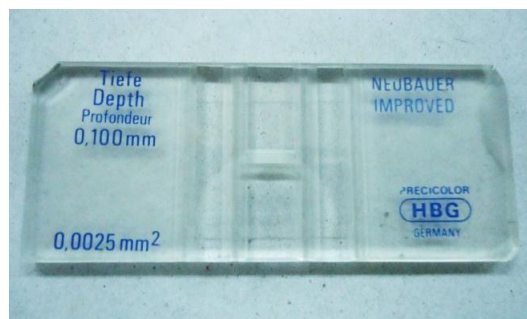


Figura A2. Cámara de Neubauer.

Cada una de las retículas mide  $3 \times 3$  mm y contiene 9 rectángulos de  $1 \times 1$  mm (Figura A3). El rectángulo del centro es el más usado para recuento de levaduras. En las cámaras más comunes, dichos rectángulos están formados por 25 cuadrados pequeños de  $0,2 \times 0,2$  mm, que son los que se observan al microscopio a un aumento de  $40\times$ . Si la dispersión celular es buena, es suficiente con contar 5 de los 25 cuadrados pequeños de cada retícula (cuatro cuadrados de los vértices y el central) y multiplicarlos el valor obtenido por 5.

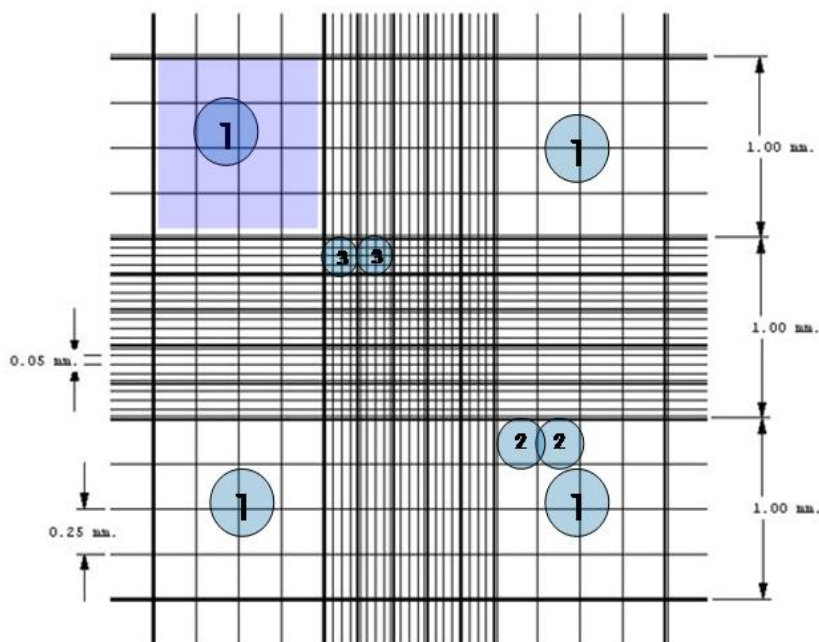


Figura A3. Zona de recuento de la cámara de Neubauer.

El procedimiento de recuento implica hacer diluciones seriadas de la dispersión celular (generalmente 1:100) y cargar la placa por capilaridad, apoyando la punta de la pipeta sobre el cubreobjeto aplicado sobre las zonas de recuento. Una vez enfocado el campo óptico sobre los cuadrados pequeños se cuentan todas las células que están delimitados por las triples líneas. En caso de que las células toquen las líneas que delimitan el cuadrado se toma como convención contar aquellas que tocan la línea del centro para adentro. Las levaduras gemadas, se cuentan como dos, solo en el caso de que la hija sea del mismo tamaño que la madre.

La cantidad de UFC/ ml se calcula de la siguiente manera:

- Cantidad de células contadas: es el promedio de ambos campos de recuento.

$$\bar{X} = (5 X_1 + 5 X_2)/2$$

- Volumen de zona de recuento:

$$V = \text{Superficie} * \text{espesor}$$

$$V = (0,1 \text{ cm})^2 * 0,01 \text{ cm} = 10^{-4} \text{ cm}^3$$

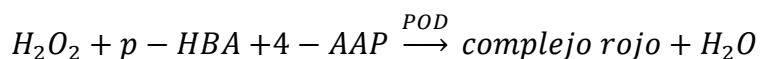
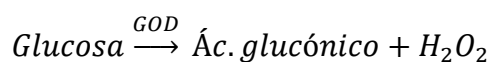
- Recuento total:

$$\text{Concentración} \left( \frac{\text{UFC}}{\text{ml}} \right) = \frac{\bar{X}}{V} f d$$

