

# Efecto de la Fuente de Nitrógeno en la Producción de L-Fenilalanina amonio liasa (PAL) empleando *Rhodospiridium toruloides*

María T. Castañeda, Hernán Villagarcía, Roque A. Hours, Carlos F. Mignone

*castaneda@biotec.org.ar*

*Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI; UNLP, CONICET La Plata). Fac. de Cs. Exactas, UNLP. 47 y 115, (B1900ASH) La Plata, Argentina*

La enzima L-fenilalanina amonio liasa (PAL, EC 4.3.1.5) cataliza la biotransformación de L-fenilalanina en ácido trans-cinámico y amoniaco. Presenta diferentes usos potenciales, i.e. elaboración de alimentos para pacientes con fenilcetonuria. La presencia de PAL en plantas y levaduras ha sido previamente reportada. En estas últimas, *Rhodospiridium toruloides* (IFO 0559), ha sido ampliamente estudiada por su capacidad de producción de PAL en sistema batch, empleando fenilalanina como inductor [1]. Si bien se han ensayado diferentes medios de composición variable a fin de determinar su incidencia en la expresión de la PAL [2], existen escasos registros sobre la influencia de dichos componentes, entre ellos la fuente de nitrógeno (FN) empleada sobre el crecimiento de la cepa y la producción de la enzima.

Con la finalidad de determinar la FN más apta para optimizar la producción de PAL, se utilizaron: sulfato de amonio, glutamato de sodio, nitrato de sodio, urea y peptona ácida de caseína, a razón de 0,015 eq. de N/L de medio, en un medio basal sintético para crecimiento de levaduras. Éste fue suplementado con L-fenilalanina (0,5 g/L) y L-isoleucina (5 g/L). Los medios, cada uno por duplicado, se inocularon con *R. toruloides* a razón de  $1,5 \times 10^7$  UFC/ml. La incubación se llevó a cabo en condiciones aeróbicas en shaker a 200 rpm y 30°C, en sistema batch, durante 33 h. La actividad de PAL fue medida espectrofotométricamente monitoreando la producción de ácido cinámico a 290 nm, mediante método de Yamada [2] modificado. Una unidad de PAL se define como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1  $\mu$ mol de ácido trans-cinámico por minuto. La actividad específica (AE) se expresó en términos de unidades enzimáticas por mg de biomasa seca.

La levadura creció y produjo PAL con todas las FN ensayadas confirmando su versatilidad metabólica. Los máximos de AE se observaron en la mitad de la fase exponencial. La peptona de caseína fue claramente la mejor FN, alcanzando valores de  $AE_{max} \sim 70$  mU/mg, en tanto que las restantes fuentes rindieron valores similares ( $AE_{max} \sim 42$  a 48 mU/mg).

A partir de estos resultados se puede concluir que empleando como FN un sustrato proteico parcialmente hidrolizado, como es la peptona ácida de caseína, se logra incrementar hasta en un 150% la actividad específica de PAL. Estos resultados remiten importancia a la hora de producir la enzima a gran escala por el potencial uso de residuos de origen proteico como componentes del medio de cultivo.

## *Bibliografía*

1. Ogata, K.; Uchiyama, K.; Yamada, H. *Agric. Biol. Chem.*, **1967**, *31*, p. 200-206.
2. Yamada, S.; Nabe, K.; Izuo, N.; Nacamichi, K.; Chibata, I. *Appl. Environ. Microbiol.*, **1981**, *42*, p. 773-778.