

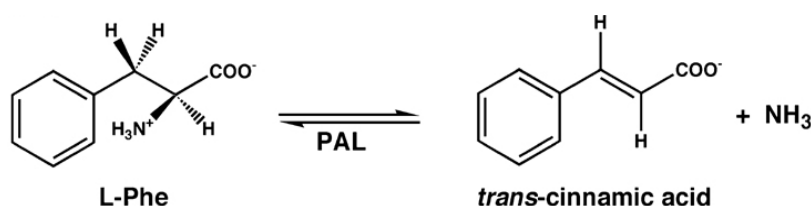
INMOVILIZACIÓN DE CÉLULAS CATALÍTICAS CON ACTIVIDAD FENILALANINA AMONIO LIASA EN MATRIZ DE ALG-Ca.

Castañeda, T.; Hours, R.; Adachi, O.

Centro de Investigación y Desarrollo de Fermentaciones Industriales (CINDEFI; UNLP-CONICET)- Calle 50 e/115 y 116- La Plata (B1900ASH), Buenos Aires, Argentina.
castaneda@biotec.org.ar

Introducción

La enzima Fenilalanina amonio liasa (PAL, EC 4.3.1.5), cataliza la biotransformación de L-fenilalanina en ácido trans-cinámico y amonio.



En las últimas décadas ha sido ampliamente estudiada por su potencial uso en el tratamiento de pacientes con fenilcetonuria. En vista de este objetivo es necesario el diseño de un biocatalizador con actividad PAL, capaz de reducir el contenido de fenilalanina en sustratos alimenticios previamente hidrolizados. Al tratarse de una enzima intracelular, se requiere la permeabilización y la inmovilización de la célula catalítica para su empleo en bioreactores.

La inmovilización por atrapamiento en una matriz de alginato de calcio es uno de los métodos más empleados en biotecnología por tratarse de un soporte inocuo para el alimento, económico y de fácil empleo.

El presente trabajo tiene como objetivo ensayar la eficiencia de un biocatalizador con actividad PAL obtenido a partir de células catalíticas permeabilizadas e inmovilizadas en alginato de calcio.

Metodología

Se cultivaron células de *Rhodospiridium toruloides* (IFO 0559), en medio óptimo para la producción de PAL, conteniendo 1% de extracto de levadura, 1% de peptona, 0,5% de NaCl, 0,05% de L-fenilalanina y 0,5% de L-isoleucina. La biomasa obtenida fue liofilizada con la finalidad de mantenerlas en el tiempo y aumentar la porosidad de la célula.

Para el diseño del biocatalizador, se prepararon suspensiones celulares con concentraciones crecientes de células (0-6 mg/ml) y se permeabilizaron con 0,005% de cloruro de cetilpiridinio (CPC). Se empleó peptona de caseína (Britania, 110 mg/ml en buffer TRIS-HCl pH: 8,5) como sustrato tipo, con una relación NA/NT ~ 32% y un contenido de L-Phe ~ 4,11%.

La reacción se llevó a cabo a 30°C en shaker, extrayendo muestras cada 10 min. El ácido cinámico producido durante la reacción fue extraído con acetato de etilo y cuantificado espectrofotométricamente por incremento de absorbancia a 290 nm.

En base a los resultados anteriores se inmovilizó la célula catalítica en una matriz de alginato de calcio. Se empleó para ello el método de microgoteo de una mezcla de células permeabilizadas y alginato de sodio al 2% (80-120 cP) sobre una solución al 5% de CaCl₂ bajo agitación, empleando una bomba peristáltica MASTERFLEX modelo 7013, a razón de 60 gotas/min. Finalizado el goteo, las esferas se mantuvieron en agitación durante 3 h en la





solución de CaCl_2 para garantizar la solidificación del gel y luego se conservaron en buffer NPB pH: 7, bajo condiciones de refrigeración.

La eficacia del biocatalizador fue testada midiendo la cinética de reacción en sistema batch con peptona de caseína 110 mg/ml, empleando 10 esferas/ml y monitoreando el incremento de absorbancia en la fase orgánica a 290 nm, a intervalos de 30 min. Adicionalmente se optimizó la proporción de esferas por ml de sustrato (5 a 25 esferas/ml) y se verificó la eficiencia del biocatalizador en soluciones de peptona más concentradas (165 y 220 mg/ml) a fin de poder abarcar las concentraciones típicas de los ingredientes alimenticios hidrolizados a emplear en etapas posteriores.

Resultados

En los ensayos realizados con la células permeabilizadas en solución se pudo observar que se alcanza los máximos valores de actividad para concentraciones celulares entre 4,5 y 6 mg/ml en la mezcla de reacción, momento en el cual las curvas se vuelven prácticamente asintóticas, para la mayoría de los tiempos ensayados. Adicionalmente se observa un aumento de la actividad con el tiempo de reacción, alcanzándose la máxima actividad a los 60 min.

En cuanto a la eficacia del biocatalizador inmovilizado, se observa un incremento proporcional entre el tiempo de reacción y la cantidad de ácido cinámico producido. Durante la reacción se advirtió el hinchamiento y ablandamiento de las esferas luego de los 90 min de reacción.

En cuanto a la optimización del número de esferas se registró un incremento de la actividad con el aumento del n° de esferas por ml de sustrato. Dicho incremento no se percibe más allá de las 20 esferas/ml.

Finalmente se observa un acrecentamiento proporcional en la actividad con el aumento de la concentración de sustrato, empleando 20 esferas por ml de peptona 110 mg/ml, en un tiempo de reacción de 90 min.

Conclusiones

A partir de estos resultados se puede concluir que el biocatalizador diseñado demostró aptitud para la reducción del contenido de fenilalanina en peptona de caseína en altas concentraciones. Estos resultados podrían extrapolarse a ingredientes alimenticios, tal como la albúmina de huevo en polvo reconstituida previamente hidrolizada, la cual contiene concentración proteica y de fenilalanina similar a dicho sustrato en las concentraciones ensayadas.

En cuanto a los parámetros de reacción, los tiempos requeridos para obtener una considerable reducción de fenilalanina no son factibles por la degradación de las esferas en las condiciones de reacción, y por el costo productivo que implica. Adicionalmente, la cantidad de esferas requeridas por ml de sustrato concentrado, a fin de lograr una buena reducción, es muy elevada. Estos resultados requieren el contraste con otros soportes de inmovilización que disminuyan la barrera difusional implicada en el uso de matrices poliméricas como el alginato de calcio, logrando condiciones de reacción más óptimas.

