

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE QUERETARO  
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE QUERETARO  
FACULTAD DE QUIMICA  
MAESTRIA EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

OBTENCION DE L-TIROSINA EMPLEANDO COMO BIOCATALIZADOR  
CELULAS DE Citrobacter intermedius CON ALTA ACTIVIDAD  
TIROSINFENOLIASA.

TESIS  
Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

Consuelo de Jesús Cortés Penagos

Dirigida por:

Dr. Jesús Rodríguez Martínez

SINODALES

Dr. Jesús Rodríguez Martínez.  
(Presidente)

M.C. Salvador Lecona Uribe.  
(Secretario)

Dr. Eduardo Fernandez Escartín.  
(Vocal)

M.C. Cristina Cabrera Muñóz.  
(Suplente)

Dra. Elvira Gonzalez de Mejía.  
(Suplente)

M.C. Salvador Lecona Uribe.  
Director de la Fac. Química.

M.I. Alfredo Zepeda Garrido.  
Dir. de ESTUDIOS de Posgrado

CENTRO UNIVERSITARIO  
Querétaro, Qro., Junio de 1992.  
MEXICO

No. Reg. H54971

TS

Clas. 541.395

C8280

# INDICE GENERAL

RESUMEN . . . . .	1
INTRODUCCION	
- Actualidad del problema. . . . .	4
- Novedad científica . . . . .	4
- Valor práctico del trabajo . . . . .	4
OBJETIVOS. . . . .	6
HIPOTESIS. . . . .	7
REVISION BIBLIOGRAFICA.	
CAPITULO I. Propiedades y mecanismos de acción de la tirosinofenolasa (TFL). . . . .	8
1.1. Algunas propiedades de TFL . . . . .	9
1.2. Funciones catalíticas de TFL . . . . .	13
1.3. Mecanismos de acción de enzimas ambivalentes PLP-dep.	21
CAPITULO II. Regularidades cinéticas de reacciones enzimáticas en células de microorganismos . . . . .	31
2.1. Estructura de membranas celulares de bacterias Gram (-) y su permeabilidad para diferentes sustancias . . . . .	31
2.2. Algunos métodos para aumentar la permeabilidad de membranas celulares . . . . .	37
2.3. Particularidades cinéticas de las reacciones catalizadas por células de microorganismos . . . . .	41
CAPITULO III. Métodos de obtención de L-tirosina . . . . .	55
3.1. Métodos extractivos de producción de L-Tir . . . . .	59

3.4. Método enzimático de obtención de L-Tir . . . . . 68

PARTE EXPERIMENTAL

CAPITULO IV. Materiales y métodos de investigación . . . . . 79

4.1. Materiales y reactivos utilizados . . . . . 79

4.2. Fuente de la enzima . . . . . 80

4.3. Etapa microbiológica. . . . . 80

4.4. Determinación de la actividad enzimática TFL. . . . . 83

4.5. Determinación de proteína . . . . . 83

4.6. Estudio cinético de la síntesis enzimática de la L-tirosina a partir de fenol, acetato de amonio y piruvato de sodio . . . . . 83

4.7. Influencia de la transferencia de masa sobre la acción cinética de TFL en las células de C.intermedius . . . . 92

4.8. Identificación y determinación de la pureza del producto de reacción . . . . . 93

CAPITULO V. Resultados y discusión . . . . . 94

5.1. Etapa microbiológica . . . . . 94

5.2. Estudio cinético de la síntesis enzimática de la L-tirosina a partir de fenol, acetato de amonio y piruvato de sodio. . . . . 97

5.3. Particularidades cinéticas de la reacción de síntesis de L-tirosina a partir de fenol, acetato de amonio y piruvato de sodio catalizada por células de Citrobacter intermedius. . . . . 105

5.4. Síntesis enzimática de la L-tirosina a partir de fenol,

5.5. Condiciones óptimas de la reacción de L-tirosina a

partir de fenol, acetato de amonio y piruvato de sodio por  
células de C. intermedius. . . . . 111

5.6. Identificación y determinación de pureza del producto de  
reacción . . . . . 123

CAPITULO VI. Conclusiones . . . . . 125

BIBLIOGRAFIA

CAPITULO VII. Referencias bibliográficas. . . . . 127

## INDICE DE CUADROS

Cuadro	Pag.
1.1. Algunas propiedades fisicoquímicas de la enzima tirosinfenoliase (TFL) obtenida de diferentes fuentes.	10
1.2. Constante de unión del Piridoxal 5'-fosfato (PLP) y sus análogos con TFL en diferentes fuentes.	11
1.3. Significado de Km, Vmáx. de las reacciones catalizadas por TFL de diferentes fuentes.	14
1.4. Velocidad relativa de la reacción $\alpha,\beta$ -eliminación de diferentes aminoácidos catalizada por TFL obtenida - de <u>Aeromonas fenológenas</u> .	17
1.5. Velocidad relativa de la síntesis de derivados de tirosina a partir de los correspondientes derivados de fenol, piruvato de sodio y amoniaco, catalizada - por TFL de <u>Escherichia intermedia</u> .	17
1.6. Valores óptimos de pH para diferentes reacciones catalizadas por TFL.	18
1.7. Significado de KI para algunos inhibidores de las reacciones catalizadas por TFL.	19
1.8. Influencia de cationes sobre la actividad TFL en la reacción de $\alpha,\beta$ -eliminación L-tirosina	20
3.1. Producción mundial de L-DOPA.	58
3.2. Comparación de los métodos químicos de obtención de L-tirosina.	62
3.3. Acumulación de L-tirosina por cepas mutantes de <u>Corynebacterium glutamicum</u> .	66
3.4. Síntesis microbiológica de L-tirosina bajo cultivo de microorganismos en medios con diferentes fuentes de carbono.	67
3.5. Síntesis enzimática de L-tirosina empleando como fuente de enzima diferentes microorganismos.	72
3.6. Producción enzimática de L-tirosina a partir de diferentes fuentes.	75
3.7. Síntesis de L-tirosina a partir de ácidos orgánicos.	76

I.	Crecimiento de células de <u>Citrobacter intermedius</u> presentado en dos diferentes medios de cultivo líquidos.	95
II.	Influencia del tiempo de incubación de células de <u>C.intermedius</u> sobre su actividad enzimática TFL.	97
III.	Reproducibilidad de resultados.	101
IV.	Influencia de la concentración de fenol sobre la actividad enzimática TFL de células de <u>C.intermedius</u>	102
V.	Influencia de la concentración de acetato de amonio sobre la actividad enzimática TFL de células de <u>C.intermedius</u> .	103
VI.	Influencia de la concentración de piruvato de sodio sobre la actividad enzimática TFL de células de <u>C.intermedius</u> .	103
VII.	Influencia del pH de reacción sobre la actividad enzimática TFL de células de <u>C. intermedius</u> .	104
VIII.	Influencia de la temperatura de reacción sobre la actividad enzimática TFL de células de <u>Citrobacter</u> .	104
IX.	Cantidad de biocatalizador sobre la velocidad inicial de la reacción enzimática TFL catalizada por células de <u>C.intermedius</u> .	105
X.	Influencia de la agitación de la mezcla reaccionante sobre la velocidad del consumo de fenol.	106
XI.	Obtención de L-tirosina por métodos propuestos por diferentes autores.	122

## INDICE DE ESQUEMAS Y FIGURAS

Esq.	Pag.
1.1.	Mecanismo de la reacción de $\alpha, \beta$ -eliminación y $\beta$ -sustitución catalizadas por liasas dependientes del piridoxal fosfato (PLP). 21
1.2.	Mecanismo de las reacciones catalizadas por TFL. 23
1.3.	Mecanismo químico de la reacción TFL. 26
1.4.	Mecanismo de reacción de $\alpha, \beta$ -eliminación en la reacción de síntesis de tirosina y análogos, catalizada por TFL. 30
2.1.	Estructura de la membrana celular de bacterias. 32
2.2.	Estructura de un poro de la membrana celular. 33
<b>Fig.</b>	
1.	Espectro de fenol. 87
2.	Espectro de L-tirosina. 89
3.	Curva de crecimiento de <u>Citrobacter intermedius</u> . 96
4.	Influencia del tiempo de incubación de las células de <u>C. intermedius</u> sobre la actividad TFL en el proceso de obtención de L-tirosina. 98
5.	Consumo de fenol en función del tiempo, por células de <u>C. intermedius</u> con alta actividad TFL. 99
6.	Porcentaje de fenol y tirosina en función del tiempo de reacción en la síntesis de L-tirosina catalizada por células de <u>C. intermedius</u> . 100
7.	Influencia de la concentración de fenol sobre el periodo de inducción de la reacción de síntesis de L-tirosina catalizada por células de <u>C. intermedius</u> . 109
8.	Influencia de la temperatura sobre el periodo de inducción de la síntesis de L-tirosina catalizada por células de <u>C. intermedius</u> . 112
9.	Influencia de la concentración de fenol sobre la actividad TFL de células de <u>C. intermedius</u> . 115
10.	Influencia de la concentración de acetato de amonio sobre la actividad TFL de células de <u>C. intermedius</u> . 116

11. Influencia de la concentración de piruvato de sodio sobre la actividad TFL de células de C.intermedius 117
12. Influencia del pH de la reacción sobre la actividad TFL de células de C.intermedius. 118
13. Influencia de la temperatura de la reacción sobre la actividad TFL de células de C.intermedius. 119
14. Influencia de la cantidad de proteína bacteriana sobre la velocidad inicial de la reacción de síntesis de L-tirosina catalizada por células de C.intermedius con actividad TFL. 121
15. Cromatograma. 124

OBTENCION DE L-TIROSINA EMPLEANDO COMO BIOCATALIZADOR CELULAS  
DE Citrobacter intermedius CON ALTA ACTIVIDAD TIROSINFENOLIASA

RESUMEN

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Ciencia y Biotecnología de Enzimas de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila, bajo la dirección del Dr. Jesús Rodríguez Martínez.

La síntesis de aminoácidos representa una area importante ya que éstos son utilizados en medicina, industria alimentaria, farmacéutica y pecuaria, así como en otras ramas de la economía nacional. Considerando de gran importancia el hecho de ser productos de importación.

El aminoácido L-tirosina que es el tema de este trabajo, se usa ampliamente en la industria y su importancia fisiológica es de interés y muchos de sus derivados encuentran aplicación en la industria farmacéutica.

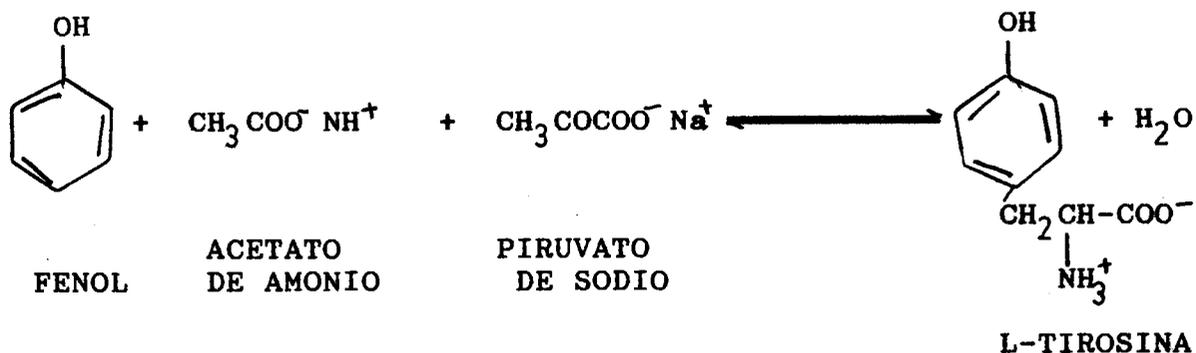
Para la obtención de aminoácidos se conocen métodos que se dividen fundamentalmente en cuatro grupos:

- 1.- Extracción.
- 2.- Síntesis química.
- 3.- Fermentación.
- 4.- Síntesis enzimática.

Este último es un método prospectivo, presentando una serie de ventajas sobre los otros tres métodos. El producto se obtiene con un alto grado de pureza, altos rendimientos y el proceso surge en una sola etapa. Además, al usar células de

microorganismos libres e inmovilizadas en calidad de catalizadores en la síntesis enzimática, se excluye la etapa laboriosa de la separación, extracción y purificación de la enzima. Estos biocatalizadores son estables y es posible su uso múltiple.

En este trabajo se efectuó el estudio cinético de la síntesis enzimática del aminoácido L-tirosina a partir de tres sustratos: fenol, acetato de amonio y piruvato de sodio; utilizando como biocatalizador células de Citrobacter intermedius con alta actividad tirosinfenoliasa (TFL). Esta enzima cataliza la reacción de síntesis siguiente:



Las células de Citrobacter intermedius hiperproductoras de la enzima intracelular TFL, se desarrollaron en medio de cultivo sólido para su conservación y en medio de cultivo líquido para la propagación de células y de esta manera se obtuvo biomasa que se utilizó como biocatalizador en la reacción de síntesis del aminoácido L-tirosina.

Se logró desarrollar un método para determinar uno de los sustratos de la reacción de síntesis de L-tirosina, que es el fenol, y de este modo se llevó a cabo el seguimiento de la reacción por consumo de fenol en función del tiempo, al medirlo espectrofotométricamente.

Determinamos las particularidades cinéticas de la reacción de síntesis de L-tirosina. Estudiando los parámetros de la reacción y la influencia que tienen sobre la actividad enzimática TFL de las células de C.intermedius. Los parámetros estudiados fueron: tiempo de incubación de las células, temperatura y pH de la reacción, concentración de biomasa, concentración de cada uno de los sustratos: fenol, acetato de amonio y piruvato de sodio.

La separación del producto de reacción se hizo por filtración y cristalización ácida. Identificándose por cromatografía en capa fina como tirosina.

El rendimiento del proceso fué del 80-90 % obteniéndose 8 gr.de tirosina/lt.\* hr. bajo las condiciones óptimas de reacción que se establecieron en base a los resultados de los estudios realizados. La cantidad de L-tirosina obtenida fué superior comparada con otros procesos de obtención de L-tirosina reportados por otros autores. De esta manera el proceso que se estudió es перспекivo para la obtención del aminoácido L-tirosina a partir de fenol, acetato de amonio y piruvato de sodio empleando en calidad de biocatalizador células de Citrobacter intemedius con alta activida TFL.

## INTRODUCCION

ACTUALIDAD DEL PROBLEMA. En los últimos años, se desarrolla intensamente en todo el mundo la producción de aminoácidos, los principales empleadores de éstos son la medicina, la industria pecuaria, alimentaria, farmacéutica, así como en otras ramas de la economía doméstica. Por eso, es de actualidad la búsqueda de métodos efectivos para la síntesis de aminoácidos sobre todo de la forma L-.

Un nuevo y prospectivo método de obtención de aminoácidos es la síntesis enzimática. El producto se obtiene con alto rendimiento, alto grado de pureza y en la forma L-. Bajo el empleo de células libres e inmovilizadas de microorganismos en calidad de catalizadores en la síntesis enzimática, se puede excluir la etapa laboriosa de la separación, extracción y purificación de la enzima. Además, este tipo de biocatalizadores son estables, es posible su uso múltiple y no es necesario añadir a la mezcla reaccionante cofactores de alto valor agregado.

NOVEDAD CIENTIFICA. En este trabajo somos los primeros en México en efectuar el estudio cinético de la síntesis enzimática de la L-tirosina a partir de fenol, piruvato de sodio y acetato de amonio, catalizada por células Citrobacter intermedius con alta actividad tirosinfenoliasa (TFL).

VALOR PRACTICO DEL TRABAJO. La importancia de este estudio relaciona las repercusiones en el contexto regional y nacional; ya que permite desarrollar tecnología propia, enfocada a la

producción de L-aminoácidos que son productos de importación y con estudios propios de optimización de condiciones de la biosíntesis, mediante el conocimiento de parámetros tales como pH, temperatura, concentración de sustrato, biomasa y teniendo como antecedentes que existe actividad tirosinfenoliasa (TFL) en las enterobacterias. Las investigaciones se realizaron en el marco de un programa de creación de catalizadores para la síntesis en una sola etapa de L-aminoácidos a partir de sustratos que son sustancias producidas por la industria química nacional. Se desarrollaron los fundamentos teóricos de la síntesis de tirosina a partir de fenol, acetato de amonio y piruvato de sodio, catalizada por células de Citrobacter intermedius que es un nuevo biocatalizador, proveniente de una cepa de Citrobacter intermedius. Proyecto apoyado por la Dirección General de Investigación Científica y Superación Académica, de la Secretaría de Educación Pública, convenios: C90-01-0613 (1990), C90-01-0461 (1990) y por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, convenio # 2251 (1991).

## OBJETIVOS

\* Estudio de las condiciones de la síntesis enzimática de la L-tirosina catalizada por células de Citrobacter intermedium con alta actividad tirosinfenoliasa:

a) Determinar la influencia del tiempo de incubación de las células de Citrobacter intermedium en la síntesis de L-tirosina.

b) La influencia de la concentración de biomasa, temperatura y pH en la reacción tirosinfenoliasa con células de Citrobacter intermedium en la síntesis de L-tirosina.

c) La influencia de la concentración de sustratos: fenol, acetato de amonio y piruvato de sodio, en la reacción de síntesis de L-tirosina.

\* El interés de estudiar este proceso no es solamente práctico sino teórico, ya que es un modelo adecuado y complejo por la participación de tres sustratos con un solo biocatalizador intracelular, lo cual puede ser utilizado para modelos posteriores.

## HIPOTESIS

El establecer las condiciones óptimas de pH , temperatura, concentración de sustrato, biomasa y tiempo de incubación para la reacción tirosinfenoliasa, empleando células de Citrobacter intermedius en calidad de biocatalizadores, nos permitirá obtener un rendimiento alto del producto de dicha reacción (L-tirosina).

## REVISION BIBLIOGRAFICA

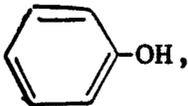
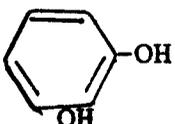
### CAPITULO I. PROPIEDADES Y MECANISMOS DE ACCION DE LA TIROSINFENOLIASA.

La tirosinfenoliasa (TFL) (deaminación, E.C. 4.1.99.2)(28) que se descubrió no hace mucho, como una enzima multifuncional (40) es dependiente del piridoxal fosfato (PLP) (111). Las especies típicas que producen TFL, que es una enzima intracelular, son: Escherichia coli, Aerobacter aerogenes, Pseudomonas perlutida, Pseudomonas ovalis, Bacillus cereus, Bacillus megathetium, Xantomonas campestris, Proteus mirabilis, Proteus morganii, Paracolobacterium coliforme, Salmonella gallinarum, Alcaligenes faecalis (74), Escherichia intermedia (actualmente conocida como Citrobacter intermedius)(35,40,108), Erwinia herbicola (31,56,74), Citrobacter freundii (74,107), siendo estas dos últimas las estudiadas con más detalle (50). También se ha reportado la presencia de esta enzima en Clostridium tetanomorfum (11) y Aeromonas fenológenes (15). Se estableció que la TFL cataliza una serie de reacciones  $\alpha$ , $\beta$ -eliminación (I.1),  $\beta$ -sustitución (I.2), racemización de alanina (I.3), así como también la síntesis de tirosina y sus derivados a partir de amoniaco, piruvato de sodio y los correspondientes derivados de fenol (I.4)(40,53,54,108,110,111, 112).



donde:

R:                    -OH, -OH, -SH, -Cl, etc...

R':                    ,                    , etc...

1.1 Algunas propiedades de la Tirosinfenoliasa. Esta establecido que la tirosinfenoliasa (TFL) es una enzima de alto peso molecular que posee una estructura cuaternaria compuesta de dos subunidades (Cuadro 1.1) y es una enzima multifuncional. Para la actividad TFL es necesario un cofactor -piridoxal 5'-fosfato (PLP)(61)-, la coenzima se une al grupo ε-amino del sitio activo de la enzima con la formación de una base de Shift, bajo altas concentraciones de ésta con residuos de histidina y algunas partes de la macromolécula que no son activas (49).

CUADRO 1.1. Algunas propiedades fisicoquímicas de la enzima tirosinfenoliasa (TFL) obtenida de diferentes fuentes			
Propiedades	Microorganismo productor de la enzima		
	<u>E.intermedia</u> (54,56)	<u>E.herbicola</u> (56)	<u>A.fenológenas</u> (15)
1%			
D 280 nm. I	8.37	8.08	-
D 260/D 280	0.54	0.55	-
S 20',	7.77 S	8.24 S	-
D 20,	4.42	3.08	-
P.M.	170,000	259,000	380,000
No. subunidades	2	2	-
No. moles de piridoxal 5'- fosfato/mol de TFL.	2	2	-

En el Cuadro 1.2, se presenta el significado de las constantes de unión del PLP y sus análogos con TFL.

Las investigaciones mostraron que el grupo metilo del PLP juega un papel importante en la interacción hidrofóbica del cofactor con la enzima. La unión del átomo de oxígeno con el nitrógeno del anillo piridoxálico, conduce a la disminución de la capacidad electroceptora de éste y la disminución de la actividad enzimática de la TFL (57). Se describió, que el 5'-

fosfato del PLP tiene un significado esencial para la unión del cofactor con la enzima y la aparición de la actividad enzimática. Para otras enzimas dependientes de este cofactor se descubrieron regularidades análogas.

CUADRO 1.2. Constante de unión del Piridoxal 5'-fosfato (PLP) y sus análogos con Tirosinfenoliasa (TFL) en diferentes fuentes

Análogo de PLP	Km $\mu$ M	Fuente de enzima	Ref.
Piridoxal 5'-fosfato.	1.3	<u>Escherichia intermedia</u>	55
"	1.3	<u>Erwinia herbicola</u>	56
"	32.0	<u>Aeromonas fenológenes</u>	15
N-óxido del Piri- doxal 5'-fosfato.	6.3	<u>Escherichia intermedia</u>	57
2-oxipiridoxal 5'- fosfato.	13.0	"	54

La máxima actividad enzimática TFL se presenta en presencia de cationes monovalentes: potasio, rubidio, cesio ó amónio, con el cambio de éstos por cationes de litio o sodio, la actividad de la enzima disminuye (107,55). Las investigaciones mostraron que los cationes que activan juegan un papel esencial en la unión del PLP con la enzima e inducen la formación del complejo apoenzima-cofactor, en forma funcional. Se estableció que la mayoría de las enzimas dependientes del PLP, las cuales catalizan la reacción  $\alpha,\beta$ -eliminación, revelan su máxima actividad en presencia de cationes monovalentes. Las enzimas que catalizan las reacciones de transaminación no son activadas por estos cationes.

La holo-TFL tiene dos puntos de absorción máxima a 280 y 430 nm y otro característico a 340 nm (55,123). La absorción en el rango de 410-440 nm es característica para las enzimas PLP-dependientes y esta es una señal del enlace de nitrógeno (30). Con el cambio de pH de 6 a 9, la posición de los puntos de absorción característico no cambia, pero con la reducción de la holo-TFL con borohidrato de sodio, el máximo de 430 nm se desplaza a 336 nm y la actividad de la enzima disminuye. La formación del complejo Sustrato-Enzima protege parcialmente a TFL de su inactivación por el hidrato de boro, lo que también se indica sobre la formación de la base de Shift entre coenzima y sustrato.

Bajo la interacción de la holo-enzima con los sustratos o con inhibidores concurrentes en los espectros de absorción se descubre un máximo a 500 nm., el cual, se supone que pertenece a la partícula intermedia cetomina (EX, Esquema 1.2) (123).

La partícula intermedia que absorbe a 500 nm., se ha descubierto en enzimas PLP-dependiente: triptofanoindoliasa (49), triptofanoamoniocoliasa (127), serintrahidroximetilasa glutamatoalanintransaminasa, glutamatoaspartatransaminasa (45), cistationasa (100) y L-triptofanasa (40).

Se supone que los residuos de la histidina juegan un papel esencial en la catálisis de las enzimas PLP-dependientes, participando en el desprendimiento del hidrógeno alfa de los sustratos (49). Cuando la enzima TFL se modificó con dietilpirocarbonato se determinó que el grupo enzimático modificado fué un residuo de histidina y este grupo es el responsable de la abstracción del protón de la posición dos del

sustrato (49).

Aunque el papel de los grupos sulfhidrilos en la catálisis de la TFL no ha sido totalmente esclarecido, se sabe que son necesarios para la aparición de la actividad en las enzimas dependientes de PLP (16,84).

### 1.2. Funciones catalíticas de la Tirosinfenoliasa (TFL).

La TFL posee una amplia gama de especificidad hacia varios sustratos, cataliza una serie de reacciones de  $\alpha,\beta$ -eliminación,  $\beta$ -sustitución, racemización y síntesis de tirosina y sus análogos a partir de piruvato de sodio, amoniaco y sus correspondientes derivados de fenol, es decir, la TFL es una enzima ambivalente (84). Los parámetros cinéticos de algunas reacciones se presentan en el Cuadro 1.3. Se muestra que además de la L-tirosina como sustratos de la reacción de  $\alpha,\beta$ -eliminación pueden usarse la D-tirosina; S-metil-L-cisteína; L-3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) ; L-D-serina; L-,D-cisteína (16,32,40,53,108,122,125).

