

27 RA - CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS CATALÍTICAS DE *Rhodospiridium toruloides* CONTENIENDO L-FENILALANINA AMONIO LIASA

CASTAÑEDA, M. T.1; ADACHI, O.2; HOURS, R. A.1

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

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

2. Departamento de Química Biológica, Facultad de Agricultura, Universidad de Yamaguchi, Yamaguchi 753-8515, Japón.

Resumen

L-Fenilalanina amonio liasa (PAL, EC 4.3.1.25) cataliza la bioconversión de L-fenilalanina (L-Phe) en ácido *t*-cinámico (*t*-CA) y amoniaco.

El interés en PAL radica en su potencial uso en el tratamiento de fenilcetonuria (PKU), enfermedad congénita caracterizada por la deficiencia de las enzimas intervinientes en el metabolismo de la Phe. En pacientes con PKU, la Phe se acumula en el torrente sanguíneo afectando el SNC. El único tratamiento posible es suministrar una dieta con escaso o nulo contenido de Phe, suplementada con preparados sintéticos de aminoácidos. PAL puede utilizarse para la reducción del contenido de Phe en hidrolizados proteicos, empleados como ingredientes alimenticios. En este trabajo se caracterizó la célula catalítica de *R. toruloides* conteniendo PAL con el objetivo de emplearla como alternativa a la enzima purificada, para la reducción del contenido de Phe. La célula catalítica se obtuvo a partir de cultivos de *R. toruloides* NBRC 0559 en medio óptimo para la producción de PAL. Luego se liofilizó y se mantuvo a -80°C. Para utilizarla, se resuspendió en Tris-HCl (0,1 M, pH 8,5) con 5 mM de 2NaEDTA. La célula catalítica se caracterizó en términos de: concentración celular (2,5-10 mg/ml), concentración de Phe (1-10 mM), termoestabilidad (20-70°C, 10 min), temperatura óptima (20-70°C, 2 h), efecto de agente permeabilizante (CPC) y efecto del almacenamiento a 5°C. Para monitorear la reacción se determinó la formación de *t*-CA, por método espectrofotométrico (DO₂₉₀).

Respecto a la concentración celular, no se observaron incrementos de DO₂₉₀ significativos más allá de 5 mg/ml para una solución 1 mM de Phe, obteniéndose una conversión completa luego de 3 h de tratamiento. Para estas concentraciones celulares, se observó un incremento proporcional en la DO₂₉₀ para 5 y 10 mM de Phe. En cuanto a la inactivación por temperatura, la actividad decayó lentamente hasta los 60°C, inactivándose completamente cuando se la sometió a 70°C por 10 min. Respecto a la temperatura óptima resultó ser de 50°C, por encima de la cual sufrió desnaturalización. El agente permeabilizante no mostró efecto alguno sobre la actividad, lo que indica que bajo el tratamiento de liofilización, la célula se vuelve porosa, con lo que no requiere ser permeabilizada. Finalmente, la célula se mantuvo estable durante el almacenamiento a 5°C reteniendo el 90% de su actividad luego de 5 días. Como conclusión podemos decir que la célula catalítica tiene características óptimas para su empleo en la reducción de Phe, como alternativa al uso de la enzima purificada.