# Anexo 3

## Curva de calibración de glucosa

La determinación de glucosa se lleva a cabo mediante kit enzimático Thermo Scientific. Este kit colorimétrico está compuesto por las enzimas glucosa oxidasa/peroxidasa (GOD/POD), las cuales reaccionan con la glucosa presente en el medio formando ácido glucónico y liberando peróxido de hidrógeno. Posteriormente, el peróxido de hidrógeno reacciona con el ácido *p*-hidroxibenzoico y la 4 aminoantipirina, dando como resultado un complejo rojo, cuya intensidad es proporcional a la cantidad de glucosa presente en la muestra.



Los reactivos con los patrones se incuban a 37°C por 10 min, y el color se mide espectrofotométricamente a 505 nm.

Es recomendable hacer una curva de calibración junto con las muestras, ya que pequeñas variaciones en las condiciones de reacción, o bien en el estado de los reactivos, pueden influir mucho en los resultados. Una curva patrón tipo, se muestra a continuación:

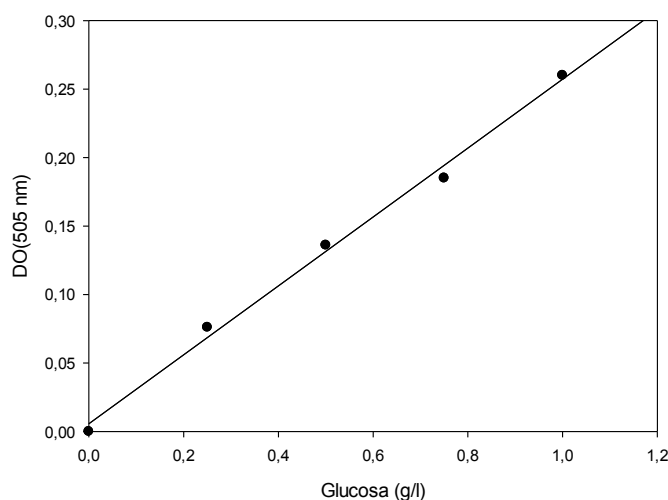


Figura A4. Curva de calibración de glucosa.

Correlación:  $y = 0,2591x$  ( $R^2 = 0,9936$ )



# Anexo 4

## Determinación de $\mu$ y $T_d$

---

Los parámetros  $\mu$  y  $T_d$  son útiles a la hora de comparar diferentes curvas de crecimiento, ya que permiten determinar la velocidad a la cual se está produciendo biomasa. Dentro de la curva de crecimiento de un microorganismo en un sistema batch, la etapa de mayor producción de biomasa es la fase de crecimiento exponencial. En dicha fase se cumple lo siguiente:

$$X = X_0 e^{\mu t}$$

Aplicando logaritmo natural a ambos miembros:

$$\ln X = \ln X_0 + \mu t$$

Esta última fórmula representa la ecuación de una recta que relaciona  $\ln X$  con el tiempo, cuya pendiente es igual a  $\mu$ . De esta manera, con los datos del peso seco del cultivo durante la fase exponencial se puede calcular el valor de  $\mu$  por regresión lineal. Este valor se define como velocidad específica de producción de biomasa y tiene unidades de  $h^{-1}$ . Cuando mayor es el valor de  $\mu$ , mayor es la productividad de biomasa.

Un parámetro análogo, que permite visualizar rápidamente la relación biomasa-tiempo, es el tiempo de duplicación celular ( $T_d$ ). Como lo dice su nombre es el tiempo que tarda duplicar la biomasa al doble de lo que hay inicialmente. Volviendo a la ecuación de crecimiento en fase exponencial:

$$X/X_0 = e^{\mu t}$$

$$\ln(X/X_0) = \mu t$$

Por definición cuando  $X=2X_0$ ,  $t=T_d$ , por lo tanto:

$$T_d = \ln(2)/\mu$$

De modo que a partir del valor de  $\mu$  puede calcularse fácilmente el  $T_d$ , el cual es menor, cuanto mayor sea la productividad de biomasa.