La velocidad relativa de  $\alpha$  y  $\beta$ -eliminación de diferentes aminoácidos, se presenta en el Cuadro 1.4., la constante de equilibrio de la reacción de  $\alpha,\beta$ -eliminación de L-tirosina catalizada por TFL de células de Aeromonas fenológenes resultó

de  $1.7 \times 10^{-5}$  (16).

CUADRO 1.3. Significado de Km, Vmáx de las reacciones catalizadas por TFL de diferentes fuentes

Sustrato	Km mM	Vmáx *10 <sup>-2</sup>	Fuente de TFL	Referencia
<u>L-tirosina</u>				
α,β-eliminación	0.23	3.17	<u>E. intermedia</u>	16,53,122
<u>S-metil,L-cis-teína</u>				
α,β-eliminación	1.82	2	<u>E.intermedia</u>	53,122
β-sustitución	-	1.37	"	124
α,β-eliminación	4.17	-	<u>E. herbicola</u>	56
"	0.40	-	<u>A.fenológenes</u>	16
<u>L-serina</u>				
α,β-eliminación	34.5	9.58	<u>E.intermedia</u>	122
β-sustitución	-	0.55	"	125
α,β-eliminación	28.6	-	<u>E.herbicola</u>	56
"	1.2	-	<u>A.fenológenes</u>	16
<u>-cloro-L-alanina</u>				
α,β-eliminación	4.5	30.3	<u>E.intermedia</u>	125
β-sustitución	-	2.33	"	125
<u>Eter metílico de L-tirosina</u>				
α,β-eliminación	0.37	-	<u>A.fenológenes</u>	16
<u>L-alanina</u>	26	0.085	<u>E.intermedia</u>	55
<u>Síntesis de L-tirosina</u>				
Fenol	4.4	12	<u>E.intermedia</u>	122
	5.0	-	<u>A.fenológenes</u>	16
	1.1	5.5	<u>E.intermedia</u>	125
Piruvato de sodio	5.1	12.0	"	109
	12.0	5.5	"	125
Amoniaco	20.0	5.5	"	125

Bajo altas concentraciones de fenol, piruvato de sodio y amoniaco en la mezcla reaccionante surge la reacción inversa de la síntesis de tirosina (16,125), donde se observa un periodo de inducción que depende de la concentración de fenol. El periodo disminuye mientras la concentración de fenol aumenta hasta 0.07M, después es constante. Las concentraciones de piruvato de sodio y acetato de amonio no influyen sobre la magnitud del periodo de inducción (110). La síntesis de L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) y otros derivados de la tirosina ocurre ya con menor velocidad al sustituir el fenol por sus derivados correspondientes, Cuadro 1.5.

TFL cataliza la síntesis de L-tirosina a partir de serina y fenol en la reacción  $\beta$ -sustitución, el fenol puede ser sustituido por pirocatecol (32), resorcinol o pirogalol. Como sustratos de esta misma reacción se pueden usar: L-serina (32) (aunque no se aumenta el rendimiento al sustituir por piruvato la serina u otro ácido orgánico como sustrato en la reacción de síntesis de L-tirosina)(117), S-metil-L-cisteína; L-,D-cisteína; D-tirosina (32,108,112), L-cistina (32,117).

Se sabe que TFL cataliza la reacción irreversible de isomerización de D-tirosina en L-tirosina, así como el intercambio de protones en alanina, lo que conduce a la racemización (32,55,60,108). No se ha descubierto la racemización de la L-valina, L-leucina, L-isoleucina y L-fenilalanina, es decir, que la acción de racemización de TFL no es un fenómeno general.

Se estableció que la epimerización de treonina y alotreonina no tiene lugar, en el caso de esteroisómeros de treonina, la

presencia de C<sub>2</sub> y C<sub>3</sub> de una configuración absoluta determinada no es necesaria ni suficiente para la posible reacción de  $\alpha,\beta$ -eliminación. Con esto, en este caso, la configuración absoluta de 2-S, 3-R en treonina (L-treonina) la transformación en productos ocurre más rápido, más que en el caso de la configuración 2-R, 3-S (D-treonina) (35). Bajo configuraciones absolutas iguales en C<sub>2</sub> y C<sub>3</sub> (alotreonina) la reacción de  $\alpha,\beta$ -eliminación no ocurre. En estas condiciones, la TFL actúa como una aldolasa, transformando la alotreonina hasta glicina, en este caso probablemente ocurre en forma más lenta. Esta enzima cataliza también la conversión de D-treonina a ácido  $\alpha$ -cetobutírico (35).

De acuerdo a los datos que se presentan en la literatura, las reacciones catalizadas por TFL surgen sin destrucción del sitio -C-C-COOH; no hace mucho se estableció que esta enzima cataliza la formación de L-tirosina y L-DOPA a partir de glicina, formaldehído y el correspondiente fenol.

En el caso de la síntesis de tirosina se forma una mezcla de tirosina y de un producto de estructura desconocida en una relación 1:1. El producto adicional es el resultado de una reacción no enzimática. El piruvato (usado como sustrato) es un metabolito activo, ya que también participa en otras reacciones enzimáticas y este se requiere en exceso. Por otro lado, grandes concentraciones de piruvato llevan a un incremento en la concentración de los productos formados no enzimáticamente (116). El piruvato debe ser adicionado como sustrato en concentraciones iniciales elevadas para mantener la velocidad óptima de síntesis (78).

Los resultados óptimos de pH para diferentes reacciones catalizadas por TFL de diferentes fuentes se muestran en la Cuadro 1.6.

CUADRO 1.4. Velocidad relativa de la reacción  $\alpha,\beta$ -eliminación de diferentes aminoácidos catalizada por TFL obtenida de Aeromonas fenológenes (16).

Aminoácido	Vel. relativa (%)	Aminoácido	Vel. relativa (%)
L-tirosina	100	L-histidina	0
Eter metílico de L-tirosina	25	L-triptofano	0
S-metil, L-cisteína	14	L-aspártico	0
L-serina	0	L-valina	0
L-fenilalanina	0	L-metionina	0
L-cisteína	0	L-alanina	0
L-DOPA	0	L-leucina	0

CUADRO 1.5. Velocidad relativa de la síntesis de derivados de tirosina a partir de los correspondientes derivados de fenol, piruvato de sodio y amoníaco, catalizada por TFL de Escherichia intermedia (125)

Derivado de fenol	Velocidad relativa (%)	Derivado de fenol	Velocidad relativa (%)
Fenol	100	o-clorofenol	32.7
Pirocatecol	60	m-cresol	47.3
Resorcina	58.2	o-cresol	52.7

CUADRO 1.6. Valores óptimos de pH para diferentes reacciones catalizadas por TFL.

Reacción, sustrato.	Fuente de TFL	pH óptimo	Referencia
<u><math>\alpha,\beta</math>-eliminación</u>			
L-tirosina	<u>E.intermedia</u>	8.2	53
	<u>C.freundii</u>	8.2	107
	<u>A.fenológenes</u>	8.5	15
S-metil-L-cisteína	<u>E.intermedia</u>	8.2	53
L-serina	"	-	53
<u><math>\beta</math>-sustitución</u>			
L-serina	<u>A.fenológenes</u>	8.5	16
S-metil-L-cisteína	"	8.5	16
<u>Síntesis de Tirosina a partir de fenol, piruvato de sodio y amino</u>			
	<u>E.intermedia</u>	8.5-9.0	123
	<u>A.fenológenes</u>	9.0	16
<u>Racemización</u>			
L-alanina	<u>E.intermedia</u>	7.2-7.5	55

Las investigaciones mostraron que tanto L-fenilalanina, L-glisina, son inhibidores concurrentes de TFL, el fenol, pirocatecol y resorcinol son inhibidores de tipo mezclado Cuadro 1.7.

CUADRO 1.7. Significado de K para algunos inhibidores de las reacciones catalizadas por TFL.

Inhibidor	Tipo de inhibición	Fuente de TFL	K mM I	Referencia
L-alanina	Concurrente	<u>E.intermedia</u>	6.5	53
	"	<u>E.herbicola</u>	9.51	56
	"	<u>A.fenológenes</u>	18.0	16
L-fenilalanina	Concurrente	<u>E.intermedia</u>	2.0	125
	"	<u>E.herbicola</u>	2.02	56
	"	<u>A.fenológenes</u>	4.4	16
L-glicina	"	<u>E.intermedia</u>	38.0	36
Fenol	Mezclada	<u>E.intermedia</u>	0.04	53
	"	<u>E.herbicola</u>	0.04	56
	"	<u>A.fenológenes</u>	0.5	16
Pirocatecol	"	<u>E.intermedia</u>	0.46	53
	"	<u>E.herbicola</u>	1.78	56
Resorcinol	"	<u>E.herbicola</u>	0.16	113
	"	<u>A.fenológenes</u>	0.20	16

Está establecido que algunos cationes de metales divalentes inhiben la reacción catalizada por TFL, Cuadro 1.8.

CUADRO 1.8. Influencia de cationes sobre la actividad TFL en la reacción de  $\alpha,\beta$ -eliminación L-tirosina.

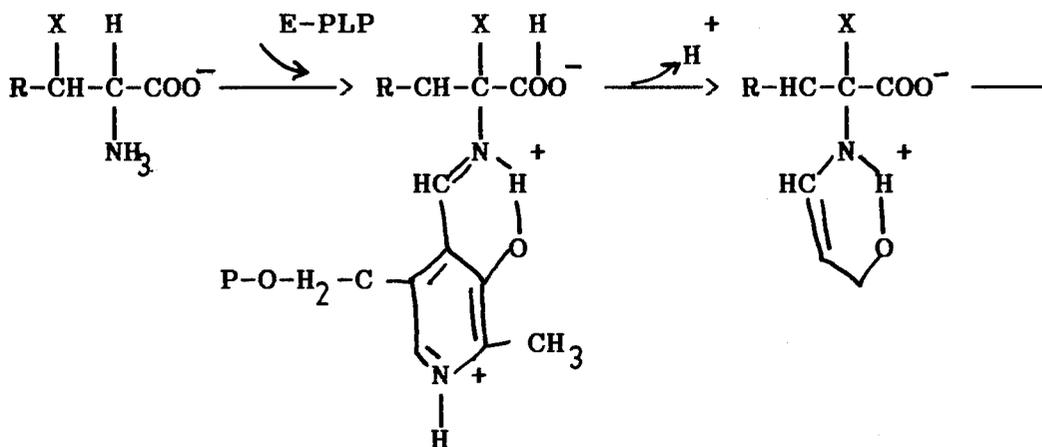
Catión	Concentración(mM)	Fuente de enzima	Vel.relativa(%)
-	-	<u>C.freundii</u> (108)	100
-	-	<u>A.fenológenes</u> (15)	100
+2 Ba	-	"	100
+2 Ca	1.0	"	100
+2 Ca	100	<u>C.freundii</u>	0
+2 Mg	1.0	<u>A.fenológenes</u>	100
"	100	<u>C.freundii</u>	63
+2 Zn	1.0	<u>A.fenológenes</u>	86
+2 Fe	1.0	"	81
+2 Co	1.0	"	17
+2 Cu	1.0	"	0
+2 Cu	1.0	<u>C.freundii</u>	0

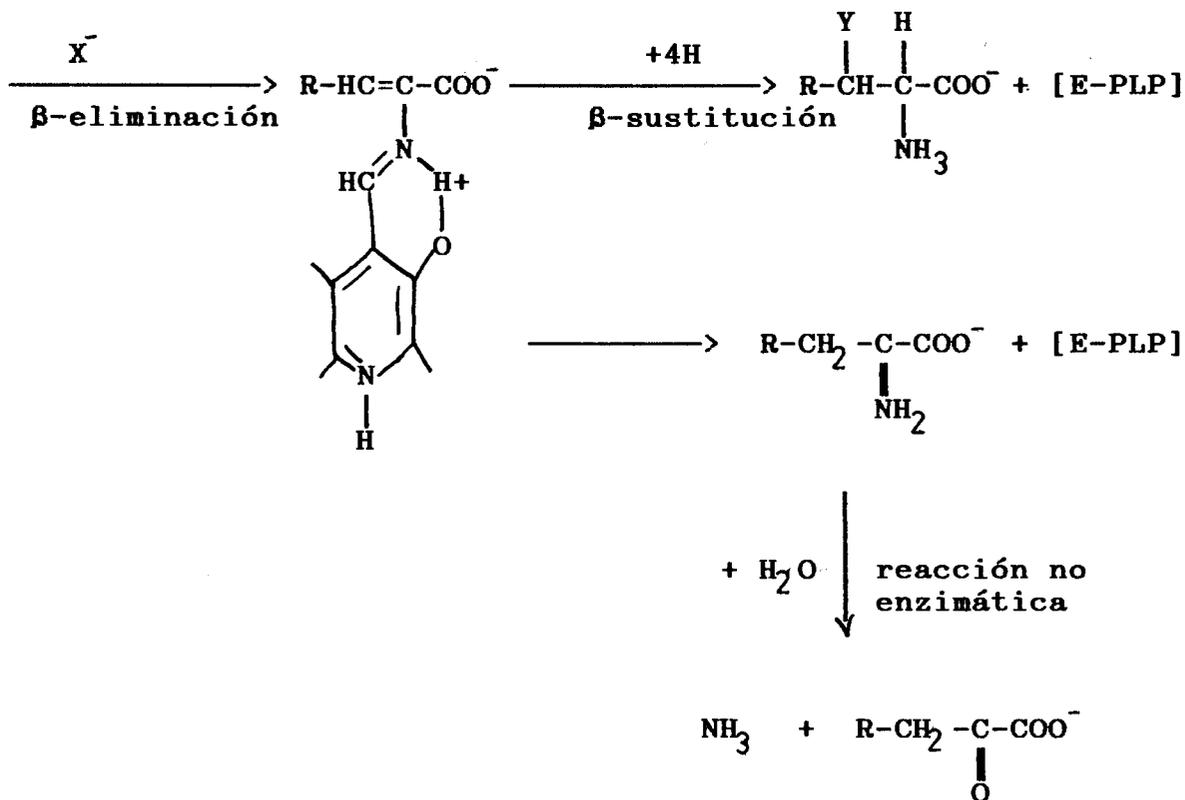
La inhibición de la actividad TFL por cationes de  $\text{Cu}^{2+}$  es reversible. La actividad se restablece con la adición de mercaptoetanol, se observa un efecto similar para la actividad TFL que se obtiene de Bacterium colifenológenes.

La TFL de Citrobacter freundii presenta activación con cationes como potasio, sodio y amonio, mientras que el cobre y mercurio interactúan sobre los grupos sulfhidrilos de la enzima en la catálisis o intervienen en la estabilidad conformacional de la misma (108).

1.3. Mecanismo de acción de enzimas ambivalentes dependientes del pirodoxal fosfato (PLP).

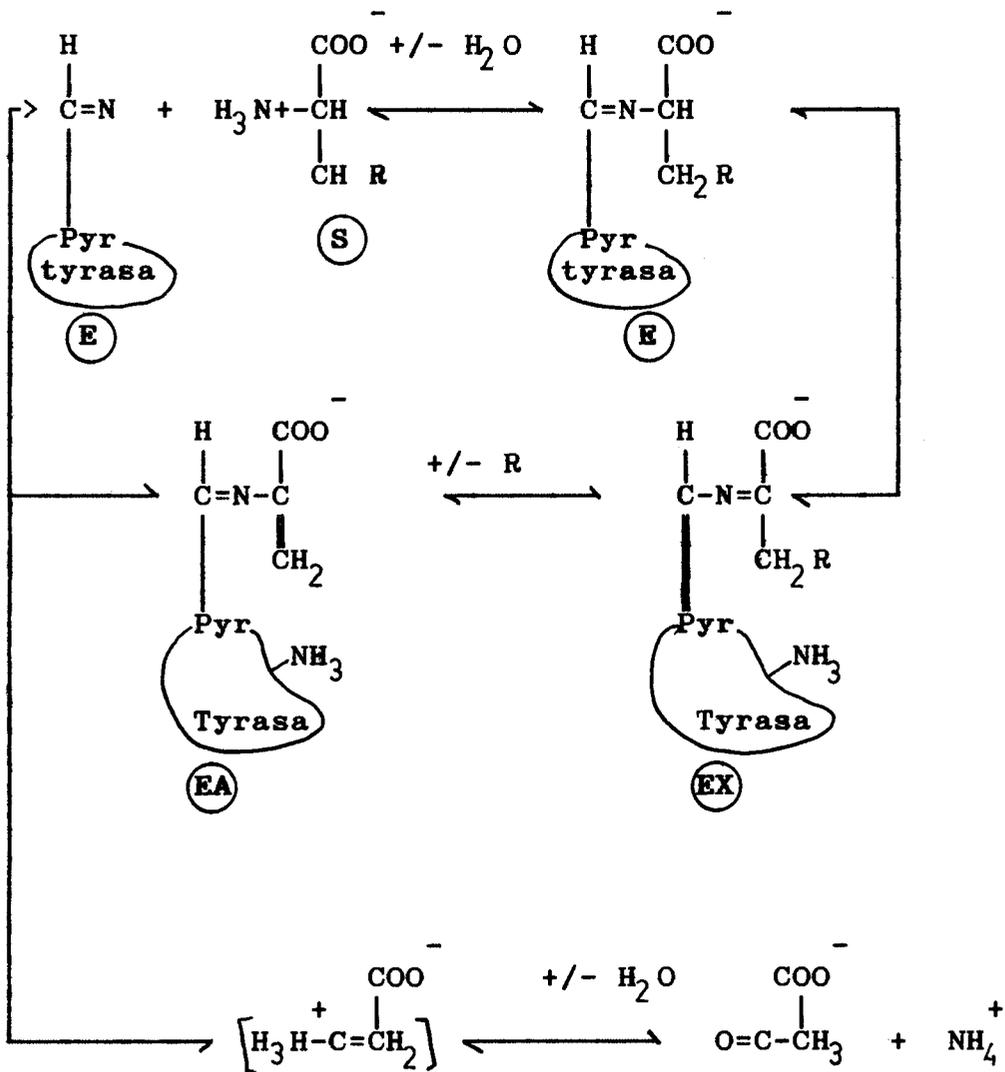
La teoría sobre la transformación de aminoácidos bajo la acción de enzimas dependientes de PLP se propuso primeramente en los años 50's por Braushtein y Shimianki (10), también esta misma concepción se formuló en los Estados Unidos de Norteamérica por la escuela de Snell (104). Los conceptos tanto de rusos como americanos, coinciden mucho en la naturaleza de acción de las enzimas que catalizan reacciones del tipo 1.1; o del tipo 1.1 y 1.2, es decir,  $\alpha$ ,  $\beta$ -eliminación y liasas ambifuncionales. Estos mecanismos se representan en el Esquema 1.1.





Esquema 1.1. Mecanismo de la reacción  $\alpha,\beta$ -eliminación y  $\beta$ -sustitución catalizadas por liasas dependientes del PLP (24).

Tysichnaya (110) menciona un mecanismo de las reacciones catalizadas por la TFL propuesto por Enei, este mecanismo se muestra en el Esquema 1.2. (110); donde el sustrato S (R: - radical fenilo,  $-\text{SCH}_3$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{SH}$ ) al interaccionar con la enzima E y por eliminación forma  $\text{H}^+$  y  $\text{R}^-$  (fenol,  $\text{CH}_3\text{SH}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  ó  $\text{H}_2\text{S}$ ), aldimina (ES); cetimina (EX) y enzima- $\alpha$ -aminoacrilato (EA). Este (EA) se hidroliza para producir piruvato y amonio regenerando así la enzima. Al adicionar a (EA) fenol ó pirocatecol además de la hidrólisis ocurre la producción de L-tirosina ó L-DOPA en la reacción inversa.



Esquema 1.2 Mecanismo de las reacciones catalizadas por TFL (32).

Para sustituciones específicas de  $\beta$ -eliminación de liasas tipo 1 y liasas ambivalentes tipo 1 + P esta secuencia de etapas se fortalece con las siguientes demostraciones convencionales (24): el rápido intercambio isotópico del átomo H- $\alpha$  y  $\beta$ -sustituyente electrofílico X que se encuentra en la posición trans; la presencia de un máximo de absorción en los espectros del sistema sustrato-enzima (S-E) en la región de 490-500 m $\mu$ .; la unión nucleofílica de acuerdo a Michael: N-etil maleínimida con el átomo  $\beta$ -carbonílico del doble enlace de la coenzima-complejo iminoacrilato en el sitio activo de la enzima con la formación de un ducto de inhibidor y liberación de  $\beta$ -cetoácidos (105).

De acuerdo a este mecanismo, las reacciones ambivalentes de  $\alpha,\beta$ -eliminación por liasas de reacciones  $\beta$ -sustitución 2, de acuerdo a su cinética en la fase estacionaria responde al tipo "Ordered Ping Pong Bi Bi" (21), y las de  $\alpha,\beta$ -eliminación surge de acuerdo al tipo "Uni ordered Tri" (21,120).

Los sustratos de la tirosinasa que presentan una sola cadena y se desarrollan siguiendo la adición intramolecular 1,4 de Michael son la L-tirosina, L-DOPA, mientras que los que no siguen esta adición son el fenol, catecol y p-cresol (12).

Un mecanismo para las liasas (tirosinfenoliasa y triptofanoindoliasa) dependientes de PLP en la reacción de eliminación fué propuesto por Kiick en donde se dice que la reacción es intrínseca por causa de la múltiple transferencia de protones en el mecanismo catalítico y por la transferencia interna de un protón de la posición dos del sustrato a la salida del anillo fenólico. Se forma un quinoide, primero la

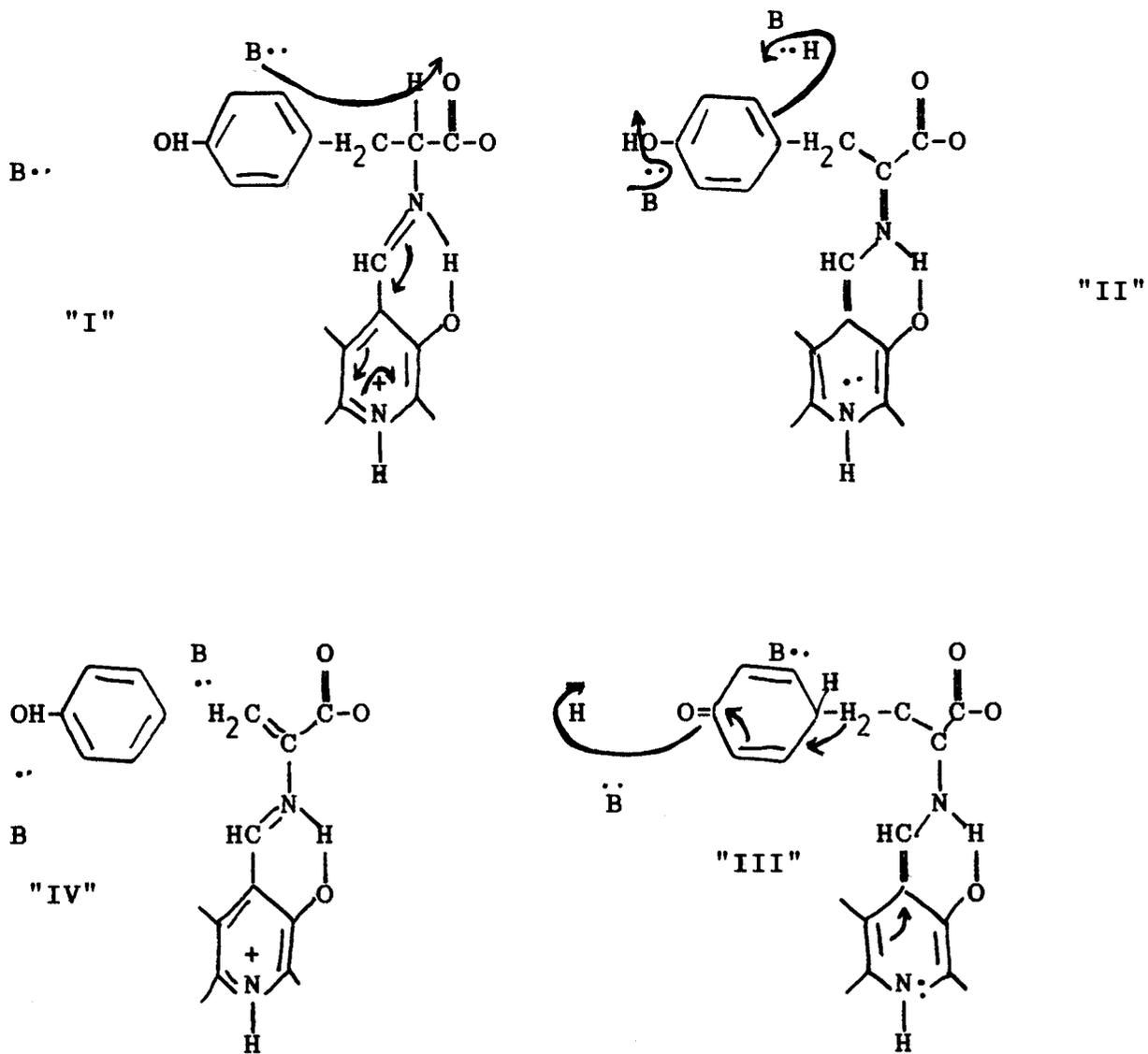
tautomerización del anillo fenólico al ciclohexanoide y la subsecuente eliminación del fenol. Las enzimas de E.herbicola y C.freundii catalizan la misma reacción y al parecer tienen un requerimiento de dos grupos enzimáticos desprotonados de manera de facilitar la catálisis (50).

Para TFL de E.herbicola Kiick propone el siguiente esquema(50):



Este esquema representa el mecanismo de protonación donde el sustrato puede unir a la enzima protonada y desprotonada y el complejo enzima-sustrato (ES) y enzima-sustrato-protón (ESH) se interconvierten directamente. La distribución entre ES y ESH puede variar con el pH y así, la velocidad de formación de enzima-producto (EP) es dependiente del pH (50).

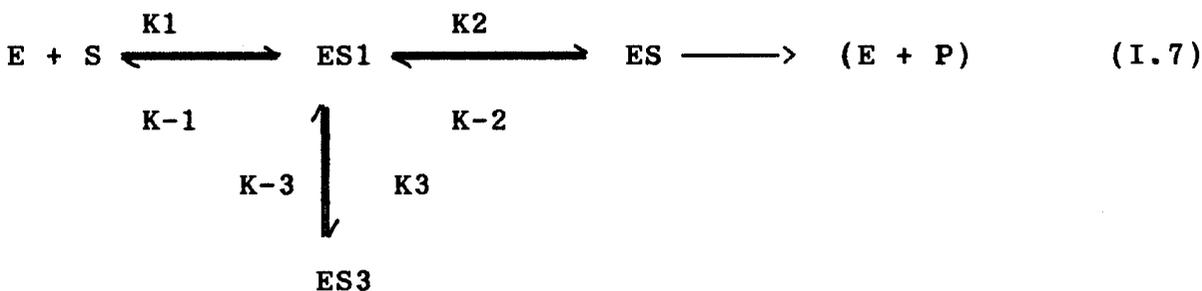
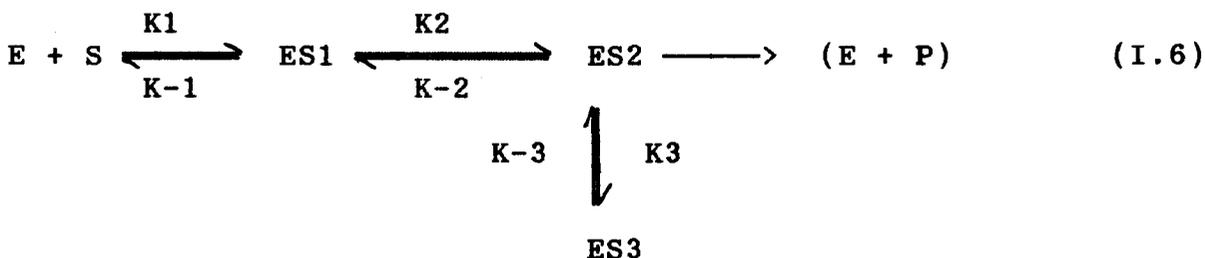
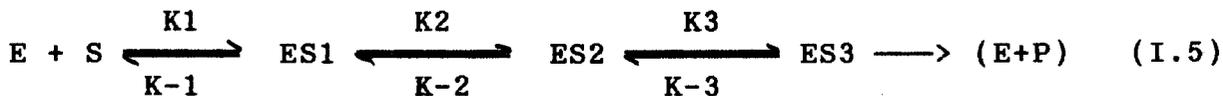
En el caso de C.freundii la unión del sustrato se da solo en la forma de la enzima perfectamente desprotonada. La manera de saber esto fué por la variación de pH por los efectos de un isótopo utilizado. La abstracción del protón determina parcialmente la velocidad del sistema TFL de C.freundii, Esquema 1.3 (50).



Esquema 1.3. Mecanismo químico de la reacción TFL.

Investigadores japoneses Yamada y Kumagi introdujeron al mecanismo indicado, algunos cambios (69) Esquema 1.4.

En base a las investigaciones cinéticas con la ayuda del método Strui de reacción  $\alpha, \beta$ -eliminación de tirosina catalizado por TFL (16), se establecieron tres procesos elementales y se propuso un esquema para este sistema:



Se determinaron las constantes elementales de velocidad:

$$K1 = 1.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1} \quad K-1 = 7.8 \text{ seg}^{-1}$$

$$K2 = 0.46 \text{ seg}^{-1} \quad K-2 = 0.15 \text{ seg}^{-1}$$

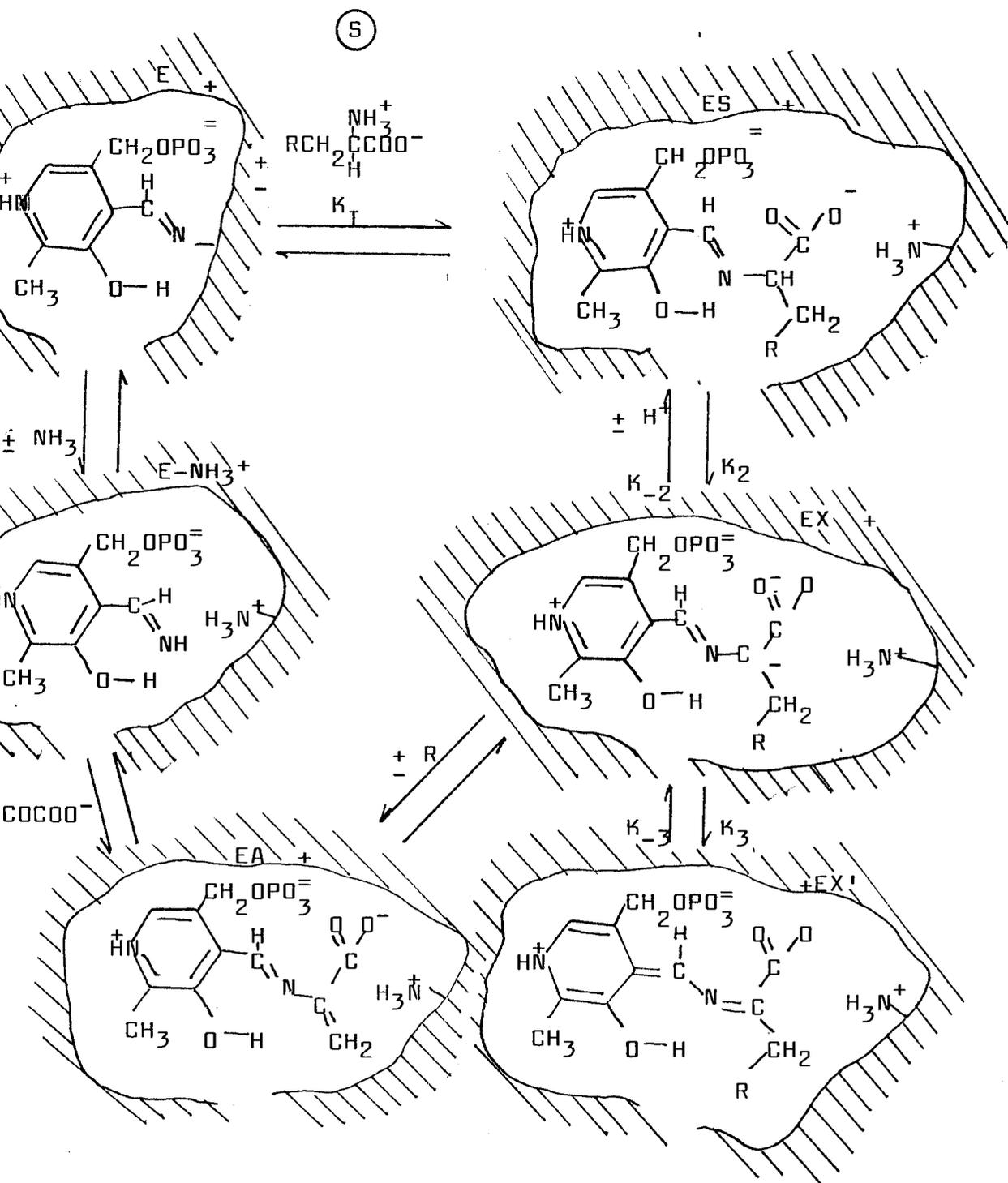
$$K3 + K-3 = 3.4 \times 10^{-2} \text{ seg}^{-1}$$

En estos sistemas el complejo ES1 es la primer partícula intermedia que tiene un máximo de absorción a 500 nm. El esquema 1.5 se puede excluir debido a que la magnitud ( $K_3 + K_{-3}$ ) es mucho menor que  $K_{cat}$ . La constante de velocidad  $K_2$  para el proceso  $ES_1 \longrightarrow ES_2$  resulta aproximadamente igual a la velocidad de toda la reacción  $K_{cat} = 0.50 \text{ seg}^{-1}$ , es decir, que esta etapa es la velocidad que limita.

El mecanismo común representado en el Esquema 1.2 corresponde al Esquema 1.6, parece estar completamente de acuerdo en que se puede expresar EX como  $ES_2$ , y el proceso de labilización - protón como la etapa más lenta. Sin embargo, el significado de  $K_1$  para el sistema es inferiormente menor en algunos ordenes que la constante de la velocidad que controla la difusión (7) por eso, al mecanismo de formación  $ES_1$  a partir de E y S puede ser más complicado. No se excluye la posibilidad de que la velocidad determinante de la etapa sea el desprendimiento del fenol ( $EX \longrightarrow EA$ ), es decir, tomar EX en forma de  $ES_1$  en el Esquema 1.7.

El estudio cinético de reacciones de 3 sustratos, como es el caso de la síntesis de tirosina a partir de fenol, piruvato de sodio y amonio catalizada por TFL, mostró que la reacción surge de acuerdo al tipo "Ordered Ter-Uni" (49). Del análisis de las dependencias cinéticas en coordenadas inversas de Lineweaver-Burk, las investigaciones de espectros de acción de TFL sobre sustratos experimentales, se sugiere que el intercambio de protón se lleva a cabo primero por la unión con el complejo holoenzima-amoniaco, después piruvato y al último fenol (125).

Se obtuvieron resultados similares para la síntesis de L-triptofano a partir de indol, piruvato de sodio y amoniaco, catalizado por triptofanoamoniacoliasa (TAL). Pero se necesitaron investigaciones adicionales para finalmente establecer el orden de unión de los sustratos con el sitio activo de la TFL y TAL. La triptofano indoliasa cataliza la reacción de eliminación para formar indol, piruvato y amonio a partir de L-triptofano, esta enzima es PLP-dependiente y está ampliamente distribuida entre las enterobacterias, especialmente E.coli y se sugiere un mecanismo de reacción en donde la indolenina, tautómero del triptofano es un intermediario y juega un importante papel en la activación de la unión carbono-carbono (C-C) para facilitar la eliminación del indol. Algo similar se propone para la TFL de E.herbicola y C.freundii, también dependiente de PLP en la reacción de eliminación, se requiere la activación de la unión C-C para facilitar la eliminación del fenol. TFL de C.freundii tiene un mecanismo de protonación en donde el sustrato se une solamente con la forma de la enzima correctamente protonada (49).



Esquema 1.4. Mecanismo de reacción de  $\alpha,\beta$ -eliminación en la reacción de síntesis de tirosina y análogos, catalizadas por TFL.

## CAPITULO 2.- REGULARIDADES CINETICAS DE REACCIONES ENZIMATICAS EN CELULAS DE MICROORGANISMOS

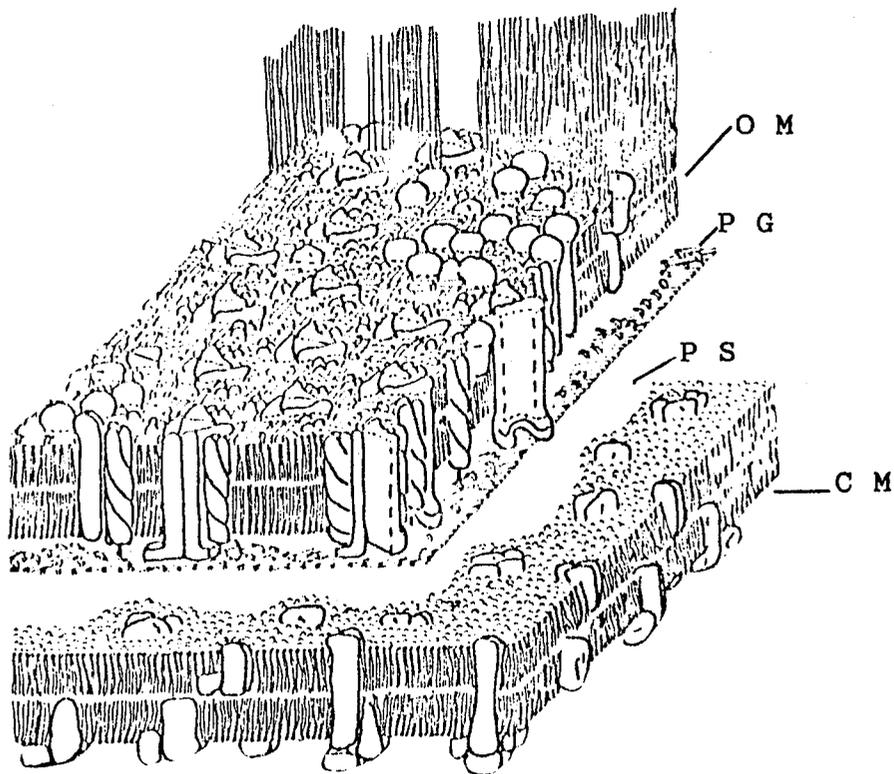
Sobre la cinética de las reacciones catalizadas por enzimas que se encuentran localizadas en células de microorganismos, un efecto esencial lo tiene el proceso de transferencia de masa de los reactivos a través de la pared celular, por eso es necesario describir como está constituida esta pared celular (110).

### 2.1. Estructura de membranas celulares de bacterias Gram (-) y su permeabilidad para diferentes sustancias

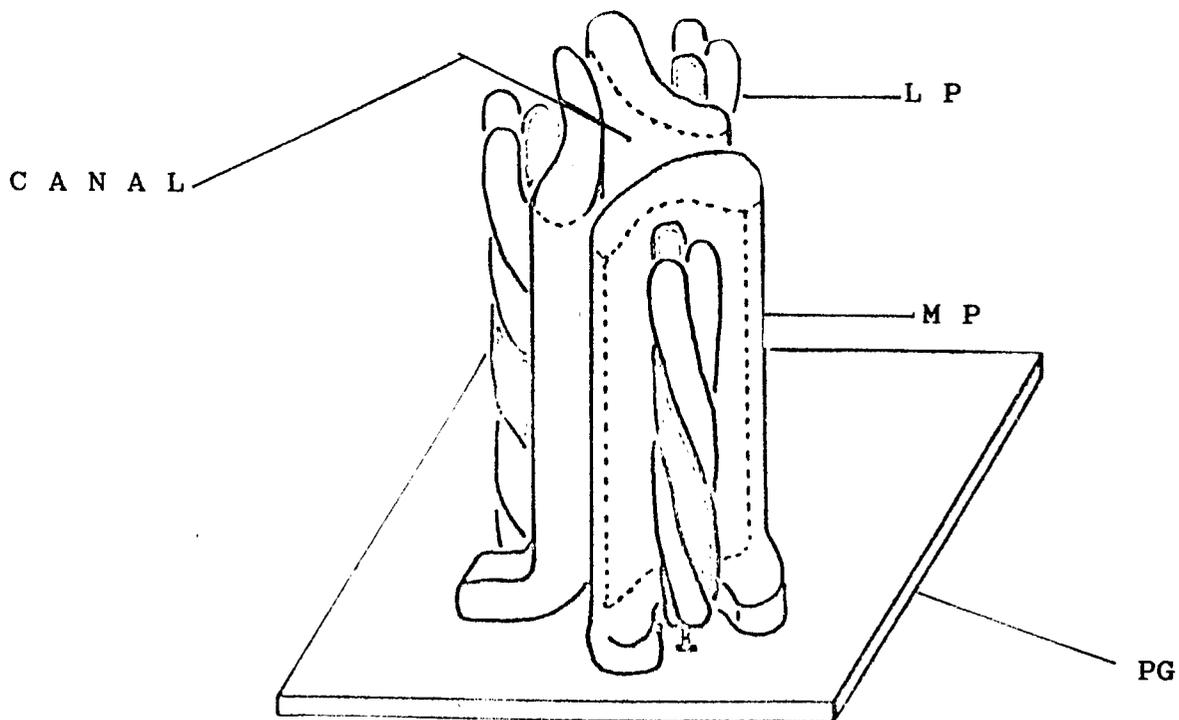
La membrana celular de bacterias Gram (-) (81) tiene una estructura compleja (Esquema 2.1), ya que está constituida por dos membranas: externa y citoplasmática. La membrana exterior contiene lipoproteínas, fosfolípidos, lipopolisacáridos y sus complejos. Las lipoproteínas y algunas proteínas de la membrana externa están unidas covalentemente con la capa de peptidoglicanos, la cual le da forma a la célula y la abastece de un mecanismo de defensa. La membrana externa efectúa una función fisiológica como una barrera hacia el medio ambiente, no permitiendo la salida y entrada a la célula de agentes antibacterianos y manteniendo las enzimas "superficiales" en el espacio periplasmático (94,95), como la enzima TFL de Citrobacter freundii-62 que se encuentra localizada en la superficie periplasmática de la célula (60).

En la membrana externa están localizados poros (Esquema 2.2), los cuales facilitan la entrada de sustancias a través de la membrana (73).

Se sabe que algunos poros hidrofílicos están formados por complejos de lipopolisacáridos y fosfolípidos con proteínas que son estabilizados por cationes divalentes o poliaminas.



Esquema 2.1. Estructura de la membrana celular de bacterias Gram(-). OM:membrana externa, PG:capa peptidoglicólica, PS:espacio periplasmático, CM:membrana citoplasmática.



Esquma 2.2. Estructura de un poro de la membrana celular.  
LP:lipopolisacáridos, MP:proteínas, PG:capa -  
peptidoglicólica.

La especificidad de los poros se determina por las proteínas, llamadas porinas. A través de algunos poros pueden penetrar una o varias sustancias estructurales. Por la membrana externa se difunden algunas moléculas hidrofílicas sin carga con peso molecular inferior a 650 d. (73), por ejemplo antibióticos  $\beta$ -lactámicos. La difusión de antibióticos hidrofóbicos de peso molecular superior a 1200 d. depende de la temperatura y la composición de lipopolisacáridos de la pared celular. Es probable que moléculas con un elevado coeficiente de distribución en el sistema de 1-octanol-fosfato de sodio 0.05M, pH=7.0, pueden penetrar en la célula bacteriana por la ruta de difusión pasiva por la región hidrofóbica de la membrana externa, se ha descubierto además, un mecanismo específico de difusión para una serie de sustratos.

La segunda membrana de la célula bacteriana es la citoplasmática. Esta membrana contiene gran cantidad de lípidos sobre todo fosfolípidos, los cuales forman complejos con proteínas. De acuerdo a esta estructura, las membranas de bacterias, animales y vegetales son semejantes; surgiendo así el concepto sobre una membrana universal elemental, de tal manera que a partir del primer modelo elemental de propuesto por Daniel se propusieron otros modelos específicos de membrana y en ninguna de ellas se explican muchos de los datos experimentales. Uno de los modelos ampliamente utilizados es el de Mosaico de Fineaf (38), en el cual la membrana se representa como un lago lipídicos con pequeñas islas flotantes de proteínas, las moléculas de proteínas exteriores, las cuales son más móviles y tienen la capacidad de cargarse en la capa

lipídica y unirse con proteínas interiores formandose de esta forma un canal único. La permeabilidad del canal a sustancias solubles en agua se determina por el tamaño del canal, algo característico de los grupos polares de las proteínas, las cuales son invertidas en el interior del canal dependiendo de la frecuencia y del tiempo de existencia de este. La membrana citoplasmática juega un papel importante en el intercambio de sustancias (materia) y sobre todo el papel de la barrera osmótica, la cual controla el ingreso de diferentes sustancias a la célula y hacia fuera de esta. En la membrana se localizan sistemas de transporte activo y un sistema de permeasas a sustratos específicos, o proteínas transportadoras (62). El transporte de masa de los reactivos a través de la membrana citoplasmática puede ocurrir por la ruta de difusión pasiva por la Ruta de Fik. La velocidad de penetración de las sustancias a través de la membrana depende de la solubilidad de éstas en los lípidos y del tamaño de las moléculas. Con el estudio de la permeabilidad de membrana lipídica usada como modelo para algunas enzimas se propuso un mecanismo de tres etapas de transporte, el cual incluye: la adsorción de la enzima en la superficie de la membrana, difusión a través de la capa de lípidos y la desorción de la enzima de la membrana. La difusión surge por las fluctuaciones térmicas de las membranas de lípidos; esta es una etapa limitante. Se ha observado la correlación entre la acción de diferentes factores sobre la difusión y la permeabilidad total. La temperatura influye sobre el estado físico de las membranas celulares. El nivel de movilidad de las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos posee

un significado esencial para el funcionamiento de los sistemas enzimáticos en las membranas celulares y para la permeabilidad de la membrana. La disminución o aumento de temperatura conducen respectivamente a un excesivo "endurecimiento" o "dilución" de los ácidos grasos presentes en la membrana (110).

El flujo de sustancias a través de la superficie de la membrana por unidad de tiempo ( $j$ ) se determina:

$$j = A h S \quad (\text{Ec. 2.1})$$

donde:  $A$ = área de la membrana.

$S$ = diferencia de concentraciones de las sustancias que se difunden por ambos lados de la membrana.

$h$ = permeabilidad de la membrana que tiene margen de velocidad.

Para macromoléculas:

$$h = \frac{D g}{L} \quad (\text{Ec. 2.2})$$

donde:  $D$ = coeficiente efectivo de difusión de la sustancia a la membrana.

$g$ = coeficiente de distribución del difundiente entre la sustancias, la membrana y la solución.

$L$ = espesor de la membrana.

En la actualidad se ha obtenido una gran cantidad de datos experimentales relacionados con la permeabilidad de modelos de membranas y membranas naturales (106).

En una serie de casos se observa una desviación fundamental de la Ec 2.2. de tal manera que el camino de difusión es muy pequeño y la barrera de activación del proceso es muy grande (106). Estas magnitudes anómalas de permeabilidad se encontraron para el agua ( $5 \times 10^{-4}$  -  $2 \times 10^{-3}$  cm/seg), glucosa ( $2 \times 10^{-4}$  cm/seg), electrolitos (106).

El periodo de inducción que se presenta unido a la modificación de la membrana celular, dependen de la partida de células y del tiempo de conservación de la biomasa (110).

## 2.2 Algunos métodos para aumentar la permeabilidad de membranas celulares

La permeabilidad de membranas celulares se aumenta si previamente se calientan células de E.coli. Esto aumenta la permeabilidad, debido al desprendimiento de lipopolisacáridos, o por el cambio del estado físico de los componentes de las membranas (62).

Las células de bacterias Gram (-) tratadas con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) también quedan más permeables para una serie de metabolitos, uniendo cationes divalentes de metales. El EDTA destruye los complejos de lipopolisacáridos y los complejos de lipopolisacáridos con fosfolípidos. Bajo éstos, la membrana externa pierde desde una tercera hasta la

mitad de lipopolisacáridos, una cantidad considerable de proteínas y fosfolípidos. Además de EDTA, se usan otras sustancias acomplejantes (94).

Para aumentar la permeabilidad de la membrana celular se usan plasmolizadores: ésteres, cloroformo (94), dimetilsulfóxido, mezcla de benceno con glicerina, alcoholes alifáticos, alcohol etílico, eter, acetona, glicerina (110), los cuales extraen una cantidad considerable de material de la pared celular, al mismo tiempo que proteínas, destruyendo con esto la membrana. Como en el caso de células de Citrobacter freundii que fueron tratadas con acetona y alcohol ocurriendo la deslipidización de la membrana y la disminución de su actividad enzimática TFL (110). Es sabido que el tolueno destruye la membrana citoplasmática de la célula de microorganismos. A consecuencia de esto, las membranas se hacen permeables para una serie de sustancias de bajo peso molecular y macromoléculas, pero quedan impermeables para proteínas de alto peso molecular mayor de 150,000 d. El grado de destrucción de la membrana se determina por las condiciones del tratamiento (27) ; 1% de tolueno en presencia de EDTA ocasiona una destrucción considerable de la membrana celular y un 10% de tolueno la destruye totalmente (90). La presencia de cationes de magnesio estabilizan la membrana externa.

Un interés particular para nosotros es la acción del fenol sobre la membrana celular ya que este es un sustrato de la reacción que es objeto de estudio. El fenol es un plasmolizador de la pared celular, y produce una modificación de la envoltura celular ya en el curso de la reacción, haciendo así innecesario

el tratamiento complementario con otros plasmolizadores de las células de Citrobacter intermedius que funge como biocalizador (110).

Bajo la extracción por fenol de los tejidos de células completas de microorganismos, de paredes celulares y del sobrenadante celular; gran parte de las glicoproteínas de la célula, proteínas, ácidos nucleicos se distribuyen en la fase fenólica y los lipopolisacáridos en la fase acuosa. La extracción de glicoproteínas no depende de la temperatura en el intervalo de 4-70 °C. Para la solubilización de membranas se usan los detergentes; estas sustancias superficialmente activas influyen en la permeabilidad de la membrana celular de diferentes cepas microbianas (110), en la interacción del complejo enzima-sustrato (ES), en la cinética de transferencia de masa, en la muerte de las células y en la estimulación de la biosíntesis de productos compuestos.

Las propiedades de los detergentes en lo que se refiere a la solubilización e inactivación de proteínas dependen de su tamaño, sus partes hidrofóbicas y su interacción con los componentes de la membrana celular. La acción más suave de los detergentes la poseen los no iónicos: Triton X-100, Tivin 20, Tivin 80, Emasol-135, los cuales solubilizan efectivamente la membrana citoplasmática de las bacterias (56,90).

Se sabe que el Triton X-100 practicamente no destruye la proteína-interacción protéica de la membrana externa de E.coli, también se ha probado en células de Citrobacter freundii (108) solubilizando solo una parte de lipopolisacáridos y fosfolípidos, pero en presencia de EDTA se solubiliza la mitad

de proteína y todos los fosfolípidos de la membrana celular externa (110). La destrucción de la membrana por detergentes se puede aumentar también en presencia de solventes orgánicos o bajo congelamiento de una suspensión celular, está establecido que en este último caso las células de microorganismos quedan permeables para macromoléculas de peso molecular de hasta 70,000 d.

### 2.3. Particularidades cinéticas de las reacciones catalizadas por células de microorganismos.

En la actualidad se encuentra muy bien estudiada la cinética de las reacciones catalizadas por enzimas pero las condiciones de surgimiento de las reacciones enzimáticas en las células y en la solución no son idénticas. En el interior de la célula se diferenciarán pH, composición química del medio, temperatura, concentración de enzima local, concentración de sustrato local, debido a que las enzimas "in vivo" catalizan reacciones en secuencia que constituye una ruta metabólica. En las células de microorganismos existen algunos mecanismos de regulación de las enzimas (23).

Algunos estudios preliminares de sobreproducción de L-fenilalanina y L-tirosina con mutantes resistentes a análogos de estos aminoácidos muestran que las mutantes tienen una desregulación parcial en la ruta biosintética (68,101). Las cepas que llevan mutaciones que afectan el mecanismo de biosíntesis de aminoácidos los sobreproducen y llegan a ser resistentes a los efectos tóxicos de los análogos de estos aminoácidos (85).

Además, sobre la cinética de reacción catalizada por células, la transferencia de masa de los reactivos a través de la membrana celular ejerce una gran influencia. La velocidad de reacción de reacciones catalizadas por enzimas en células de microorganismos, dependen de las velocidades de los procesos de transporte de los reactivos a través de las membranas celulares (112). Al conocer las regularidades cinéticas no se logra extraer información sobre la reacción enzimática en la célula

propiamente dicha. Al llevar a cabo una reacción enzimática utilizando enzimas en la célula "in vivo" se dificulta el empleo de datos obtenidos para las enzimas extraídas ( $K_m$ ,  $V$ , etc.) (78,90,110).

Desde el punto de vista de la cinética, uno de los procesos más simple es el de transporte de sustratos o productos de acuerdo al gradiente de concentración por la ruta de difusión pasiva. La resistencia fundamental al transporte de masa es función de las condiciones en las que se efectúa la reacción y pueden ser: la capa de difusión externa, las membranas celulares, y la difusión interna. La difusión externa se puede eliminar por una agitación efectiva. Si se puede eliminar el problema de difusión interna, entonces la velocidad observada del proceso dependerá de la correlación de velocidad, la transferencia a través de la membrana y la velocidad de reacción enzimática dentro de la célula. La reacción de síntesis de L-tirosina catalizada por la enzima TFL es de interés práctico, además que es un modelo cómodo para el estudio de las particularidades del funcionamiento de las enzimas en las células de microorganismos; en esta reacción se aprecia un periodo de inducción que se presenta unido a la modificación de la membrana celular, y depende de la partida de células y del tiempo de conservación de la biomasa (90). En ésta cinética de reacción se aprecian dos periodos: inducción y región lineal (110).

Con el estudio de la cinética de la acción de la hidrogenasa en células G(-) de T. reeseopersicina, S.D. Varfolomeev, M.C. Safonov, G.F. Zudina (115), propusieron ver a la célula en el

sentido cinético como un microreactor de membrana. Los aspectos fundamentales de este modelo fueron: 1) la célula es considerada como partícula esférica con radio (R), un grosor de membrana celular (l) considerablemente menor al radio de ésta; 2) la enzima se encuentra distribuida homogéneamente dentro de la célula; 3) la transferencia de los reactivos a través de la membrana celular se produce por ruta de difusión; 4) los efectos de difusión externa se eliminan bajo agitación intensiva; 5) la movilidad de difusión de los reactivos dentro de la célula es esencialmente superior que en la membrana; los gradientes de concentración de los reactivos dentro de la célula no son considerables de acuerdo a estas disposiciones. La cinética intracelular de la reacción de un solo sustrato se puede describir por las siguientes ecuaciones:

$$\frac{d [Sc]}{dt} = K g ([So] - [Sc]) - V_f \quad (2.3)$$

$$\frac{d [Pc]}{dt} = V_f - K'g [Pc] \quad (2.4)$$

donde: [Sc] y [Pc] = concentraciones de sustrato y producto de la reacción dentro de la célula.

[So] = concentración del sustrato en la solución

V<sub>f</sub> = velocidad de reacción enzimática dentro de la célula.

K<sub>g</sub> y K'<sub>g</sub> = constantes de la velocidad de difusión del sustrato y producto a través de la membrana celular.

La constante de velocidad de difusión (84):

$$K_g = \frac{D A}{l V} \quad (2.5)$$

donde:  $D$  = coeficiente de difusión del sustrato a través de la membrana celular ( $\text{cm}^2/\text{seg}$ ).

$l$  = grosor de la membrana (cm).

$A$  = superficie de la membrana ( $\text{cm}^2$ ).

$V$  = volumen de la célula ( $\text{cm}^3$ ).

La correlación  $D/l$  es la permeabilidad de la membrana  $h$  (2.2), suponiendo que el coeficiente de equilibrio de distribución para la fase que divide a la membrana es 1.

En el caso de células esféricas, el radio ( $R$ ) y bajo altas concentraciones de sustrato, sustancialmente que sobrepasa la constante de Michaelis, la cinética de acumulación del producto en el sistema será descrito por las ecuaciones :

$$Q = \frac{3}{4} R^3 N V_{\text{máx.}} \left( 1 - e^{-t/\tau} \right) \quad (2.6)$$

donde:  $Q$  = cantidad de producto.

$N$  = número de células en el sistema.

$\tau = R/3h$  = tiempo de relajamiento.

En las investigaciones analizadas en las curvas cinéticas de formación de  $H_2$  en las reacciones con células se observó un periodo de inducción después del cual, la reacción pasó a un regimen estacionario con una velocidad constante de desprendimiento de  $H_2$ . La reacción enzimática, como confirman los autores de este modelo ocurre con una velocidad máxima ( $V_{max}$ ). La transferencia de reactivos a través de la membrana no determina la velocidad del proceso y el periodo de inducción está relacionado con la acumulación de  $H_2$  en las células pero no se determinaron las dependencias cinéticas de la velocidad de consumo de sustrato en función del tiempo. Las investigaciones se efectuaron con un pretratamiento de congelación de una suspensión celular de T. roseopersicina, como se sabe bajo este tratamiento la pared celular se destruye y la permeabilidad aumenta, aunque de acuerdo a datos de literatura (115), la hidrogenasa de algunas cepas de bacterias se encuentra localizada en las fracciones de membranas de células que son solubles. No es correcto afirmar que la enzima se encuentra homogéneamente distribuida en la célula (suposición 2) y no siempre se cumple (condición 5) que la distribución de sustrato y producto dentro de la célula sea homogénea, es necesario considerar la transferencia de masa dentro de la célula así como los procesos adicionales, en los cuales estos participan.

Como mostró el estudio cinético de la reacción aspartatoaminotransferasa en E.coli, el modelo de microreactor de membrana no es adecuado en esta reacción. La magnitud del periodo de inducción así como la acumulación del producto de

reacción (ácido málico) en el volumen externo dependieron de las condiciones en las que se efectuaba el experimento. El periodo de inducción disminuye para células inmovilizadas y no se observa bajo altas concentraciones de sustrato, bajo un tratamiento previo con tolueno de las células o con el empleo de células distribuidas, es decir, bajo condiciones en las que aumenta la permeabilidad de la membrana celular. La velocidad de reacción aspartatoaminotrasferasa alcanzaba su más alto significado bajo altas concentraciones de sustrato y bajo empleo de células inmovilizadas de E.coli; en el caso de células nativas, la velocidad no ocurría con su máximo significado. De esta manera las investigaciones mostraron que con la descripción de las regularidades cinéticas de la reacción en células, es necesario tomar en cuenta la influencia de transferencia de masa de los reactivos a través de la pared celular.

Independientemente de las insuficiencias de este modelo, es decir, ver a la célula como microreactor de membrana, se puede utilizar para el estudio de cinética de microencapsulación de enzimas y sistemas enzimáticos. En relación con el modelo analizado de los datos experimentales se pueden calcular permeabilidad de membrana, máximo flujo de producto en el caldo por una célula y otros parámetros, que es una de las virtudes del modelo. El modelo indicado se puede usar para enzimas que están localizadas en el espacio periplasmático de las células. En este caso los sustratos alcanzan el sitio activo de las enzimas por difusión solamente en la membrana externa de la célula y la difusión interna de la célula se puede eliminar.

Bajo una agitación efectiva, la difusión externa se puede eliminar, a partir de los conceptos dados y determinando los parámetros cinéticos de la reacción  $K_m$  y  $V_{m\acute{a}x}$ . de los experimentos. En extractos celulares se calculó la permeabilidad a una serie de antibióticos  $\beta$ -lactámicos en la membrana externa de células de E.coli y S.typhimurium, de las cuales la  $\beta$ -lactamasa se encuentra localizada en el espacio periplasmático. Se descubrió una buena coincidencia con el modelo y con los datos experimentales para los antibióticos mencionados, a excepción de cefalotina y benzilpenicilina (73).

Con el estudio de las regularidades cinéticas de la síntesis del ácido aspártico a partir de fumarato de amonio, catalizada por células libres e inmovilizadas de E.coli, Berezin, Yakovleva y Zueva propusieron un modelo alternativo de esta cinética (129). De acuerdo a este modelo la velocidad de reacción se determinó por la velocidad de transferencia de sustratos dentro de la célula de microorganismos. El proceso de transferencia de masa se puede limitar o por la velocidad de difusión a través de la pared celular externa, o por la velocidad de transporte a través de la membrana citoplasmática con la participación de proteínas acarreadoras.

Veamos la variante cuando la velocidad del proceso se limita por la velocidad de difusión común a través de los poros de la membrana externa. En este caso se propone: 1) la difusión ocurre en correlación a la ley de Fik; 2) las moléculas de sustrato previamente se adsorben sobre la superficie externa de la membrana  $S_o$  y en la solución la concentración de sustrato se describe por el isoterma de adsorción de Miur; 3) empezando

con una pequeña concentración de sustrato en la solución de tal manera que la concentración en la superficie externa de la membrana será muy próxima a la magnitud límite de adsorción  $S_a'$  y prácticamente no cambiará en el transcurso del experimento cinético; 4) la concentración de sustrato dentro de la célula  $S_c$  e interiormente de la superficie de la membrana  $S'a$  será muy pequeña y la velocidad de la reacción enzimática no alcanza su máximo significado. En estas condiciones la velocidad de consumo de sustrato se puede representar:

$$\frac{d[S]}{dt} = \frac{D \sigma}{V l} ([S_a] - [S'a]) \approx K\pi ([S'a] - [S'a]) \approx \bar{K}\pi \quad (2.7)$$

donde:  $D$  = coeficiente de difusión de sustrato a través de la membrana de un área  $\sigma$  y con un espesor  $l$ .  
 $\bar{K}\pi$  = constante efectiva de la velocidad del proceso.

Una de las probables variantes es cuando se efectúa lentamente el proceso de transporte a través de la membrana citoplasmática de células con la participación de proteínas acarreadoras. En este caso, la formación de complejos sustrato-acarreador ( $S-\pi$ ), ocurre de acuerdo a un esquema sencillo:



Bajo la condición  $S \gg \pi$ , entonces  $S\pi \approx \text{constante}$  (2.9).

Entonces la velocidad de transporte y por lo tanto de toda la reacción se determina por:

$$\frac{d[S]}{dt} = K S\pi \approx \bar{K}$$

De esta manera el proceso de transporte en ambos casos se describe por la ecuación de orden cero para el sustrato e independientemente de la formación de un producto adicional:

$$[S]_{t=0} - [S]_t = \bar{K} t \quad (2.11)$$

$$P1 = \bar{K}1 t \quad (2.12)$$

$$P2 = \bar{K}2 t \quad (2.13)$$

La actividad enzimática total de la célula de acuerdo al So puede ser caracterizada cuantitativamente como una actividad específica condicionada según el consumo del fumarato.

$$A = \frac{\bar{K}\pi}{m} V = \frac{\bar{K}\pi}{m} \quad (2.14)$$

ya que la superficie de la célula  $\sigma$  es proporcional a su masa o a la actividad de proteína celular  $m$ . Bajo esto:

$$\bar{K}1 + \bar{K}2 = \bar{K}\pi ; \quad A1 + A2 = A \quad (2.15)$$

Lo que surge de este modelo son regularidades sencillas que se confirman con datos experimentales (129):

I.- Con células nativas de E.coli la reacción de síntesis de ácido aspártico prácticamente no ocurre. La velocidad de reacción aumenta en proporción al grado de activación de las células y el incremento en la permeabilidad de sus membranas.

II.- El tiempo necesario para la activación de células de E.coli-85 (periodo de inducción), depende principalmente del método de cultivo de células, edad de la cepa y del estado fisiológico de éstas. Lo mismo se ha observado en células de Citrobacter freundii con actividad tirosinfenoliasa (110).

III.- En las curvas cinéticas de consumo de fumarato de amonio y acumulación de ácido aspártico se observa un rígido periodo de inducción siempre constante. La velocidad de consumo de sustrato y acumulación de producto después del periodo de inducción se describe por las ecuaciones de orden cero.

IV.- Después de la destrucción de células de bacterias el periodo de inducción desaparece y la velocidad de síntesis de ácido aspártico aumenta considerablemente.

V.- La energía efectiva de activación de la reacción dada, depende del grado de activación de las células. Sus significados absolutos son de 4-12 Kcal/mol que son característicos para procesos de difusión.

VI.- La velocidad de síntesis de ácido aspártico depende de la concentración inicial de fumarato bajo la conservación del orden cero y en amplio intervalo donde se cambia su concentración. De esta manera, el conjunto de hechos expresados permite ver este esquema como lo suficientemente absoluto. Se observaron regularidades análogas para la reacción

aspartatoaminotransferasa.

La activación de células se puede efectuar por un tratamiento con tolueno, tratamiento térmico a 45 - 55°C, y en el proceso de inmovilización, las células bajo una incubación prolongada en una solución 1 M de fumarato de amonio. Es probable que la primera etapa de activación de las células de E.coli, consista en la separación de la capa mucosa de la célula, las sustancias que camuflan los poros de la membrana externa. La segunda etapa consiste en el aumento de la movilidad de las proteínas acarreadoras de reactivos en la membrana citoplasmática por su separación de ésta de algunos componentes de la membrana.

La demostración directa de la aplicación de este modelo se podría obtener midiendo la concentración real de sustrato y producto en la célula. Esta lectura representó grandes dificultades experimentales, pero en algunos casos el problema se resolvió mediante el método citofluorométrico de Stri (119). El principio del método consiste: el resultado de la reacción enzimática en la célula forma un producto fluorescente, la concentración del cual se mide. Utilizando este sustrato fluorescente, el diacetato de fluorocidina, se estudió la acción de la esterasa en diferentes células (Hela-células, L-células de músculos, 3T3-células) se demostró que la etapa de transferencia de sustratos a través de la membrana celular es la limitante. Bajo la investigación de la hidrólisis por esterasa mediante sustratos fluorogénicos por células de mamíferos, resultó que los sustratos fácilmente penetran en la célula. Al mismo tiempo la permeabilidad del producto a través

de la membrana celular es considerablemente mala y este se acumula en la célula. La  $V_{m\acute{a}x}$ . de la hidrólisis enzimática bajo la saturación por sustratos fué igual para células y extractos celulares la  $K_m$  del diacetato de fluorocidina para células intactas fué de  $2.9 \times 10^{-6}$  M. menor que en el caso de extractos celulares que fué de  $3.6 \times 10^{-5}$  M.

Bajo diferentes métodos de activación de células (tratamiento con saponinas, tripsinas, en presencia de EDTA, congelamiento y descongelamiento) la permeabilidad de las membranas celulares para el producto aumenta considerablemente. Se descubrió que la velocidad de la hidrólisis efectuada por el extracto es distinto para diferentes células de una misma cepa.

La velocidad observada del proceso es la magnitud media para toda la masa celular. De esta manera las investigaciones de regularidades cinéticas de reacciones en células no son comunes, a consecuencia de un gran número de dificultades experimentales. En una serie de casos se puede observar la  $V_{m\acute{a}x}$  de la reacción. En la mayoría de los ejemplos conocidos de proceso de transferencia de masa de sustrato o producto ejerce una gran influencia sobre la velocidad general del proceso.

Bajo un análisis más estricto de la cinética de reacción en células, es necesario considerar la resistencia a la difusión externa que se asocia a la membrana que no se mezcla "capa de Nernst" (112), en este caso la permeabilidad real  $h$  se representa:

$$\frac{1}{h} = \frac{1}{h \text{ apar.}} - \frac{\delta}{D_b} \quad (2.16)$$

donde:  $h$  apar. = constante aparente de permeabilidad.

$\delta$  = grosor de la capa de difusión de Nernst.

$D$  = coeficiente de difusión de la sustancia en la solución dada.

Se ha demostrado la influencia de la difusión de los reactivos a través de la capa que no se mezcla sobre la velocidad de transferencia de masa a través de la membrana biológica. Para considerar los efectos de difusión interna es necesario escribir la ecuación del proceso con la fuente, considerando la velocidad de reacción para cada uno de los componentes del sistema (112).

$$\frac{d[S]}{dt} = D \nabla^2 S - V_f \quad (2.17)$$

donde:  $D$  = coeficiente de difusión de sustancias dentro de la célula.

$V_f$  = velocidad de reacción enzimática dentro de la célula.

La cinética del proceso para partículas esféricas con radio  $R$  en reacción de orden cero y primer orden, se revisan detalladamente (112). Se aproxima la solución del problema para cinéticas de forma diferencial donde se consideran las medidas más características y las magnitudes medias de concentración.

Para la medida de la influencia de los efectos de difusión intracelular sobre la cinética de reacción puede servir el modelo de Tild de magnitudes y medidas (112). Bajo:

$$S_o \gg K_m \quad F_s = R \sqrt{V_{m\acute{a}x} / S_o D} \quad (2.18)$$

$$S_o \ll K_m \quad F_s = R \sqrt{V_{m\acute{a}x} / K_m D} \quad (2.19)$$

Si  $F_s \ll 1$  entonces el sistema trabaja en un régimen cinético y la distribución de sustrato dentro de la célula practicamente es homogénea.

Si  $F_s > 1$  la distribución no es homogénea y la influencia de la resistencia de la difusión interna sobre el proceso juega un importante papel.

De los cálculos de Shruler (112) se concluye que la resistencia de difusión interna no es considerable para las reacciones que ocurren en el citoplasma de la célula y se pueden eliminar en comparación a aquellas que transcurren con la transferencia de masa a través de la membrana celular.

### CAPITULO 3.- METODOS DE OBTENCION DE L-TIROSINA

Los aminoácidos son una serie de metabolitos de gran importancia en el buen funcionamiento del metabolismo de los seres vivos, especialmente para el ser humano. Siendo los aminoácidos los monómeros que componen las proteínas, son compuestos de suma importancia en el buen funcionamiento del cuerpo. Algunos compuestos nitrogenados que se sintetizan utilizando aminoácidos son: RNA y DNA donde participan los aminoácidos aspártico, glicina y glutamina; la hemoglobina requiere glicina; la adrenalina y tiroxina (hormonas de respuesta y crecimiento respectivamente) y los alcalóides tebaína y morfina requieren tirosina para su producción (18,44,67,74,82,99,108).

La mayoría de los aminoácidos provenientes de las proteínas de los alimentos son de la configuración L y de acuerdo a su estructura química, están sujetos a diferentes mecanismos de transporte (3), permitiendo así su absorción y asimilación para la síntesis de proteínas y otros compuestos de interés.

Existe un problema de desnutrición, el cual afecta principalmente a la población infantil del mundo entero; ya que no reciben suficiente alimento, así como su valor nutricional de proteína es bajo. Con esto, se hace necesario fortificar alimentos, mediante lo cual se hagan llegar al consumidor los aminoácidos necesarios para el buen funcionamiento del cuerpo con una elevación de la calidad de proteína. Así, la síntesis de aminoácidos representa un área importante, ya que los aminoácidos encuentran una amplia aplicación en la economía

nacional, se utilizan principalmente en la industria alimentaria, farmacéutica, ganadera, de la salud y microbiológica (65). Los aminoácidos de origen microbiano se han producido desde hace muchos años (77). La producción mundial de L-tirosina en el periodo de 1970-1980 fué de 10-50 Tns/año con un valor de 50 Dlls/Kg (47,58,105). Debido a la gran demanda en todo el mundo de los diferentes aminoácidos se ha venido profundizando en el estudio de los métodos adecuados para su uso práctico.

En la industria alimentaria, los aminoácidos se emplean principalmente en calidad de aditivos como saborizantes; edulcorantes (74). Tal es el caso del uso de la fenilalanina y el ácido aspártico para la producción del edulcorante artificial "aspartame" (68). Como agentes oxidantes y aditivos en la conservación de productos perecederos (18,60), en los Estados Unidos de Norteamérica entre otros aminoácidos, la L-tirosina se puede utilizar como aditivo alimentario y es un aminoácido indispensable y la 2,4-dihidroxifenilalanina, derivado de la tirosina se usa también como aditivo alimentario y como nutriente (74).

Las mezclas de aminoácidos se utilizan en la alimentación parenteral de la gente que se somete a grandes esfuerzos psíquicos y físicos. También se emplean estas mezclas como medios de cultivo para microorganismos y cultivo de tejidos.

Los aminoácidos son sustancias iniciales para la síntesis de polipéptidos y otras sustancias medicinales. La tirosina se utiliza como sustrato inicial para la síntesis de una serie de hormonas, como la hormona tiroidea, la adrenalina y

noradrenalina (60).

La tirosina es precursor de catecolaminas (4). En los animales un exceso de tirosina produce stress y estimula la secreción de hormonas como las catecolaminas y corticosteroides que estimulan la síntesis de colesterol (70); si aumenta la transaminación de la tirosina cerebral se podría desviar este precursor lejos de la síntesis del neurotransmisor (75), ya que la síntesis de catecolaminas está influenciada por la concentración de tirosina cerebral. Al aumentar la administración de este aminoácido, se promueve su síntesis. La síntesis de catecolaminas se puede examinar "in vivo" por el grado de hidroxilación de la tirosina (el cual es el paso determinante de la ruta). Al administrar tirosina se aumenta su concentración en cerebro así como la de 3,4-dihidroxifenilacético y noradrenalina (48). Una enzima de interés es la tirosinaminotransferasa cerebral debido a su posible influencia sobre la disponibilidad intracelular de la tirosina para la síntesis de catecolaminas. La alta transaminación de tirosina puede, en ciertas condiciones, jugar un papel cuantitativo importante en la regulación de síntesis de las catecolaminas cerebrales y la disponibilidad de tirosina circulante (5).

Desde el punto de vista fisiológico es de gran importancia la fosforilación de tirosina en el receptor de insulina que tiene influencia en la capacidad receptora del mismo solo bajo cierto grado de fosforilación (12,13,25,30,39,43,46,66,79), y puede ser importante en la señal de transducción del factor de crecimiento en embriones de ratas y ratones (22,97), también la

tirosina estimula la secreción adrenocorticoide (6,74).

En medicina se emplean derivados de tirosina como la iodotirosina, dibromotirosina y otros, para estimular la producción de tiroxina, se usan como constituyentes en la comida tanto directa como indirectamente, aumentando así la velocidad metabólica (44). Para una de las más terribles enfermedades, El mal de Parkinson se usa un derivado de la L-tirosina, la L-3,4 dihidroxifenilalanina (L-DOPA) y sus derivados (75,78,82,117).

De esta manera se deduce que los requerimientos de aminoácidos, particularmente de L-tirosina y L-DOPA son elevados. El requerimiento mundial de L-DOPA constituye varios cientos de toneladas por año. En el cuadro 3.1 se presentan algunos aspectos de la situación de este aminoácido en el extranjero.

CUADRO 3.1.		Producción mundial de L-DOPA		
Firma/ País	Tn / año	Método de obtención	Referencia	
Hoffman-La Roche/ E.U.A., Suecia.	100	Químico	18	
Bioderivatives/ E.U.A.	6	Extracción de plantas tropicales.	19	
Oymedica AB/ Finlandia.	20	Extracción apartir de leguminosas.	80	

La L-DOPA y sus derivados los producen también las firmas International Chemical Nuclear Co./ E.U.A.; Rone-pasilene/ Francia; Ajinomoto Co. / Japón.

La producción mundial de L-tirosina por extracción en 1977 fué de 10-50 Tn. a precio de 20-40 dl/Kg. (124).

Los métodos de obtención de aminoácidos se divide fundamentalmente en cuatro grupos:

1.- Extracción.

2.- Síntesis química con la subsecuente separación de racematos y racemización del isómero.

3.- Fermentación.

4.- Método enzimático (111).

Japón ocupa el primer lugar en la producción de aminoácidos, en donde casi todos los métodos de producción industrial se han probado y utilizado.

### 3.1. Métodos extractivos de producción de L-tirosina

La separación de aminoácidos de hidrolizados de proteínas es posible solamente cuando estos se diferencian marcadamente de otros aminoácidos, por ejemplo: cisteína y tirosina, gracias a su baja solubilidad se diferencian perfectamente de los aminoácidos que son solubles en agua.

Hasta ahora, la tirosina se produce a escala industrial solo por extracción de sustancias naturales (74) de la siguiente manera: como fuente para la separación de tirosina se encuentran algunas proteínas vegetales por ejemplo semillas de maíz (embrión) que contiene hasta 5% de tirosina y una serie de proteínas de origen animal: caseína y particularmente fibrína (seda). Dichas proteínas se someten a hidrólisis ácida o enzimática con tripsina, la hidrólisis enzimática ocurre en

varios días, y el rendimiento es de 5 - 7% por extracción (103).

La materia prima principal, con un rendimiento del 90% de L-tirosina son los desechos queratínicos de la industria ganadera, pesquera y textil, uñas, cuernos, lana, plumas, picos, pezuñas, crin, etc. En comparación con la disociación básica y enzimática de proteínas, la mejor es la ácida, que da una disociación completa de proteínas en un tiempo corto, no hay racemización de aminoácidos, la desventaja es que se destruye el triptofano (60).

La L-DOPA se ha encontrado en algunas plantas de la familia de las leguminosas (116). La extracción a partir de las plantas por una solución de ácido fórmico, acético, cloroacético o propiónico bajo pH de 2 a 6 y una temperatura de 10 - 80 °C añadiendo posteriormente al extracto acetato de plomo. De esta manera de 1 Kg. de leguminosa Vicia faba, se obtienen 18.9 gr. de L-DOPA. La firma Oymedica AB / Finlandia ha propuesto el método que consiste en la adsorción de L-DOPA a partir de un extracto de leguminosas en carbón activado, lavado con el eluyente respectivo y la adsorción del aminoácido en columna de intercambio iónico. La L-DOPA se extrae de estas leguminosas con ácido sulfúrico (80,124). Así, este método de extracción de aminoácidos se usa para obtener L-tirosina y L-DOPA en la actualidad, pero la materia prima la constituyen proteínas de buena calidad tanto de origen vegetal como animal y en la mayoría de los casos el rendimiento que se obtiene no es significativo. En el caso de proteína vegetal, al deshidratar las plantas, se pierde gran cantidad de L-DOPA.

### 3.2. Métodos químicos de síntesis de L-tirosina

Los métodos sintéticos de obtención de aminoácidos son más variados tanto por la forma de llevar la reacción como por el tipo de materia prima. En la actualidad, la L-tirosina no se obtiene industrialmente por síntesis química (60), aunque se conocen algunos métodos (Cuadro 3.2). Casi todos estos métodos se han desarrollado en condiciones de laboratorio. La mayoría son de etapas múltiples que incluyen síntesis y purificación de productos intermedios (60). Los sustratos iniciales son poco accesibles y de un alto costo y el rendimiento del producto final de D,L-tirosina solamente en algunos casos alcanza de 60 - 65%. Las desventajas de la síntesis química para la obtención de aminoácidos consisten en la necesidad de separar los racematos y la racemización de los D-isómeros (78). Los isómeros ópticos de tirosina se separan por método químico y enzimático. En el caso de la separación enzimática de la D,L-tirosina con carboxipeptidasa pancreática, el rendimiento total de L-tirosina alcanza 30% y de D-tirosina 24%. Un buen catalizador de racematos de aminoácidos aromáticos es la  $\alpha$ -quimiotripsina que tiene una alta estereospecificidad. Una limitante para su empleo industrial es la utilización de materia prima de origen animal cuyo costo es elevado, y no se ha encontrado una enzima similar de origen microbiano (60). El empleo de enzimas inmovilizadas en calidad de biocatalizadores de dichos procesos, constituye el método más prospectivo. El primer proceso industrial de este tipo se realizó basándose en aminoacilasa inmovilizada por Tanabe/Japón, que produce 20 Tn. de aminoácidos al mes. Este proceso es considerado

como la primer síntesis química asimétrica de aminoácidos que se realiza industrialmente.

CUADRO 3.2.Comparación de los métodos químicos de obtención de L-tirosina (54).			
Método de obtención	Sustratos iniciales	Sustratos complementarios	Rendimiento total D,L-tir (%)
<u>A partir de eter-acetil aminomalónico</u>	Eter acetil-aminomalónico, cloruro de N-metoxibenzil.	$C_2H_5ONa$ , $HCl$ .	48
<u>Síntesis a través de oximinoácidos</u>	Eter etílico del ácido acetacético y cloruro de N-metoxibenzil	$C_2H_5ONa$ , $C_4H_9ONa$ , $H_2SO_4$ , $H$ , $NaOH$ , Ni ren	63
	Acetona, N-metoxibenzaldehído.	$C_2H_5ONa$ , $NaOBr$ .	
<u>Condensación de aldehídos con sustancias que tienen un grupo metilénico activo.</u>	N-hidroxibenzaldehído, ácido hipúrico	$(CH_3CO)_2O$ , $CH_3CONa$ , P --	60
	N-metoxibenzaldehído, - idantoína.	"	65
	N-hidroxibenzaldehído, - idantoína.	Morfolina, $H_2$ , Ni ren. $NaOH$	63
	N-metoxibenzaldehído, - dicetopiperacina.	$(CH_3CO)_2O$ , $CH_3CONa$ , $HI$ , P rojo	48
	N-metoxibenzaldehído, - aldehído de glicil-D-fenilpropiónico.	"	35 (forma L)

### 3.3.Obtención de Tirosina por fermentación.

La industria comercial de la fermentación en la actualidad en países orientales como China produce además de los productos alimenticios fermentados ancestrales, alcoholes, levaduras, antibióticos, vitaminas, enzimas, células inmovilizadas con alguna actividad enzimática específica, esteroides, ácidos orgánicos, ácidos nucleicos, aminoácidos y sus productos relacionados. Esta industria juega un papel importante en la economía de los países implicados (20).

Durante el cultivo de algunos microorganismos en el líquido de cultivo se encuentran aminoácidos que son considerados productos del metabolismo. En Japón se seleccionaron seis cepas de bacterias pertenecientes a los géneros Vibrio y Pseudomonas. Durante su fermentación en medios con tirosina se acumula L-DOPA, los mejores rendimientos de L-DOPA se obtienen bajo adición periódica de tirosina : 6.5 g/lt. en el caso de Pseudomonas melanógenes y 3.4 g/lt en el caso de Vibrio tyrosinaticus.

Debido a que la síntesis de aminoácidos por microorganismos se encuentra bajo un estricto control metabólico de la célula bajo una restricción del metabolismo del mismo aminoácido que se sintetiza (60), lo más importante lo constituye la elección de mutantes auxótrofos y reguladores. En los mutantes auxótrofos puede existir una u otra enzima. La producción de aminoácidos ocurre en la etapa interrumpida o en el proceso enzimático va por una ruta diferente con formación de otro producto (23). La sobreproducción de aminoácidos es una propiedad de microorganismos resistentes al aminoácido específico que

sobreproducen. Estos microorganismos son heterotróficos y la producción de los metabolitos se apoya por la suplementación de fuentes de carbono con el medio. Las mutantes seleccionadas para la resistencia a un análogo de un aminoácido frecuentemente son también resistentes a otros aminoácidos, aún cuando no compartieran la misma ruta biosintética. Alternativamente la célula resistente puede degradar el análogo o puede alterar la regulación de la ruta guiando a la biosíntesis del aminoácido. En el último caso, resulta una sobreproducción del aminoácido en la célula, y a veces, su excreción al medio (85).

Uno de los mecanismos más comunes de la aparición de la resistencia es que también las mutaciones en el sistema regulatorio de biosíntesis de aminoácidos. Algunas mutantes regulatorias crean la resistencia a análogos por la sobreproducción de los aminoácidos. El efecto de este tipo de mutación es el doble. El alto contenido de aminoácidos en la célula resulta en una reducción de la ingesta del aminoácido y su análogo en el medio. La entrada del análogo a la célula es además diluido por el exceso del aminoácido intracelular (85).

La ruta biosintética de L-tirosina no es la misma en géneros como Pseudomonas, Xantomonas o Alcaligenes (118). Las cianobacterias son el primer grupo de microorganismos que muestran la dependencia de una diferente secuencia que utilizan el aerogenato como precursor. La Pseudomonas aeruginosa tiene la misma ruta de síntesis de tirosina. La presencia de la misma secuencia de enzimas de esta ruta se han propuesto como una explicación de la incapacidad de aislar bloques de autótrofos

de tirosina en este microorganismo (14).

El método para obtener L-tirosina es la hidroxilación de fenilalanina, esta conversión es posible por hongos, bacterias, y levaduras. Los microorganismos transformadores activos son : Achromobacter, Alcaligenes, Arthrobacter, Aspergillus, Candida, Escherichia, Flavobacterium, Nocardia, Proteus, Sacharomyces y otros (60,88).

La acumulación de L-tirosina se ha descubierto en medios de crecimiento de mutantes de Escherichia coli, Bacillus subtilis, Corynebacterium glutamicum. También cepas silvestres de células de Hydrogenomonas eutropha H-16 y Microspira tyrosinatica, que se han cultivado en medios con fenilalanina (60).

En las mutantes reguladores, el mecanismo que controla la unión reversible se ha perdido o está expresado muy debilmente. Dichas mutantes llegan a ser casi o totalmente insensibles a la inhibición o represión por el producto final (124). Mutantes de Bravibacterium flavum resistentes a análogos de fenilalanina tienen una sintetasa insensible a retroinhibición y sobreproducen la L-fenilalanina y L-tirosina en relaciones equimolares (101).

Para la producción de aminoácidos junto con mutantes comunes se emplean mutantes poliauxótrofos y auxótrofos-reguladores (Cuadro 3.3).

La ventaja de usar una cepa mutante de Rhodotorula graminis para producir L-fenilalanina se ve justificada por el aumento de la vida media de la enzima, la actividad específica y una mayor estabilidad térmica (76).

Los microorganismos mutantes producen aminoácidos por arriba

del 50% de la concentración inicial de la fuente de carbono. Bajo estas condiciones, la fuente de carbono se asume que se asigna para la producción de biomasa y aminoácidos y solo una pequeñísima parte para otros productos y su mantenimiento. Un alto porcentaje del aminoácido formado se produce en un modelo asociado al no crecimiento, ya que no cambia el patrón de producción de aminoácidos al principio de la fase estacionaria. Esto va de acuerdo con el propósito de la mutación: eliminar el control del microorganismo durante la producción de aminoácidos (77).

CUADRO 3.3. Acumulación de L-tirosina por cepas mutantes de Corynebacterium glutamicum

Tipo de mutante	Rendimiento L-tirosina (%)	Referencia
Auxótrofo	10.4	16
Regulador	1.0	125
Poliauxótrofo	15.1	36
Auxótrofo-regulador	17.6	10

Como fuentes principales de carbono para el cultivo de las bacterias se utilizan glucosa e hidrolizados de almidón que son costosos aún cuando se han usado pretendiendo aprovechar los almidones, desechos de la industria procesadora de papa subutilizados. El enfoque se orienta principalmente a la producción microbiana de L-fenilalanina usando bacterias capaces de degradar almidón pero con un rendimiento de L-tirosina de solo 0.05 %. Por eso se eligieron otras

cepas de microorganismos que utilizan sustancias que contienen carbono a un menor costo. Algunas de ellas se muestran en el Cuadro 3.4.

Las mutantes bacterianas de resistencia a análogos de aminoácidos se han utilizado para la producción de aminoácidos aromáticos a partir de sustratos como glucosa, sucrosa y metanol (101).

CUADRO 3.4 Síntesis microbiológica de L-tirosina bajo cultivo de microorganismos en medios con diferentes fuentes de Carbono. (124,126)		
Microorganismo (cepa mutante)	Fuente de Carbono	Rendimiento de L-tirosina (%)
<u>Corynebacterium glutamicum</u>	glucosa	16.6
<u>Brevibacterium flavum</u>	ácido acético	5.0
<u>Corynebacterium glutamicum</u> KI8769	N-parafinas	12.5
<u>Arthrobacter paraffines</u>	N-parafinas	18.0

En la última década el método de fermentación ha alcanzado amplia aplicación por las ventajas que presenta para la obtención de L-tirosina sobre la reacción química: posibilidad de reconstruir moléculas complejas, realización del proceso en menos etapas; no se requiere equipo costoso, ya que los microorganismos funcionan en medios acuosos a temperaturas y presiones normales (60). Al mismo tiempo dicho método tiene

desventajas: el rendimiento de producto final no es muy alto, el tiempo de cultivo de biomasa es largo, hay un proceso de acumulación del aminoácido, el empleo de materias caras para la preparación de medios, el volumen de energía es alto, y la contaminación de producto final por metabolitos propios de la célula.

### 3.4.Métodos enzimáticos de obtención de L-tirosina

Los métodos más перспекivos de obtención de aminoácidos es la síntesis enzimática. Por fermentación participa una gran parte del complejo enzimático y por el método enzimático solo una parte. Como fuente de la enzima se puede usar: suspensión de en cultivo líquido, filtrado celular libre de caldo (5), células separadas del medio y suspendidas en buffer, células destruidas (por trituración, autólisis, oscilación o ultrasonido) (5), extracto celular, debris celular, enzima cruda (5,65) y muestras altamente puras (por centrifugación, precipitación por salado, precipitación con solventes u otras técnicas) (5) de la enzima en forma libre o inmovilizada (87). El sistema de micelas inversas ha abierto una vía de aplicación técnica de enzimas que catalizan reacciones cuyos productos son inestables en agua, pero que pueden estabilizarse en medio orgánico (11).

Las enzimas son de origen protéico, ya sea simples (globulares) o conjugada, muy especializadas y elaboradas por las células mediante metabolismo propio (3,41,62). La especificidad con la que catalizan su propia reacción química es debida al

reconocimiento que hacen del sustrato en particular al que convierten en producto de reacción (121); solo aceleran la velocidad de aquellas reacciones que termodinámicamente sean posibles (3). Las enzimas superan notablemente a los catalizadores confeccionados por el hombre en su especificidad reactiva, su eficiencia catalítica y su capacidad de activación en condiciones suaves de temperatura y concentración de iones hidrógeno. Es importante mencionar que las reacciones catalizadas enzimáticamente tienen lugar con un rendimiento de 100% y no hay subproductos (62).

Las enzimas pueden provenir de varias fuentes, incluyendo bacterias, hongos, plantas y animales (2,9,17). Se deben considerar varios aspectos para seleccionar la fuente de obtención de la enzima a utilizar:

\*La cantidad de enzima presente en la especie elegida.

\*En que fase de crecimiento de la fuente de enzima se encuentra la mayor cantidad de ésta.

\*Cual es el medio adecuado para obtener la actividad enzimática (121).

Se ha demostrado que las enzimas provenientes de células y tejidos comparadas con catalizadores químicos, son efectivas en tanto como cien millones de veces (121).

Mediante el uso de sistemas biológicos completos como biocatalizadores en la síntesis enzimática de aminoácidos, en el desarrollo o crecimiento del microorganismo utilizado el medio debe aportar suficiente nitrógeno y carbono; también pueden ser utilizados intermediarios más complejos que pueden formar parte de la vía biosintética del mismo aminoácido (3).

Durante la fase de formación del producto puede intervenir gran número de factores que afectan el rendimiento, por lo que el medio de cultivo debe contener factores óptimos par el crecimiento del microorganismo (65).

Es importante, sin embargo, tomar en cuenta al utilizar microorganismos en la producción de aminoácidos, varios aspectos. Primeramente, la selección del microorganismo adecuado para el proceso. En este renglón es en donde se tiene el mayor impacto de los avances recientes de la Biotecnología. Consideremos las características deseables del microorganismo: no debe ser patógeno, no producir micotoxinas u otros tóxicos (63,64); la enzima debe producirse con un alto rendimiento; el costo de producción debe ser razonable y la biosíntesis debe ser controlable (74).

Muchas cepas de microorganismos que pertenecen a los géneros Citrobacter, Proteus, Aerobacter, Erwinia, Escherichia, Pseudomonas y Paracolobacterium que se cultivan en medios con tirosina poseen actividad TFL y pueden catalizar la síntesis de L-tirosina y L-DOPA (61,78,82,83,89) . Al utilizar células nativas disminuye la necesidad del cofactor PLP de la TFL (60). Se han estudiado cepas de los géneros Erwinia, Escherichia, Proteus, Pseudomonas y Xantomonas a fin de aislar cepas con una alta actividad TFL. Tres cepas de Escherichia que tenían 30 años de haber sido aisladas por el Método de Omeliansky en un medio con ácido fórmico-calcio y peptona se denominaron Bacterium formicum y actualmente se clasifican como Citrobacter freundii son anaerobias facultativas que utilizan ácido fórmico. Por el Método de Omeliansky también se aislaron cepas

a partir de estiércol de caballo y vaca, limo de ríos, tierras agrícolas de siembra de hortalizas y abono orgánico. Solo seis cepas aisladas de esta última fuente y solo una presentó alta actividad TFL una cepa de Citrobacter freundii que se reporta como la cepa más activa y que además puede utilizar otras fuentes de carbono (60).

Como sustrato de la síntesis en la reacción de  $\beta$ -sustitución están: cisteína, cistina, serina, alanina, S-alquil-cisteína, S(o-nitrofenil)L-cisteína, fenol y derivados (pirocatecol, resorcina)(34). La TFL cataliza también la síntesis de L-tirosina y L-DOPA, a partir de piruvato de sodio, amoníaco, fenol o pirocatecol; en vez de piruvato de sodio como sustrato, se puede usar ácido oxalacético, málico, fumárico, maléico, glioxílico, láctico y sus sales o éteres. En la síntesis de L-DOPA, a la mezcla reaccionante se deben agregar sustancias reductoras: sulfitos, tiosulfitos, tiosulfatos, ácido ascórbico, cisteína,  $\beta$ -mercaptoetanol y sustancias que forman complejos: EDTA (ácido etilendiamino tetracético), dietilamina, trietanolamina, N-dioxiethylglicina, ácido cítrico, aspártico y otros.

Debido a que el fenol, pirocatecol y piruvato de sodio inhiben la actividad TFL del catalizador, los mejores rendimientos de L-tirosina y L-DOPA se han logrado por adiciones periódicas de sustratos (61,87), sobre todo el fenol por su toxicidad (60). Se recomienda idealmente se mantenga la concentración de fenol constante (59,61) (Cuadro 3.5).

CUADRO 3.5 Síntesis enzimática de L-tirosina, empleando como fuente de enzima diferentes microorganismos.

Fuente de enzima	Sustrato	Continuidad en la síntesis (hrs.)	Rendimiento (g/lt.)	Ref
<u>Erwinia herbicola</u> ATCC 21434, células separadas de medio	D,L-serina, fenol, NH <sub>4</sub> Cl	10	43-53.5	95, 82
	Fenol, acetato de amonio, piruvato de sodio	10	58-60.5	73 114
<u>Citrobacter freundii</u> ATCC 6750 líquido de cultivo.	Fenol, acetato de amonio, ácido pirúvico.	42	52	7
	Fenol, acetato de amonio, ácido oxálico.	42	52	7
<u>Citrobacter freundii</u> ATCC 6750 células separadas del medio.	Fenol + acetato de amonio +			
	ácido -- oxálico.	20	10.8	7
	ácido -- málico.	20	7.8	7
	ácido -- fumárico.	3	7.8	7
	ácido -- glioxílico.	3	4.5	7
	ácido -- láctico.	3	6.2	7
<u>Citrobacter freundii</u> ATCC 6750 enzima purificada	Fenol, piruvato de sodio, acetato de amonio, sulfato de amonio, PLP (cofactor).	20	16.0	7

<u>Erwinia</u> <u>herbicola</u> ATCC 21433 células separadas del del medio	Piruvato, fenol, ace- tato de amonio.	20	80	84
	Ac.oxal- acético, - acetato de amonio, - fenol.	20	70	84
	Ac.pirúvi- co, sulfato de amonio, fenol, ace- tato de -- amonio.	24	70	84
	Ac.pirúvi- vico, fenol.	24	90	84
	Piruvato de potasio, fenol, ace- tato de - amonio.	24	90	84
	Piruvato de potasio, fenol.	24	-	84
<u>Erwinia</u> <u>herbicola</u> suspensión de células.	Ac.oxál- acético, acetato de amonio.	24	-	84
	Ac.oxal-- acético, fenol, ace- tato de -- amonio.	24	90	84
	Piruvato de sodio, fe-- nol, ace-- tato de -- amonio.	24	130	84
<u>Citrobacter</u> <u>freundii</u> ATCC 6750 enzima aislada.	Piruvato de sodio, fenol, ace- tato de -- amonio, PLP.	20	160	84

<u>Citrobacter freundii</u> ATCC 6750 caldo de cultivo.	Fenol, - piruvato de potasio acetato de amonio.	42	180	84
	Ac.oxal-- acético, acetato de amonio.	42	420	84
	Fenol, ac. oxalacéti- co, aceta- to de amo- nio.	42	180	84

Se probó sustituir el piruvato de potasio por el ácido oxalacético como sustrato en la reacción de síntesis de L-tirosina por acción de la enzima TFL de varias fuentes. Los otros sustratos participantes fueron fenol y acetato de amonio, los resultados se muestran en el Cuadro 3.6, de los cuales se concluye que bajo estas condiciones Erwinia herbicola resulta ser la mejor cepa para producir L-tirosina (74).

CUADRO 3.6 Producción enzimática de L-tirosina por varias fuentes. (74)		
Fuente de enzima	Producción de L-tirosina (g/lt)	
	Piruvato de sodio	Ac. oxalacético
<u>Erwinia herbicola</u> ATCC 21433	120	100
<u>Citrobacter freundii</u> ATCC 6750	90	80
<u>Escherichia coli</u> ATCC 3655	80	-
<u>Citrobacter freundii</u>	50	40
<u>Proteus morgani</u> 110 3848	50	-
<u>Pseudomonas perlutida</u> ATCC 490	30	50
<u>Aerobacter aerogenes</u> ATCC 7256	30	50
<u>Salmonella gallinarum</u> ATCC 9148	50	50
<u>Paracolobacterium</u> <u>coliforme</u> ATCC 11605	40	40
<u>Xantomonas campestris</u> ATCC 7381	40	30
<u>Alcaligenes faecalis</u> ATCC 8515	30	30

Se han hecho ensayos sobre la síntesis de L-tirosina usando como sustratos fenol, acetato de amonio, sustituyendo al ácido pirúvico por otros ácidos y probando como fuente de enzima TFL varias cepas de bacterias. Erwinia herbicola produjo la mayor cantidad de tirosina con ácido oxálico (Cuadro 3.7) (74). Al cambiar el ácido pirúvico por serina, ésta no fué mejor sustrato en la reacción de síntesis de L-tirosina (60).

CUADRO 3.7. Síntesis de L-tirosina a partir de ácidos orgánicos (74).		
Fuente de enzima	Sustituto del ácido pirúvico	Rendimiento (g/lt/hr)
<u>Erwinia herbicola</u> ATCC 21433	Ac. oxálico	7.5
	Ac. láctico	4.75
<u>Citrobacter freundii</u> ATCC 6750	Ac. glioxílico	2.4
	Ac. oxálico	5.4
	Ac. málico	3.9
	Ac. maleicoxímico	3.4
<u>Citrobacter freundii</u> ATCC 8090	Ac. oxálico	5.1
	Ac. láctico	4.1
<u>Salmonella gallinarum</u> ATCC 9148	Ac. málico	4.4
	Ac. fumárico	2.6
	Ac. láctico	3.55
	Ac. maleicoxímico	3.85
<u>Proteus mirabilis</u> ATCC 15290	Ac. málico	4.0
	Ac. glioxílico	2.5
	Ac. maleicoxímico	3.5
<u>Aeromonas aerogenes</u> ATCC 7256	Ac. fumárico	2.75
	Ac. glioxílico	2.75
<u>Pseudomonas perlutida</u> ATCC 490	Ac. fumárico	2.1

Investigadores japoneses obtuvieron células de Erwinia herbícola inmovilizadas en membranas de colágeno conservando la actividad TFL en un 80% e inmovilizadas en CNBr-sefarosa la actividad se conservó un 50%. Los catalizadores indicados efectúan la síntesis continua de L-tirosina a partir fenol, piruvato de sodio y amonio; y también la síntesis de L-DOPA a partir de pirocatecol, piruvato de sodio y amonio, el proceso

tiene una duración 7-8 días y un rendimiento del 70-80%.

La tirosinasa parcialmente pura se inmovilizó en DEAE-celulosa y se usó como catalizador en la síntesis de L-DOPA a partir de L-tirosina (116). La columna con el catalizador en un día perdió un 75% de actividad pero el empleo de dichos biocatalizadores no estables, no se aconseja para su uso industrial, aunque se pueden usar en la práctica clínica. A bajas concentraciones de tirosina en la sangre, la tirosinasa inmovilizada debe conservar su actividad el tiempo suficiente para prolongar la conversión de L-tirosina en L-DOPA.

En literatura se han descrito dichos métodos de obtención de preparados de L-tirosina utilizando sistemas bienzimáticos, por ejemplo: TFL y tirosinasa, y tirosinasa inmovilizada y asilasa. También se puede obtener L-DOPA por hidroxilación de L-tirosina por acción de la fenoloxidasa, enzima obtenida de la planta Mucuna pruriens (83).

Otro método bienzimático usa la serinohidroxi metiltransferasa de Klebsiella aerogenes y  $\beta$ -tirosinasa de Erwinia herbicola para la síntesis de L-tirosina donde se propone el mecanismo donde primero se degrade serina en piruvato y amonio y la combinación subsecuente de éstos con fenol con un rendimiento de tirosina de 0.36 gr/lt x hr (61). También se han usado las descarboxilasas oxalacéticas de C.freundii y de Micrococcus lysodeikticus que juntas actúan sobre los sustratos: ácido oxalacético, fenol, acetato de amonio, sulfato de amonio y PLP, para obtener 120 g/lt. de tirosina; y las enzimas descarboxilasa oxalacética y tirosin fenoliasa de Citrobacter freundii que actúan juntas sobre los mismos sustratos en la

reacción de síntesis de L-tirosina con un rendimiento de 140 g/lt. de este aminoácido (74).

Basándose en datos de literatura se concluye que la síntesis enzimática de L-tirosina usando como catalizador la TFL surge en una sola etapa, en condiciones no drásticas, un alto rendimiento del producto final, se requiere equipo sencillo y se efectúa a partir de sustancias producidas por la industria química: fenol, piruvato de sodio y sales de amonio. Además, las reacciones enzimáticas son esteroespecíficas y conducen a la formación de un solo enantiómero, generalmente el natural (L-), fisiológicamente activo, con un alto rendimiento para sustancias potencialmente comerciales (23,116). Algunos ejemplos de aminoácidos obtenidos por el método enzimático son: L-lisina por acción de la pipercoloxidasa de Rhodotorula glutinis (51), L-fenilalanina por transaminación usando células de Pseudomonas putida (128) y por actividad de la fenilalaninamoniocoliasa de Rhodotorula glutinis (71), L-alanina producida utilizando Pseudomonas con actividad ácido aspártico descarboxilasa, L-metionina por Aspergillus, L-triptofano por reacción inversa de la triptofanasa usando como sustrato: indol, ácido pirúvico y amoníaco, ácido L-aspártico con E.coli con actividad aspartatoamoniocoliasa (34,58,97,129). En la inversión de D-L-aminácidos son muy utilizadas las enzimas aminoliasas provenientes también de varias especies de microorganismos (120).

El estudio de la literatura muestra que actualmente la síntesis enzimática es uno de los métodos más perspectivas para obtener aminoácidos.

## PARTE EXPERIMENTAL

### CAPITULO IV. MATERIALES Y METODOS DE INVESTIGACION.

#### 4.1. Materiales y reactivos utilizados.

Los reactivos empleados en el desarrollo de este trabajo de tesis se aplicaron en las diferentes etapas de nuestras investigaciones, las cuales se dividieron en cuatro, que son: etapa microbiológica, etapa de valoración de proteína, etapa del estudio cinético y etapa de identificación del producto de reacción.

En la primera etapa se empleo, agar bacteriológico, agar nutritivo y extracto de levadura, marca Bioxon de origen nacional, medio TSI, medio MIO, marca DIBCO de origen nacional; piridoxina, peptona de caseína y caldo nutritivo marca Merck, de importación. Se utilizó Caldo de Hottinger preparado en el Departamento de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila, basándose en el método de preparación que menciona Binger (8). Para la valoración de la proteína celular en todos y cada uno de nuestros experimentos, se usaron los siguientes reactivos: reactivo de Folin, tartrato de sodio y potasio, sulfato de cobre, carbonato de sodio, hidróxido de sodio y dodecilsulfato de sodio, marca CTR de origen nacional.

En el estudio de las cinéticas los reactivos usados fueron: acetato de amonio, fenol, marca CTR de origen nacional y el piruvato de sodio marca Sigma de importación. Para el seguimiento de la cinética en la región ultravioleta se utilizó el espectrofotómetro Beckman DU-50. En la identificación del producto de nuestra reacción se valoró mediante el reactivo de

ninhidrina, de origen nacional y también se identificó por cromatografía en capa fina con silica gel.

#### 4.2. Fuente de la enzima.

La cepa de Citrobacter intermedius hiperproductora de la enzima tirosinfenoliase (TFL), fueron proporcionadas por el Depto. de Ciencia y Biotecnología de Enzimas, forma parte de la colección microorganismos y cuyo registro se encuentra en trámite.

#### 4.3. Etapa microbiológica

Las bacterias de C.intermedius fueron cultivadas en medio sólido para su conservación y propagación el medio se compone de cloruro de potasio, cloruro de sodio, peptona de caseína, extracto de levadura, L-tirosina y agar bacteriológico. Ya que no se conocían algunos datos de esta cepa, se procedió a realizar una serie de pruebas para confirmar su género y especie. Las pruebas consistieron en sembrar las células por estría en placas de agar nutritivo y registrar la morfología colonial que desarrollaban. Tinción con coloración Gram y serie de pruebas bioquímicas (81).

Se hizo el análisis del desarrollo de células de Citrobacter intermedius en dos medios de cultivo líquidos diferentes (Medio I: caldo de Hottinger y Medio II: caldo nutritivo) mediante curva de crecimiento bacteriano siguiendo para este fin dos metodologías, turbidimetría y conteo de colonias en placa. La preparación del Caldo de Hottinger se realizó de la siguiente manera (8). Carne de pulpa de res se limpió de grasa y tendones, se cortó en trozos de aproximadamente 1-2 cm., colocándose a ebullición durante 15-20 min., utilizando una

relación carne:agua (1:2). Una vez hervida la carne se picó. El caldo, una vez frío se ajustó a un pH=8.0, agregándose después la carne picada y llevándose a una temperatura de 40°C. Mientras se preparó el páncreas de res, libre de grasa y tejidos de unión, obteniéndose solo la parte interna, se picó dos veces y una vez picado se agregó al caldo que contenía la carne picada. La proporción de páncreas en el caldo fué del 10%. Se mezcló perfectamente y se ajustó el pH de la mezcla a 7.8-8.0. Se repitió el ajuste de pH 30 min. después, debiéndose presentar una reacción de oxidación. Una vez reestablecido el pH, la mezcla se pasó a frascos con tapón de resina compacto, de tal manera que una tercera parte del volumen total del frasco quedara libre; después se les añadió una proporción de 1-3% de cloroformo, se cerraron perfectamente y se agitaron algunas veces, procurando que el cloroformo se entremezclara del fondo a la tapa y viceversa. Al minuto, se destaparon los frascos para liberar los vapores de cloroformo. Después de 1-2 hrs. se revisó la reacción y se reestableció el pH a 7.4-7.6. Se dejó la mezcla en digestión de 7-16 días a temperatura ambiente. Los primeros 3-4 días de digestión, se revisó y corrigió diariamente el pH, además de agitar los frascos por lo menos tres veces al día. Uno o dos días antes de finalizar la reacción, ya no se agitaron los frascos. Se supo que la reacción terminó por lo siguiente: en el fondo de los frascos se depositó un precipitado en forma de polvo, el líquido sobrenadante se aclaró y adquirió una coloración amarillo-paja, la mezcla se filtró con facilidad y la reacción del triptofano con agua bromada fué positiva. Esta reacción se realizó como

sigue; en un tubo de ensaye se agregaron 3-4 ml. del caldo filtrado, se añadió un poco de triptofano y 3-4 gotas de agua bromada preparada al 3.0-3.5%. La reacción fué positiva ya que la solución tomó una coloración rosa-violeta. Como control se usó un tubo que contenía agua con triptofano pero sin agregar agua bromada. Una vez finalizada la digestión del caldo, este se filtró a través de papel filtro, el caldo filtrado se esterilizó 30 min./1 atm. y se separó el precipitado formado por centrifugación, se vació el caldo en botellas de vidrio, se esterilizaron nuevamente y se guardaron en refrigeración hasta su uso. Cada vez que se usó el caldo de Hottinger se filtró y esterilizó (se usó diluyendolo en un volumen de agua destilada igual).

Para el estudio de la influencia del tiempo de incubación de las células de Citrobacter intermedius se cultivaron en medio líquido contenido en matraces E.M de un litro (92,93), se incubaron a una temperatura de 30-32°C y bajo agitación constante de 100 - 110 rpm. durante diferentes tiempos de incubación que fueron 6,10,11,12,13,14,15,16,18,20 y 24 hrs. Para la obtención de biomasa, las bacterias desarrolladas en el medio líquido se separaron por centrifugación refrigerada a 10,000 g. durante 30 min., el precipitado celular se lavó dos veces y suspendió en buffer de fosfatos 0.1M a pH de 8.5. Esta suspensión celular se usó como biocatalizador en la reacción de síntesis de L-tirosina determinandose la actividad enzimática de cada partida celular obtenida a los diferentes tiempos de incubación probados.

#### 4.4. Determinación de la actividad tirosinfenoliasa (TFL).

La actividad enzimática de las células de Citrobacter intermedius se evaluó por el consumo de uno de los sustratos, el fenol, de acuerdo a la parte lineal de la gráfica de la concentración de fenol en función del tiempo y la técnica del seguimiento de la reacción fué de acuerdo al método descrito en la literatura (87).

#### 4.5. Determinación de proteína.

La concentración de proteína celular se evaluó por la técnica de Peterson modificado que menciona Gorina (42), la cual fué necesario conocer para determinar la actividad enzimática del biocatalizador obtenido y la cantidad de proteína celular que se puede obtener en función de las diferentes partidas de células.

#### 4.6. Estudio cinético de la síntesis enzimática de L-tirosina a partir de fenol, acetato de amonio y piruvato de sodio.

Para el estudio cinético de la síntesis enzimática de la L-tirosina, fué necesario desarrollar un método rápido y sencillo para la determinación del producto o cualquiera de los sustratos que participan en la reacción. El sistema estudiado tiene una serie de particularidades. El estado de equilibrio del proceso de síntesis en condiciones óptimas se establece durante una hora y media. Para medir la velocidad de síntesis de L-tirosina y la velocidad de consumo de los sustratos, las alícuotas de los reactores batch se tomaron cada 15 min., iniciando en el tiempo cero. Otra particularidad de este

sistema es su heterogeneidad. Para la determinación de la concentración de los sustratos o producto de la reacción estudiada fué necesario separar las células y el precipitado que es producto de la reacción mediante centrifugación, deteniendo previamente la reacción al tiempo de tomar la alícuota. Por esto se hizo un análisis de los métodos conocidos para la determinación de tirosina, fenol, acetato de amonio y piruvato de sodio con el objetivo de seleccionar un método rápido y exacto para el estudio cinético de la síntesis de L-tirosina a partir de fenol, acetato de amonio y piruvato de sodio catalizado por células de bacterias con actividad TFL.

Uno de los métodos más difundidos para la determinación del producto de la reacción estudiada -tirosina- es mediante el reactivo  $\alpha$ -nitroso- $\beta$ -naftol, pero esta técnica es muy laboriosa. Además la L-tirosina debido a su baja solubilidad 45 mg/100 ml (72), precipita ya en el inicio de la reacción y esto complica la toma exacta de la alícuota en un tiempo de reacción determinado, así, no es muy recomendable valorar la cinética de reacción en función de la formación del producto.

Para la valoración cuantitativa del piruvato que es uno de los sustratos de nuestro sistema reaccionante, con frecuencia se emplea el método espectrofotométrico fundamentado en la interacción del piruvato con el reactivo 2,4-dinitrofenilhidrazina. Este método es sencillo y cómodo pero para el estudio de esta reacción no es muy recomendable. Además el piruvato es un metabolito activo porque es sustrato de otras reacciones enzimáticas de la célula (26), así como también participa en reacciones no enzimáticas. Por eso la velocidad

de acumulación de tirosina de acuerdo a su magnitud absoluta, se verá disminuido en comparación con la velocidad de consumo de la concentración del piruvato. El tercer sustrato, amonio, de acuerdo a la literatura se puede determinar por el reactivo de Nessler. En la realización de síntesis enzimática de L-tirosina a partir de fenol, amonio y piruvato de sodio en calidad de la fuente de amonio utilizamos el acetato de amonio que al mismo tiempo juega un papel de buffer; en mezcla reaccionante siempre se añadió en exceso, en comparación con los demás sustratos. Esto dificulta detectar exactamente la concentración de este, consumida sobre todo cuando se tiene un gran exceso, por tanto uno de los métodos prospectivos para el estudio de la cinética de las condiciones de síntesis de tirosina en la reacción que es objeto de estudio, fué medir la variación de la concentración de fenol en el sistema reaccionante. Efectuamos un análisis de literatura con el fin de seleccionar un método espectrofotométrico rápido para determinar fenol, descubriendo algunos métodos (52), que se caracterizan por una especificidad satisfactoria. Estos métodos son cómodos para la determinación de concentraciones fenólicas.

La tirosina, el piridoxal fosfato, así como la proteína celular interferían la determinación de fenol por estos métodos. Los investigadores japoneses (33) estudiando la síntesis enzimática de la L-tirosina a partir de fenol, amoníaco y piruvato de sodio, catalizada por células de bacterias, determinaron el fenol como sigue: destilaban a este de la mezcla reaccionante con vapor y en el destilado determinaban su concentración mediante el reactivo 2,4-dicloroquinoclorin. El empleo de este

método laborioso dificultaría el estudio cinético de la síntesis enzimática de L-tirosina; por eso en base a un método rápido y sencillo, determinamos el consumo de fenol espectrofotométricamente. El principio de este método consiste en valorar la densidad óptica de las alícuotas de la mezcla reaccionante en el punto de máxima absorbancia del espectro del fenol en ultravioleta (UV), claro que después de haber separado el precipitado de L-tirosina, los espectros de absorbancia en U.V. se presentan en la Fig.1., donde se aprecia el máximo de absorción a 268 nm, a una concentración de 100 µg/ml a la cual se sigue la ley de Lamber-Beer (112) y el coeficiente de extinción molar definido es de  $1339 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

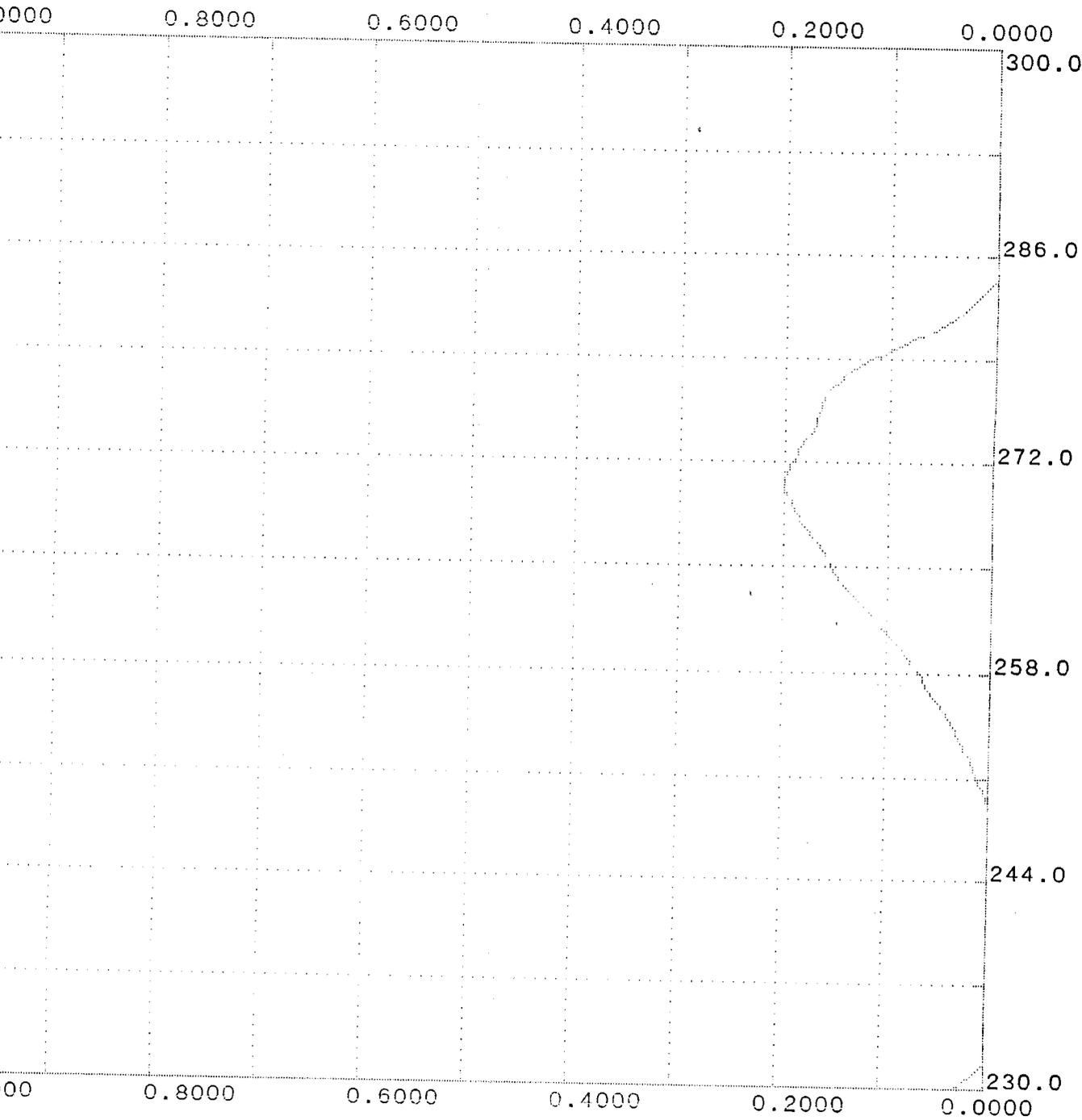
Las lecturas fueron efectuadas en un espectrofotómetro UV-VIS Beckman DU-50. El máximo de absorción de L-tirosina es muy próximo al máximo de absorción del fenol, Fig.2. Estableciéndose entonces que la tirosina era el componente fundamental que interferiría en la determinación del fenol.

Por eso al efectuar la síntesis en las condiciones óptimas después de algunos minutos de inicio de la reacción se tomaban alícuotas y la reacción era detenida por calor y posteriormente centrifugadas para ser separada. Después se tomaba otra alícuota ahora del sobrenadante para definir la concentración del fenol. Además con la dilución de las alícuotas de más de 100 veces, la sensibilidad para detectar tirosina posiblemente soluble en la alícuota tomada disminuía considerablemente del orden de  $10^{-3}$  considerando que el sistema reaccionante está completamente saturado de L-tirosina cosa que nunca sucede en nuestro caso. Bajo el estudio de cada uno de los parámetros del sistema

**FIG.1. Espectro del Fenol (concentración 100  $\mu\text{m}/\text{ml}$ )**

# DU-50 SPECTROPHOTOMETER

ABSORBANCE



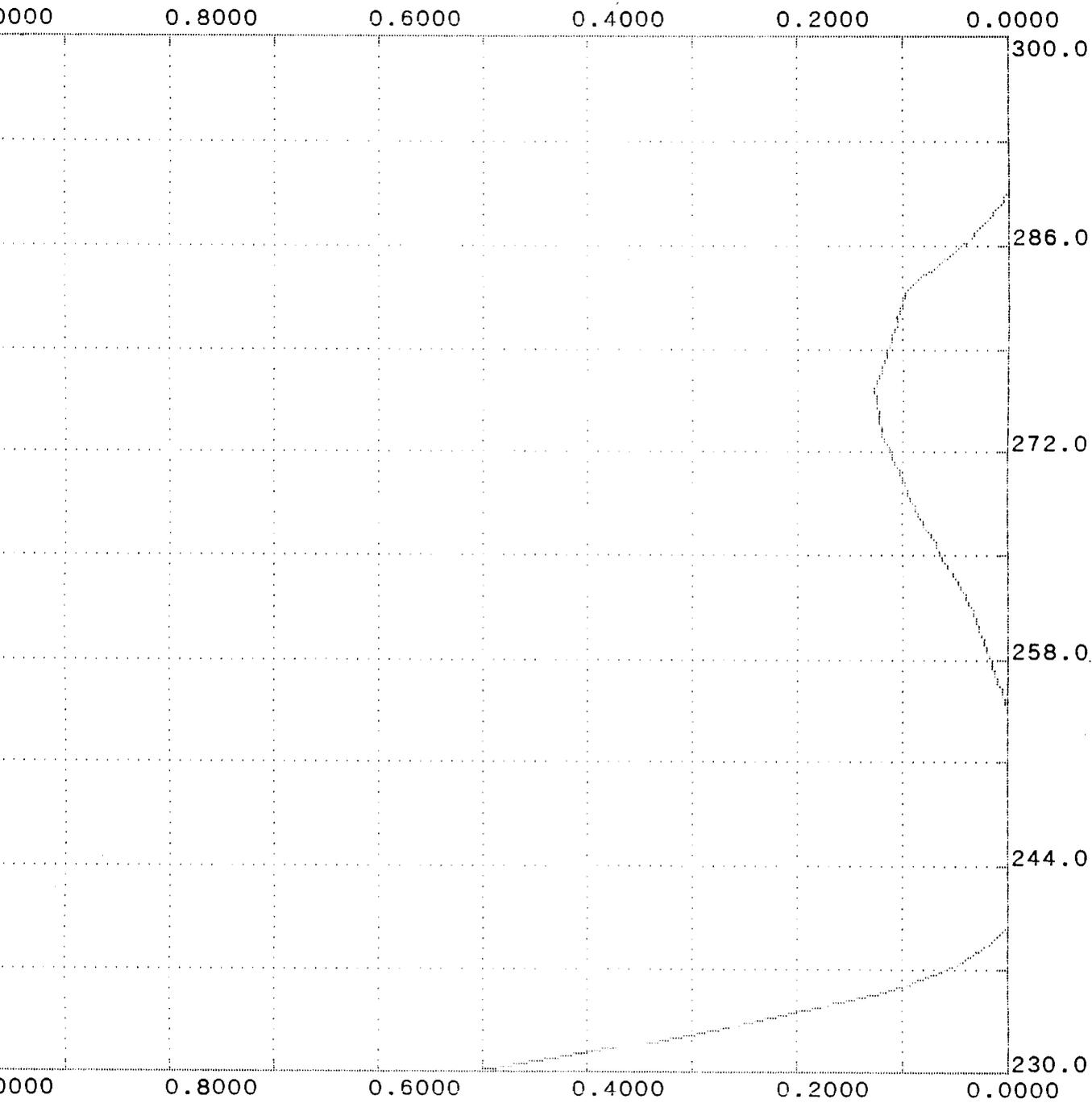
Scan Speed: 750 nm/min

POINT PICK	Abs
260.0	0.091
268.0	0.184
272.0	0.193
280.0	0.088

FIG.2. Espectro de la L-tirosina (concentración 200  $\mu\text{g/ml}$ )

# DU-50 SPECTROPHOTOMETER

ABSORBANCE



Scan Speed: 750 nm/min

PEAK PICK	POINT PICK
λ	λ
Abs	Abs
260.0	0.127
268.0	0.088
272.0	0.112
280.0	0.109

reaccionante se varió en un rango definido, manteniendo constantes el resto de los parámetros.

Los sustratos que participan en la reacción se estudiaron a diferentes concentraciones. El fenol a 0.03, 0.05, 0.08, 0.09, 0.1, 0.2, 0.3, 0.9, 1.0 y 1.5 M; acetato de amonio 0.1, 0.3, 0.4, 0.45, 0.5, 0.6, 0.8, 1.0 y 1.5 M y el piruvato de sodio en 0.05, 0.08, 0.09, 0.12, 0.15 y 0.18 M.

Un factor importante desde el punto de vista fisicoquímico es la temperatura a la cual se lleva a cabo cualquier reacción química, por esto se estudió este parámetro, su influencia sobre la actividad enzimática TFL de las células de Citrobacter intermedius. El rango de temperatura fué de 25 a 45°C. Para mantener la temperatura deseada en el sistema reaccionante se usaron baños de temperatura de recirculación de agua.

Otro parámetro no menos importante y sobre todo para reacciones efectuadas por objetivos biológicos es el pH. Estudiamos la influencia de este dentro de un rango de 6 a 10, con nueve diferentes valores de pH de la mezcla reaccionante, el pH se mantuvo constante al disolver los sustratos en soluciones buffer preparados a los valores pH mencionados.

En lo que respecta a la cantidad de biomasa adicionada al sistema reaccionante, se estudiaron 5 volúmenes diferentes de suspensión celular de Citrobacter intermedius, de 2 a 6 ml., usadas como fuente de enzima en la reacción de síntesis de L-tirosina.

#### 4.7. Influencia de la transferencia de masa sobre la acción cinética de TFL en las células de bacterias

De acuerdo a la revisión bibliográfica (60), consideramos que la enzima TFL se localiza en la membrana citoplasmática de las células de Citrobacter intermedius, suponemos entonces, que la única manera en el proceso de transferencia de masa hacia el interior de la célula lo presenta la pared celular de ésta, tanto para los sustratos como para el producto de la reacción de síntesis de L-tirosina. En el Cap. II de revisión bibliográfica se encontró que existen tres zonas de transferencia de masa de los reactivos y productos de la reacción: primero de la solución externa hacia la superficie de la célula; segundo, a través de la pared de ésta y tercero, en la parte interna de la misma (62,110,112,115). La difusión dentro de la célula se puede menospreciar al compararla con la difusión que se presenta a través de la membrana celular (102). De esta manera sobre la velocidad del proceso que es objeto de estudio catalizado por células de bacterias, influirán la difusión de los reactivos de la solución externa hacia la superficie de la célula y la difusión de éstos a través de la pared celular. Investigamos el papel que juega la difusión externa en la cinética de acción de TFL en las células, al llevar a cabo experimentos en donde el sistema reaccionante se mantenía en agitación constante y teniendo la variante en donde no se agitaba el sistema. Para realizar este tipo de ensayos se contó con agitadores de plataforma donde se colocaban los reactores que contenían la mezcla reaccionante con los sustratos y el biocatalizador bajo condiciones controladas de

pH y temperatura.

#### 4.8. Identificación y determinación de la pureza.

Inicialmente el producto de nuestra reacción se separó de todo el sistema reaccionante mediante acidulación, disolviendo, de esta manera el precipitado de L-tirosina con una solución de ácido clorhídrico 0.5M. Posteriormente por centrifugación se separó la biomasa obteniendo de esta manera una solución transparente a la cual se le agregaron 20 g. de carbón activado por cada tres litros de solución ácida; se sometió a calentamiento durante 30 min. a 70-80°C, se filtró al vacío y el líquido filtrado se refrigeró durante 24 hrs. Después se procedió a precipitar la L-tirosina agregando pequeñas porciones de hidróxido de amonio, agitando. Los cristales se separaron mediante filtración y se lavaron con acetona la cual se evaporó obteniéndose un polvo blanco cristalino. Más adelante se prepararon soluciones de una concentración de 0.01M de L-tirosina grado analítico (g.a), y del polvo blanco cristalino producto de la reacción. Con reactivo de ninhidrina la coloración de ambos casos fué igual. Más adelante haciendo uso de las técnicas cromatográficas de papel filtro y capa fina en silica gel en placas, se prepararon mezclas de disolventes para la fase móvil, butanol:ácido acético:agua, en proporciones (4:1:1). Los corrimientos se revelaron con ninhidrina.

## CAPITULO V. RESULTADOS Y DISCUSION.

### 5.1. Etapa microbiológica.

Para el estudio de crecimiento de bacterias en placa se uso agar nutritivo presentando la siguiente morfología colonial, color blanco-aperlado, tamaño pequeño 2 x 3 mm., borde redondo definido, elevación plana, forma redonda y tono brillante. El frotis teñido con coloración Gram mostró bacilos cortos G(-). Las pruebas bioquímicas resultaron: Citrato de sodio (+); MIO: Movilidad (+), Indol (-), Ornitina (-); SIM: H<sub>2</sub>S (+), Indol (-), Movilidad (+/-); TSI: H<sub>2</sub>S (+), Glucosa (+), Lactosa (+); LIA: Lisina (-); Caldo Urea: Urea (-). Al comparar todos estos resultados con datos de literatura (81) se confirmó el género y especie del microorganismo con el que trabajamos como Citrobacter intermedius.

Se hizo el análisis del desarrollo de células de Citrobacter intermedius en dos medios de cultivo líquidos diferentes (Medio I: caldo de Hottinger y Medio II: caldo nutritivo) mediante curva de crecimiento bacteriano, observandose el mismo comportamiento de crecimiento (Cuadro I). La expresión gráfica de estos datos dieron una curva de crecimiento bacteriano típica (Fig. 3) donde se presentan las diferentes fases de crecimiento de las células de Citrobacter intermedius: la fase logarítmica tiene una duración de cinco horas, la fase estacionaria se presentó a las ocho horas y la fase de muerte celular se apreció a las trece horas de incubación.

CUADRO I.- Crecimiento de células de Citrobacter intermedius presentado en dos diferentes medios de cultivo líquidos

Tiempo (hr.)	Log. No. de células/ml	
	Medio I	Medio II
0	7.01	6.44
1	7.09	6.50
2	7.36	6.68
3	7.21	6.68
4	7.31	7.01
5	8.68	7.40
6	8.86	7.70
7	9.17	8.22
8	9.22	9.25
9	9.29	9.25
10	9.36	9.21
11	9.35	9.15
12	9.28	9.16
13	9.21	9.15
14	9.24	9.04

Al elegir entre los dos medios de cultivo líquidos probados el mejor, se optó por utilizar en este trabajo el medio II, es decir el que contenía: caldo nutritivo, ya que este (que es el componente que difiere del medio I que contiene caldo de Hottinger) está ya estandarizado y además desde el punto de vista técnico resulta más fácil de adquirir y manejar.

En el estudio de la influencia del tiempo de incubación de las células de Citrobacter intermedius desarrolladas en el medio líquido elegido se pudo apreciar que al incubarse durante 12 hrs. a una temperatura de 30-32°C y con agitación constante de 100 - 110 rpm. presentaron la máxima actividad enzimática TFL; por lo que se eligió este tiempo de incubación como óptimo y de acuerdo con la curva de crecimiento bacteriano de esta cepa (Fig.3), a las 12 hrs. de incubación las células se encuentran al final de la fase estacionaria. Los resultados de este estudio se muestran en la Cuadro II, y en la Figura 4.

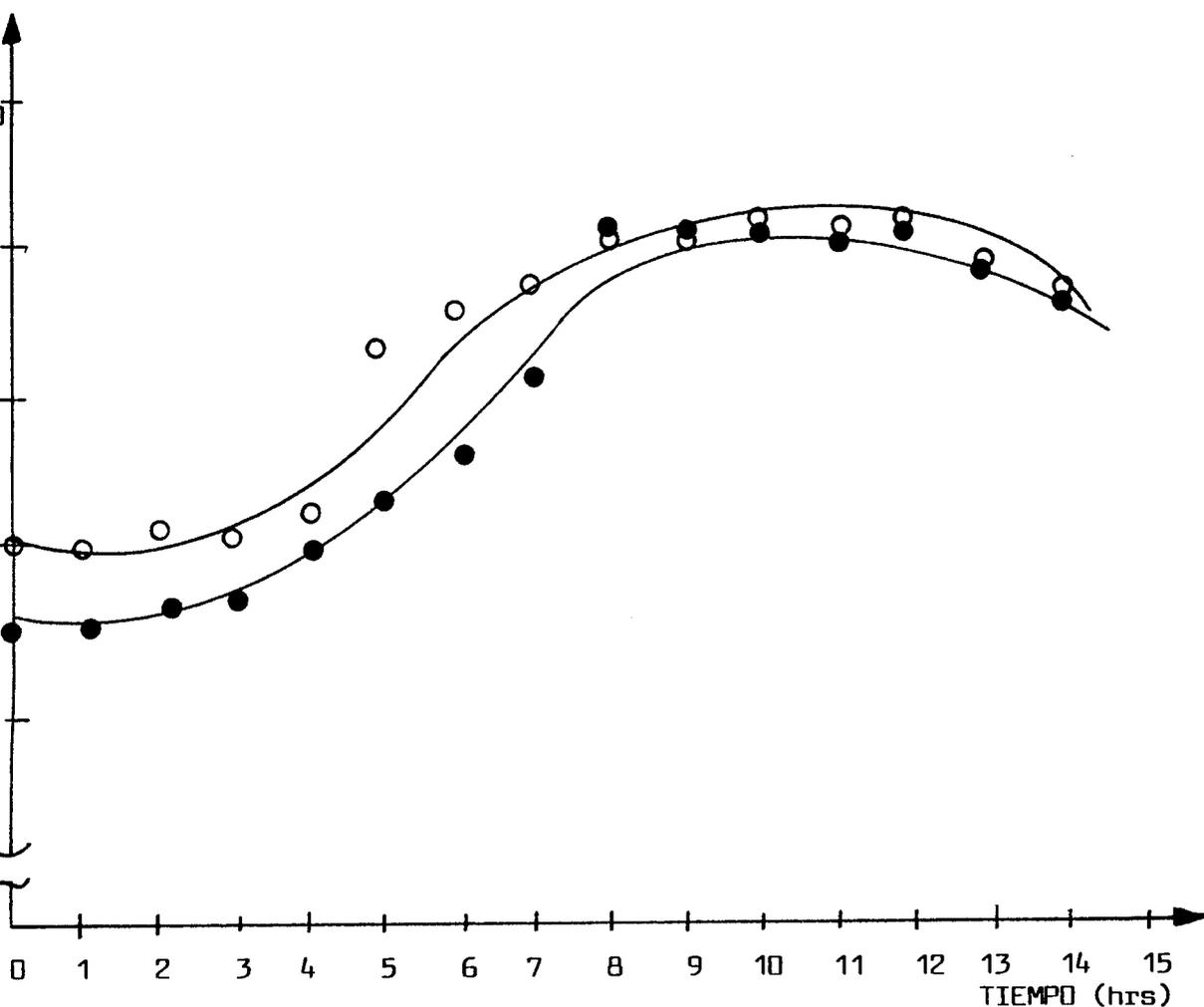


FIG. 3 CURVA DE CRECIMIENTO DE Citrobacter intermedius.  
 (○) MEDIO I: CALDO DE HOTTINGER, PEPTONA DE CASEINA,  
 EXTRACTO DE LEVADURA, L-TIROSINA Y PIRIDOXINA.  
 (●) MEDIO II: CALDO NUTRITIVO, PEPTONA DE CASEINA,  
 EXTRACTO DE LEVADURA, L-TIROSINA Y PIRIDOXINA.

CUADRO II. Influencia del tiempo de incubación de las células de Citrobacter intermedius sobre su actividad enzimática tirosinfenoliasa.

Tiempo de incubación (hrs.)	Actividad enzimática (moles/mg. * min) 6 * 10	Proteína (mg/ml)
6	1.403	1.942
10	3.100	4.077
11	3.765	3.093
12	5.338	3.470
13	5.304	2.886
14	2.880	4.077
15	2.215	2.886
16	1.706	3.470
18	-	4.660
20	-	2.907
24	-	2.620

5.2. Estudio cinético de la síntesis enzimática de L-tirosina a partir de fenol, acetato de amonio y piruvato de sodio.

En base al análisis de los métodos para el seguimiento de la reacción enzimática tanto por consumo de sustratos o formación de producto, se optó por monitorear la reacción por el seguimiento y desarrollo de todos nuestros experimentos fué de acuerdo al consumo de fenol como lo indica la Fig.5.

En la Fig.6 se aprecia claramente que la concentración de L-tirosina formada es directamente proporcional a la concentración de fenol consumida lo cual nos indica que los estudios se llevaron a cabo en la región cinética de nuestro proceso.

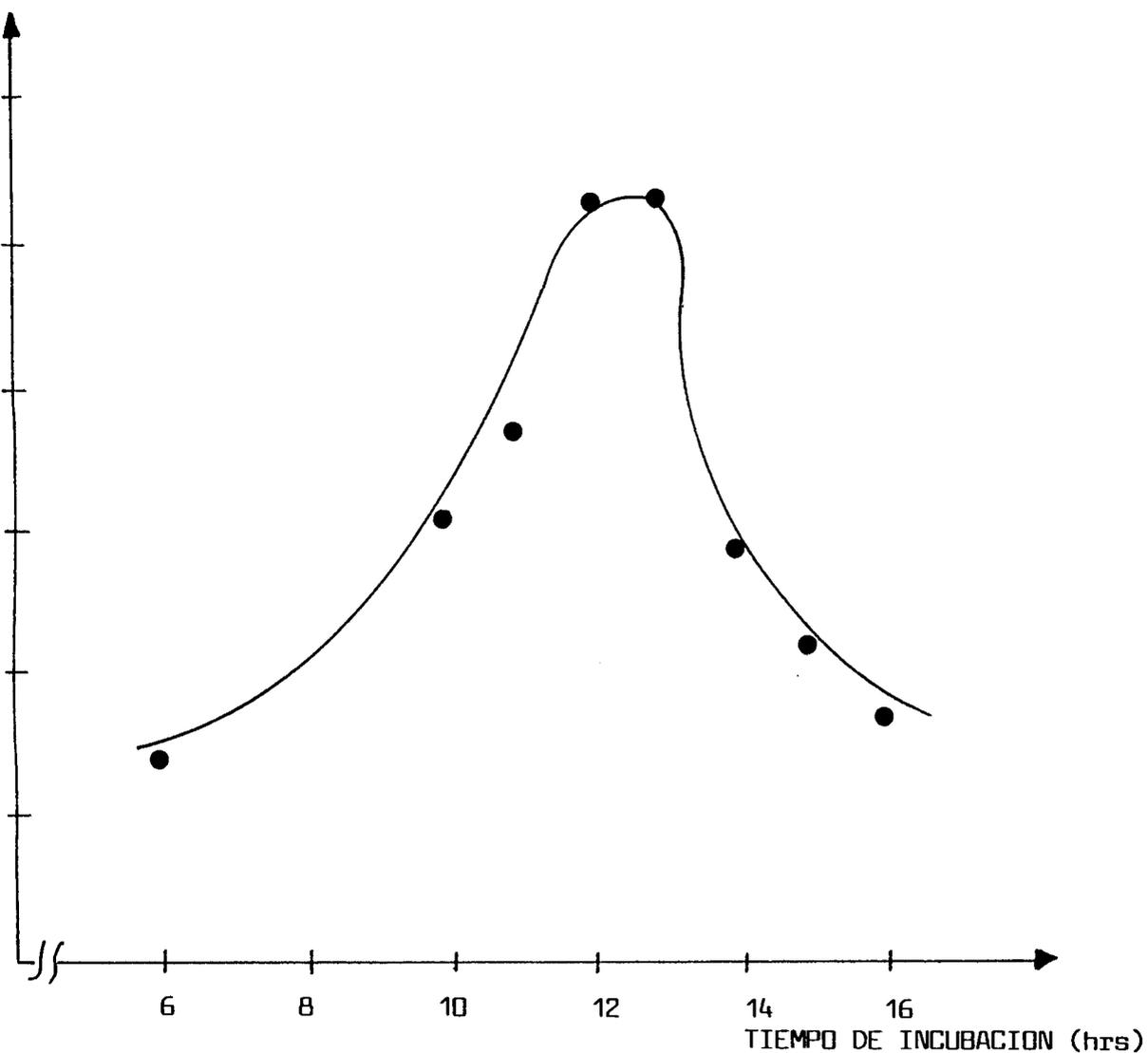


FIG.4 INFLUENCIA DEL TIEMPO DE INCUBACION DE LAS CELULAS DE Citrobacter intermedius, SOBRE LA ACTIVIDAD TFL EN EL PROCESO DE SINTESIS DE L-TIROSINA. CONDICIONES DE REACCION: 3 - 4 mg. PROTEINA/ml. MR., pH 8.0, TEMP. 35 °C, SUSTRATOS: FENOL 0.08M, ACETATO DE AMONIO 0.5M Y PIRUVATO DE SODIO 0.15M.

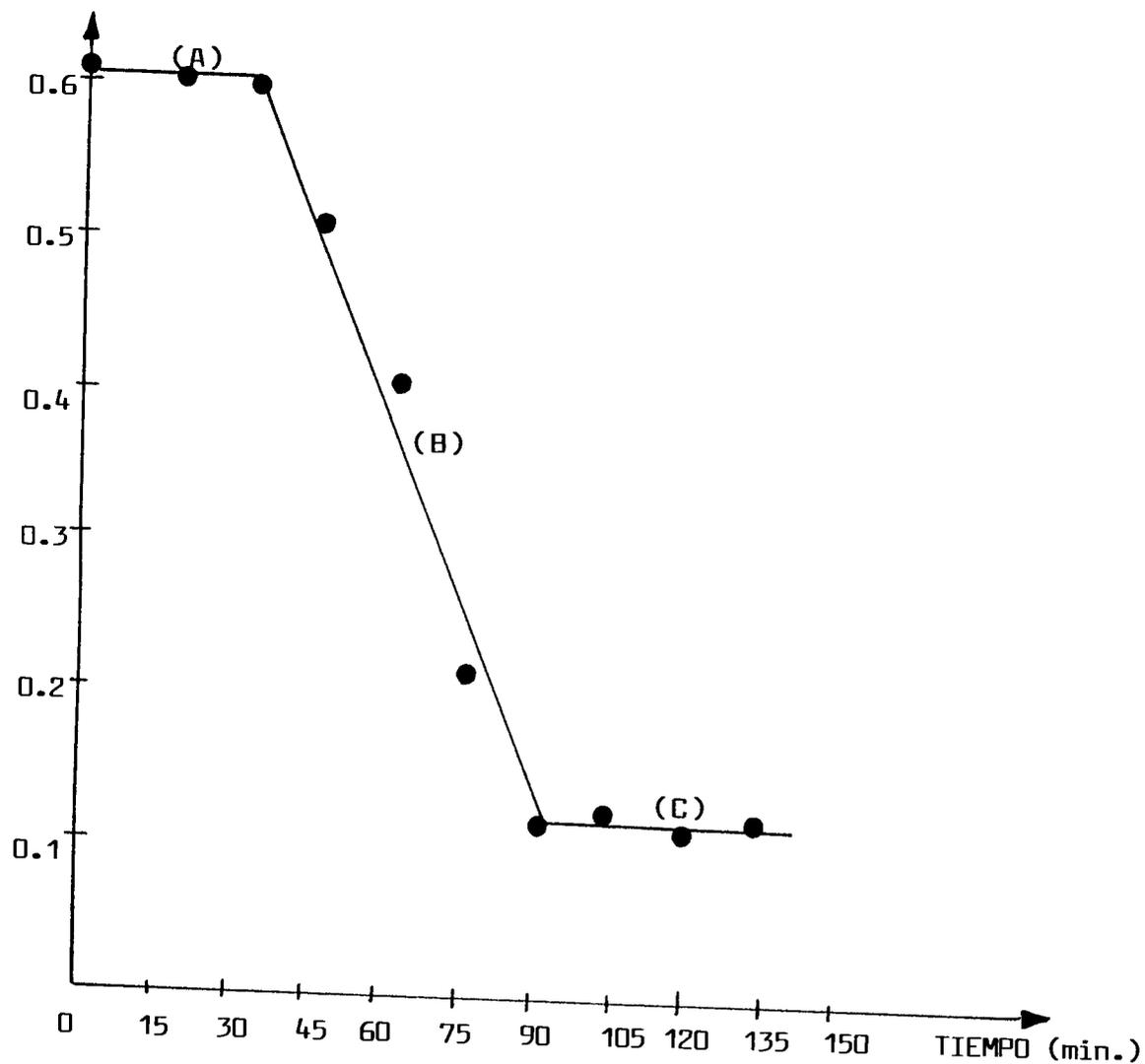


FIG.5 CONSUMO DE FENOL EN FUNCION DEL TIEMPO, POR CELULAS DE Citrobacter intermedius CON ALTA ACTIVIDAD TFL. A) REGION DE DIFUSION, B) REGION CINETICA, C) FIN DE LA REACCION. CONDICIONES DE REACCION: TIEMPO DE INCUBACION 12 HRS., 3 - 4 mg. PROTEINA/ml. MR., pH 8.0, TEMP. 35 °C, SUSTRATOS: FENOL 0.08M, ACETATO DE AMONIO 0.5M Y PIRUVATO DE SODIO 0.15M.

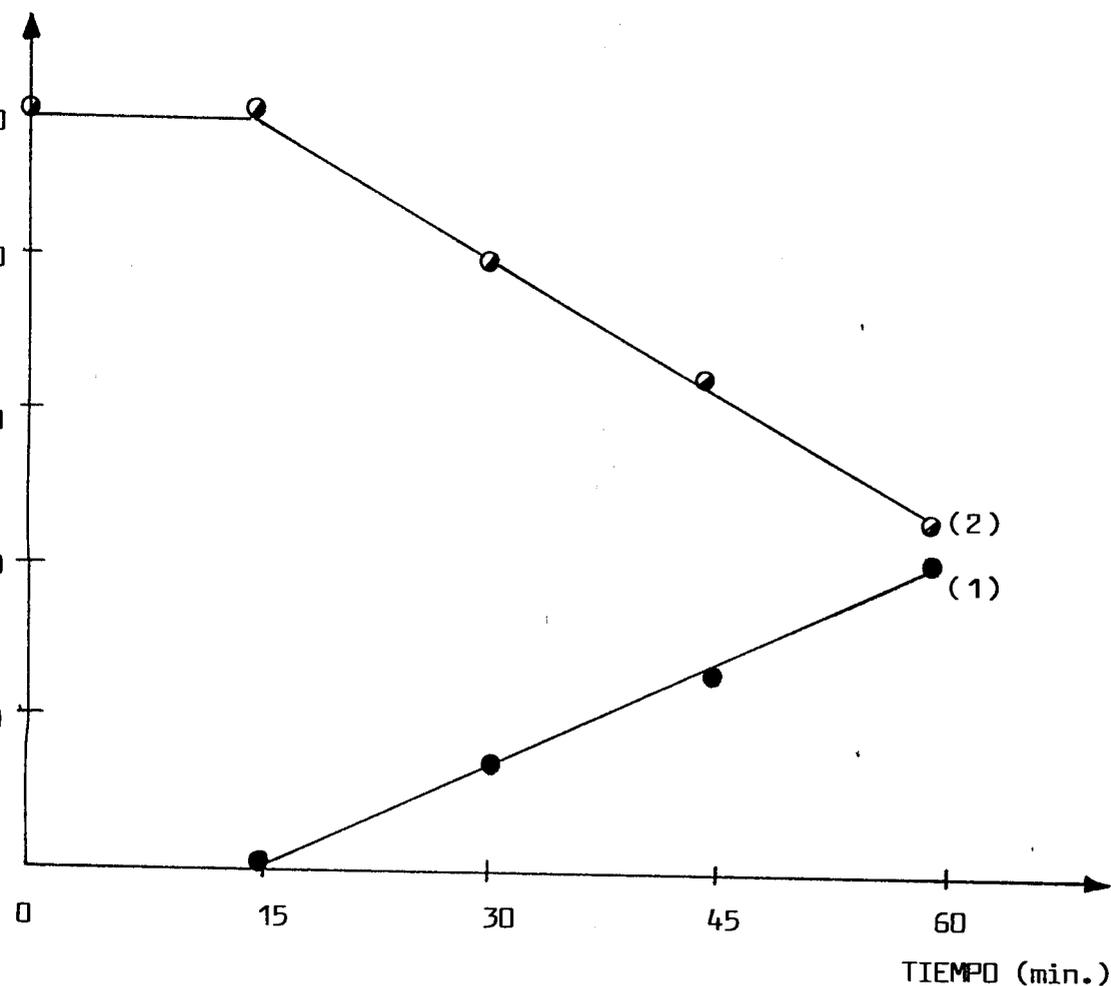


FIG. 6 PORCENTAJE DE FENOL (1) Y TIROSINA (2) EN FUNCION DEL TIEMPO DE REACCION EN LA SINTESIS DE L-TIROSINA CATALIZADA POR CELULAS DE Citrobacter intermedius.  
 CONDICIONES DE REACCION: TIEMPO DE INCUBACION 12 HRS.,  
 3 - 4 mg.PROTEINA/ml.MR., pH 8.0, TEMP. 35 °C,  
 SUSTRATOS: FENOL 0.09M, ACETATO DE AMONIO 0.45M  
 Y PIRUVATO DE SODIO 0.12M.

En el estudio de cada uno de los parámetros que definen las condiciones óptimas del proceso de síntesis de L-tirosina fueron repetidos de 5 a 7 experimentos. Analizamos la reproducibilidad de los resultados para diferentes partidas de células, Cuadro III. Esto es un ejemplo claro de la reproducibilidad de las regularidades cinéticas de la reacción de síntesis de la L-tirosina catalizada por células de Citrobacter intermedius para una partida de células u otras respectivamente. Debido a que la actividad enzimática (AE) TFL de cada una de las partidas de células se diferencian, nos apoyamos en las velocidades iniciales ( $V_0$ ) en el rango de  $(2.5 - 4 * 10^{-4}$  moles/min) de cada experimento en condiciones óptimas de reacción.

CUADRO III. Reproducibilidad de resultados									
Fecha	Partida células	Prot. (mg/ml)	$V_0 * 10E3$	A.E. *10E6	pH	T °C	Fenol (M)	Acet. (M)	Pir. (M)
02-91	I	3.47	3.34	5.33	8.5	35	0.09	0.45	0.12
04-91	II	3.27	2.66	4.63	8.5	35	0.09	0.45	0.12
05-91	III	3.47	3.11	5.21	8.5	35	0.09	0.45	0.12
06-91	IV	2.75	3.67	7.60	8.5	35	0.09	0.45	0.12
07-91	V	3.71	4.0	6.0	8.5	35	0.09	0.45	0.12

De esta manera podemos decir que las condiciones estandares para la síntesis de L-tirosina fueron, fenol 0.09M, acetato de amonio 0.45M, piruvato de sodio 0.12M. El volumen de la mezcla reaccionante en los reactores fué de 30 ml. a un pH de 8.5 y a una temperatura del sistema de 35°C, la concentración de proteína celular fué de 3-4 mg/ml. La mezcla reaccionante constantemente y en forma intensiva se sometió a agitación.

Bajo el estudio de cada uno de los parámetros del sistema reaccionante se varió en un rango definido, manteniéndose constantes el resto de los parámetros se determinó la actividad enzimática expresada en moles de sustrato/mg. de proteína bacteriana por minuto, y la concentración de proteína en mg./ml de mezcla reaccionante. En los cuadros IV,V,VI,VII,VIII y IX se presentan los resultados de estos estudios.

CUADRO IV.- Influencia de la concentración de fenol sobre la actividad enzimática TFL de células de Citrobacter intermedius.

Conc. fenol (M).	Periodo inducción (min)	Actividad enzimática (moles/mg * min) * 10 <sup>6</sup>	Conc. prot. (mg/ml)
0.03	-	-	4.574
0.05	60	1.725	4.574
0.08	30	6.472	4.574
0.09	15	9.639	2.752
0.10	cte	5.520	3.470
0.20	cte	-	3.390
0.30	cte	-	3.390
0.90	cte	-	4.574
1.0	cte	-	4.574
1.5	cte	-	4.574

**CUADRO V.- Influencia de la concentración de acetato de amonio sobre la actividad enzimática TFL de células de Citrobacter intermedius.**

Concentración de acetato de amonio (M)	Actividad enzimática <sup>6</sup> (moles/mg*min) *10	Concentración de proteína (mg/ml)
0.1	1.188	3.390
0.3	7.570	3.390
0.4	8.612	4.368
0.45	10.163	4.368
0.5	8.776	4.367
0.6	9.770	4.368
0.8	11.260	3.390
1.0	11.875	2.401
1.5	11.150	3.634

**CUADRO VI.- Influencia de la concentración de piruvato de sodio sobre la actividad enzimática TFL de células de Citrobacter intermedius.**

Concentración de piruvato de sodio (M)	Actividad enzimática <sup>6</sup> (moles/mg*min) *10	Concentración de proteína (mg/ml)
0.05	7.823	1.779
0.08	11.593	1.779
0.09	14.138	1.779
0.12	20.010	1.779
0.15	26.000	1.779
0.18	22.748	1.779

**CUADRO VII.- Influencia del pH de la reacción sobre la actividad enzimática TFL de células Citrobacter intermedius.**

pH	Actividad enzimática <sup>6</sup> (moles/mg * min) *10	Concentración de proteína (mg/ml)
6.0	-	2.140
6.5	4.650	2.140
7.0	13.590	2.140
7.5	17.917	2.140
8.0	29.198	2.140
8.5	36.636	2.140
9.0	10.541	2.140
9.5	6.907	2.401
10.0	3.445	2.401

**CUADRO VIII. Influencia de la temperatura de reacción sobre la actividad TFL de células de Citrobacter intermedius**

Temp.de reacc.(°C).	Periodo inducción (min)	Actividad enzimática <sup>6</sup> (moles/mg*min) *10	Concentración de proteína (mg/ml)
25	45	3.073	5.722
30	45	5.884	2.514
35	30	12.125	2.514
37	15	11.900	5.722
40	15	6.226	2.514
43	-	5.444	2.514
45	-	1.390	5.722

**CUADRO IX.- Influencia de la cantidad de biocatalizador sobre la velocidad inicial de la reacción enzimática TFL catalizada por células de Citrobacter intermedius.**

Suspensión celular adicionada (ml)	Periodo inducción (min)	Concentración de proteína (mg/ml.MR)	Proteína total adicionada (mg)	Velocidad inicial (moles/mg) * 10 E4
2	75	1.64	51.302	0.95
3	60	2.46	76.952	1.33
4	30	3.28	120.734	2.22
5	15	4.10	150.920	2.66
6	15	4.92	153.907	3.30

5.4. Particularidades cinéticas de la reacción de síntesis de L-tirosina a partir de fenol, acetato de amonio y piruvato de sodio catalizada por células de Citrobacter intermedius.

El empleo de células de microorganismos para la síntesis de aminoácidos y otras sustancias orgánicas es prospectivo (Cap.III). Las investigaciones de la acción cinética dentro de la célula podemos considerar que apenas empiezan desarrollarse. Los sustratos iniciales en estos casos pueden participar no solamente en la reacción que es objeto de estudio sino también en otras reacciones metabólicas de la célula (28). Los productos formados pueden ser sustratos de subsecuentes reacciones enzimáticas. La membrana de la célula microbiana reacciona en la transferencia de masa de los reactivos hacia la célula y hacia afuera de esta. Por eso con frecuencia independientemente de la alta concentración de sustratos en la

solución externa, los procesos de difusión y transporte para los reactivos es limitante en los procesos enzimáticos que se desarrollan con células de microorganismos. Desarrollamos el estudio cinético de la reacción de síntesis de L-tirosina catalizada por células de Citrobacter intermedius.

Investigamos el papel que juega la difusión externa en la cinética de acción de la TFL en las células, como se aprecia en el Cuadro X.

CUADRO X. Influencia de la agitación de la mezcla reaccionante sobre la velocidad del consumo de fenol.		
	Actividad enzimática 6 *10 (moles/mg.min)	Velocidad inicial 3 *10 (moles/min)
Con agitación	8.3	4.0
	7.6	3.67
	14.1	4.4
Sin agitación	2.49	1.2
	2.28	0.7
	4.23	1.32

De aquí se demuestra que bajo agitación de la mezcla reaccionante la velocidad de consumo del fenol es mayor que en el caso de la mezcla reaccionante sin someterse a agitación. Además, cabe mencionar que independientemente de que aunque la agitación sea intensiva, siempre va a quedar una capa de sustrato alrededor de la célula que no se va a agitar, pero, podemos considerar desde el punto de vista experimental que la difusión de esta capa acuosa que se forma alrededor de la pared celular no juega un papel importante en la difusión de los reactivos. Por tal razón la podemos descartar como limitante en

el proceso, ya que la difusión de estos a través de esta capa va a ser mucho más rápida que la difusión a través de la pared celular que está constituida por lipopolisacaridos, fosfolípidos y peptidoglucanos. Bajo una agitación intensiva del sistema reaccionante podemos considerar que la difusión de los reactantes del medio exterior hacia la pared celular no limita al proceso de síntesis de L-tirosina catalizado por células de C.intermedius.

En las curvas cinéticas de nuestra reacción se observa un periodo de inducción, el cual se conserva aun bajo una intensiva agitación del sistema reaccionante (Fig.5). Se aprecia el periodo de inducción que nos indica que se encuentra relacionado con la transferencia de masa de los sustratos a través de la pared celular y la velocidad de consumo de fenol y acumulación de tirosina serán numéricamente iguales. Es probable que el periodo de inducción esté relacionado con la modificación de la pared celular y gracias a esta, se ve aumentada su permeabilidad permitiendo el acceso de los sustratos. Esto se ha observado en experimentos cinéticos para otros microorganismos (130). En la revisión bibliográfica se hizo notar que la membrana externa de bacterias G(-) se encuentran poros a través de los cuales se pueden difundir sustancias de bajo peso molecular (73). Tales poros pueden ser bloqueados por otros componentes de la membrana celular.

El periodo de inducción probablemente corresponde al tiempo necesario para el acceso de los sustratos hacia los poros (130). El fenol que es uno de los sustratos de la síntesis de L-tirosina, es un plasmolizador de la membrana celular por eso

la modificación de la pared celular transcurre ya durante la misma reacción. El periodo de inducción depende de la concentración inicial de fenol en el sistema reaccionante hasta 0.09M, pero con el aumento de la concentración de fenol, por encima de estas concentraciones, el periodo de inducción permanece constante (Cuadro IV). La síntesis de L-tirosina no se observa si la concentración de fenol es menor a 0.05M, como se muestra en la Fig.7.

Es posible que esto se relacione con la insuficiente modificación de la pared celular. En la literatura por ejemplo, se estableció que bajo el tratamiento de células de E.coli por tolueno (91), el periodo de inducción sobre las curvas cinéticas del consumo de fumarato de amonio y acumulación de ácido L-aspartico se ve disminuído al incrementar la concentración de este plasmolizador hasta un porcentaje volumétrico de 0.8 (el rango estudiado fué de 0.1 a 1.0). De la literatura se sabe que el fenol se puede unir a diferentes proteínas y organelos celulares (110). En consecuencia de esto, la síntesis de la L-tirosina no ocurre cuando la concentración interna de fenol es muy baja.

El periodo de inducción se relaciona con la modificación de la pared celular y depende de la partida de células y del tiempo de conservación de la biomasa, ya que en el proceso de conservación, las células forman capas mucosas que se transforman en barreras adicionales para los sustratos y eso trae consigo el periodo de inducción.

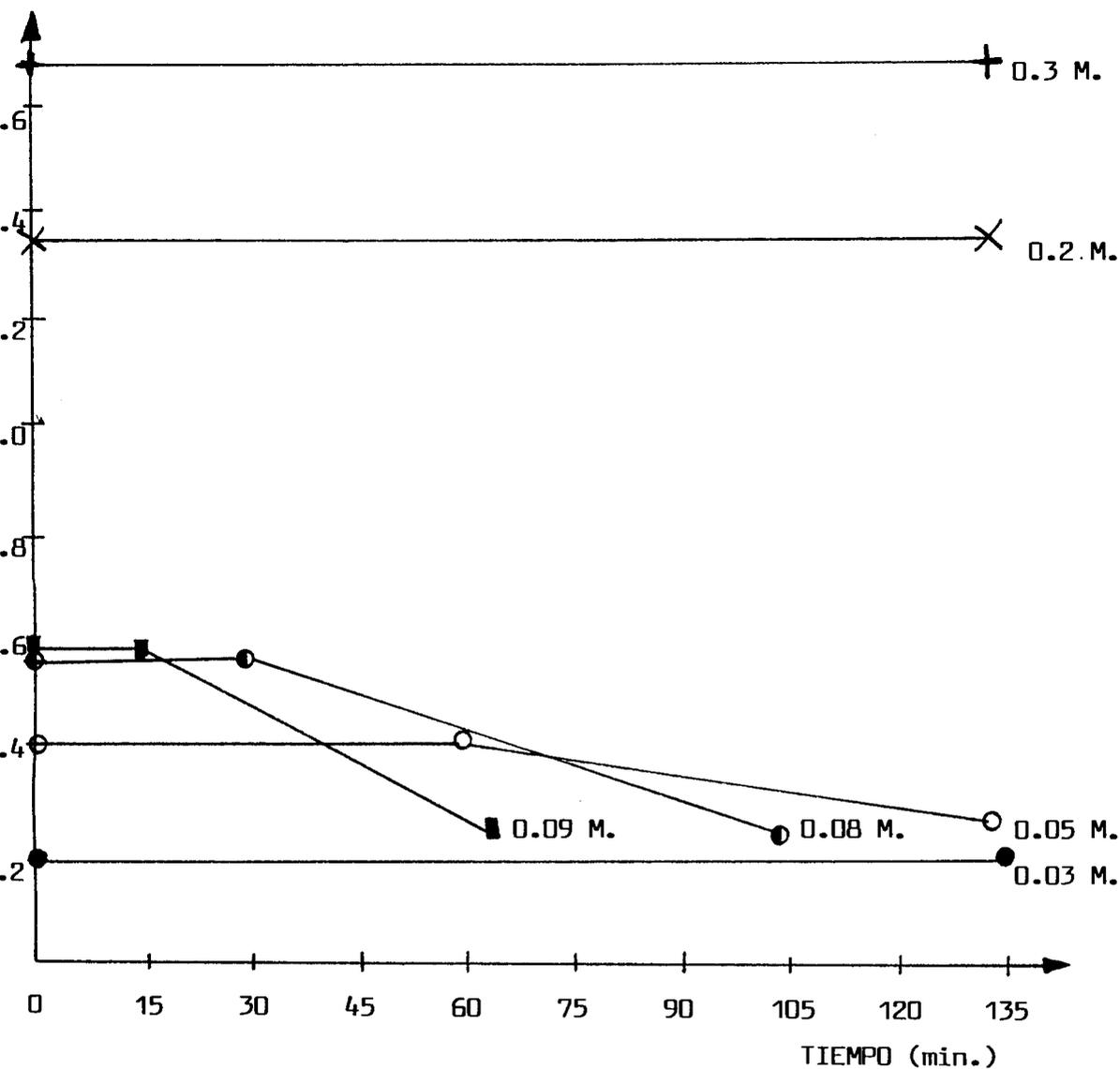


FIG.7 INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE FENOL SOBRE EL PERIODO DE INDUCCION DE LA REACCION DE SINTESIS DE L-TIROSINA CATALIZADA POR CELULAS DE *Citrobacter intermedius*.  
 CONDICIONES DE REACCION: TIEMPO DE INCUBACION 12 HRS., 3-4 mg.PROTEINA/ml.MR., pH 8.0, TEMP. 35 °C, SUSTRATOS: ACETATO DE AMONIO 0.5M; PIRUVATO DE SODIO 0.15M Y FENOL 0.03M (●), 0.05M (○), 0.08M (●), 0.09M (■), 0.2M (X), 0.3M (+).

Este periodo también depende de la temperatura, ya que al aumentar esta, el primero se ve disminuido (Cuadro VIII y Fig.8). La temperatura influye sobre el estado físico de la pared celular. El nivel de libertad de las cadenas de lípidos tiene un significado esencial para el funcionamiento del sistema enzimático en las membranas celulares y para la permeabilidad de la misma membrana. La disminución o incremento de la temperatura conducen al endurecimiento o ablandamiento de los ácidos grasos respectivamente (1). Bajo altas concentraciones de fenol y la a una temperatura de 40°C el periodo de inducción desaparece.

#### 5.4. Síntesis enzimática de la L-tirosina a partir de fenol, acetato de amonio y piruvato de sodio catalizada por células de *Citrobacter intermedius*

El análisis de la revisión bibliográfica de los diferentes métodos de obtención de L-tirosina mencionados en el Cap.III, mostró que un nuevo y перспекivo método es la síntesis enzimática.

Las células de *Erwinia herbicola* con alta actividad enzimática TFL, catalizan la síntesis de L-tirosina a partir de serina y fenol con un alto rendimiento en función del tiempo de reacción y la actividad de esta, es del orden de 6 gr/lt.\* hr. (74). Las células de esta bacteria catalizan también la síntesis de tirosina a partir de fenol, acetato de amonio y piruvato de sodio pero en este caso su rendimiento es menor; en el caso de *Citrobacter freundii* (59) que catalizan la síntesis de L-tirosina a partir de fenol, acetato de amonio y piruvato de

sodio con un rendimiento de 6 gr./lt.\* hr. El empleo de células de microorganismos en calidad de catalizadores en la síntesis de L-tirosina presenta una serie de ventajas: las células tienen una alta actividad TFL y no es necesario aislar la enzima, no es necesaria la adición a la mezcla reaccionante de cofactores con alto valor agregado como lo es el piridoxal fosfato, el cual se encuentra unido ya con la enzima dentro de la célula misma.

5.5. Condiciones óptimas de la reacción de L-tirosina a partir de fenol, acetato de amonio y piruvato de sodio catalizada por células de *Citrobacter intermedius*.

TFL es una enzima inducida, se sintetiza dentro de la célula de *C.intermedius* y otros microorganismos (10,14,31,35,40,50,56,60,74,90,107,108) al adicionar en el medio de crecimiento L-tirosina. Se considera que esta enzima cataliza las reacciones de  $\alpha,\beta$ -eliminación de tirosina. En las investigaciones de autores japoneses donde emplean células de *E. herbicola* y *E.intermedia* con alta actividad TFL, y de autores rusos con células de *C. freundii* también con alta actividad TFL, la síntesis de L-tirosina es del orden de un 70 a 90% de acuerdo al consumo de fenol. En nuestro caso es de un 80 a 90% y el desplazamiento del equilibrio hacia la formación de L-tirosina con las condiciones óptimas de reacción lo facilita la baja solubilidad de la tirosina.

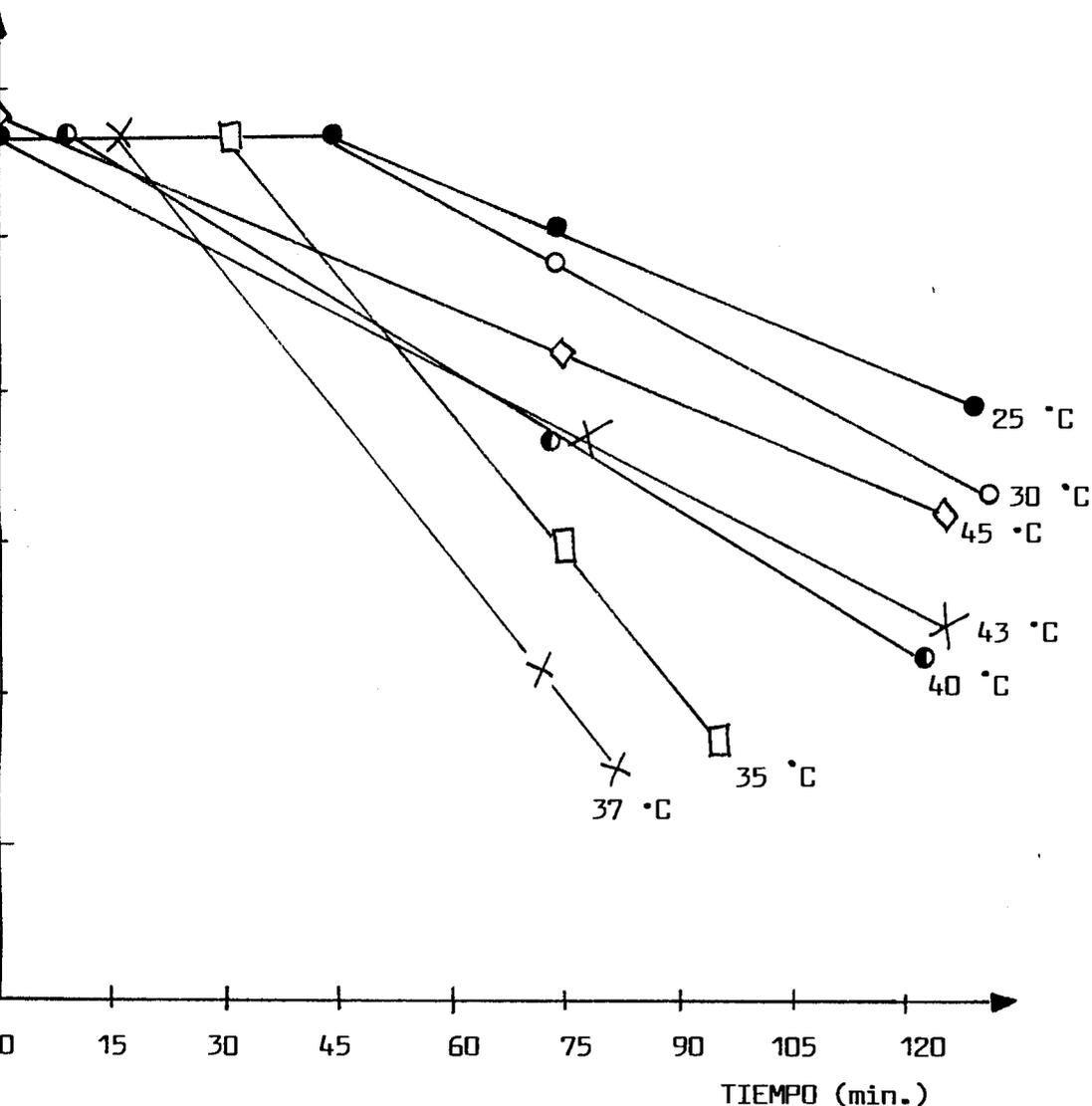


FIG. 8 INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA SOBRE EL PERIODO DE INDUCCION DE LA REACCION DE SINTESIS DE L-TIROSINA CATALIZADA POR CELULAS DE Citrobacter intermedius.  
 CONDICIONES DE REACCION: TIEMPO DE INCUBACION 12 HRS.; 3 - 4 mg.PROTEINA/ml.MR.; pH 8.0; TEMP. 25°C (●), 30°C (○), 35 °C (□), 37°C (×), 40°C (●), 43°C (×), 45°C (◇);  
 SUSTRATOS: FENOL 0.08M, ACETATO DE AMONIO 0.15M Y PIRUVATO DE SODIO 0.15M.

En base a las investigaciones cinéticas de la reacción de síntesis de L-tirosina definimos las condiciones óptimas de esta reacción.

La concentración óptima de fenol determinada para este proceso se aprecia claramente en la Fig.9, (actividad enzimática contra la concentración del fenol), determinando que a una concentración de 0.09M las células de C.intermedius reflejan su máxima expresión de la actividad TFL y por ende, en donde se logra la mayor conversión de sustratos en producto de reacción. Al estudiar esta gráfica, apreciamos claramente que la actividad enzimática se ve aumentada en el rango de 0.05 a 0.09M de fenol. Con concentraciones superiores a esta última, la actividad enzimática disminuye. Esto se debe probablemente a que estas concentraciones de fenol lisan totalmente a la célula e inhiben la actividad TFL de estas células, de tal manera que lo óptimo para nuestro biocatalizador y lograr la máxima síntesis de L-tirosina es empleando 0.09M de fenol.

En cambio cuando estudiamos la influencia de los otros dos sustratos acetato de amonio y piruvato de sodio (Fig. 10 y 11 respectivamente), apreciamos claramente que estos no tienen una influencia considerable dentro de nuestro sistema reaccionante, ya que al variar la concentración de piruvato de sodio en un rango de 0.01 a 0.18M, la actividad enzimática de las células se ve aumentado. Sin embargo a concentraciones superiores de este rango, la actividad enzimática TFL permanece constante, lo cual nos dice que la síntesis de L-tirosina no cambia cuando la concentración del piruvato de sodio es superior a 0.12M. Lo mismo sucede con el sustrato acetato de amonio estudiado en un

rango de concentración de 0.1 a 1.5M, la actividad TFL no cambia arriba de la concentración de 0.45M, de tal manera definimos que estos dos sustratos no son limitantes en nuestro sistema reaccionante.

El pH óptimo definido en la reacción de síntesis de L-tirosina fué de 8.5 y estos experimentos se encuentran representados en la Cuadro VII y Fig.12. El análisis de esta grafica muestran que el cambio del pH en el rango de 6 a 8.5 la actividad enzimática se ve influenciada positivamente por la concentración de iones hidrónico, esto se debe probablemente a que se tiende al equilibrio del micromedio de la enzima TFL que se encuentra dentro de la célula (89,120), sin embargo a pH arriba de 8.5, la actividad enzimática se ve disminuída trayendo consigo la disminución de la formación de la L-tirosina en nuestro sistema reaccionante.

La temperatura óptima encontrada para nuestro proceso fué de 35-37°C (Fig.13), de aquí logramos definir que el aumento de la temperatura hasta los 37°C, la actividad TFL de las células se ve aumentada, esto se debe probablemente a lo descrito en el Cap. IV, sin embargo al aumentar la temperatura por encima de 37°C la actividad enzimática disminuye, esto puede ser porque aunada a la influencia de la temperatura con la concentración de fenol aumenta considerablemente la permeabilidad de la membrana, este último trae consigo la termoinactivación y la misma inhibición de la enzima por el fenol.

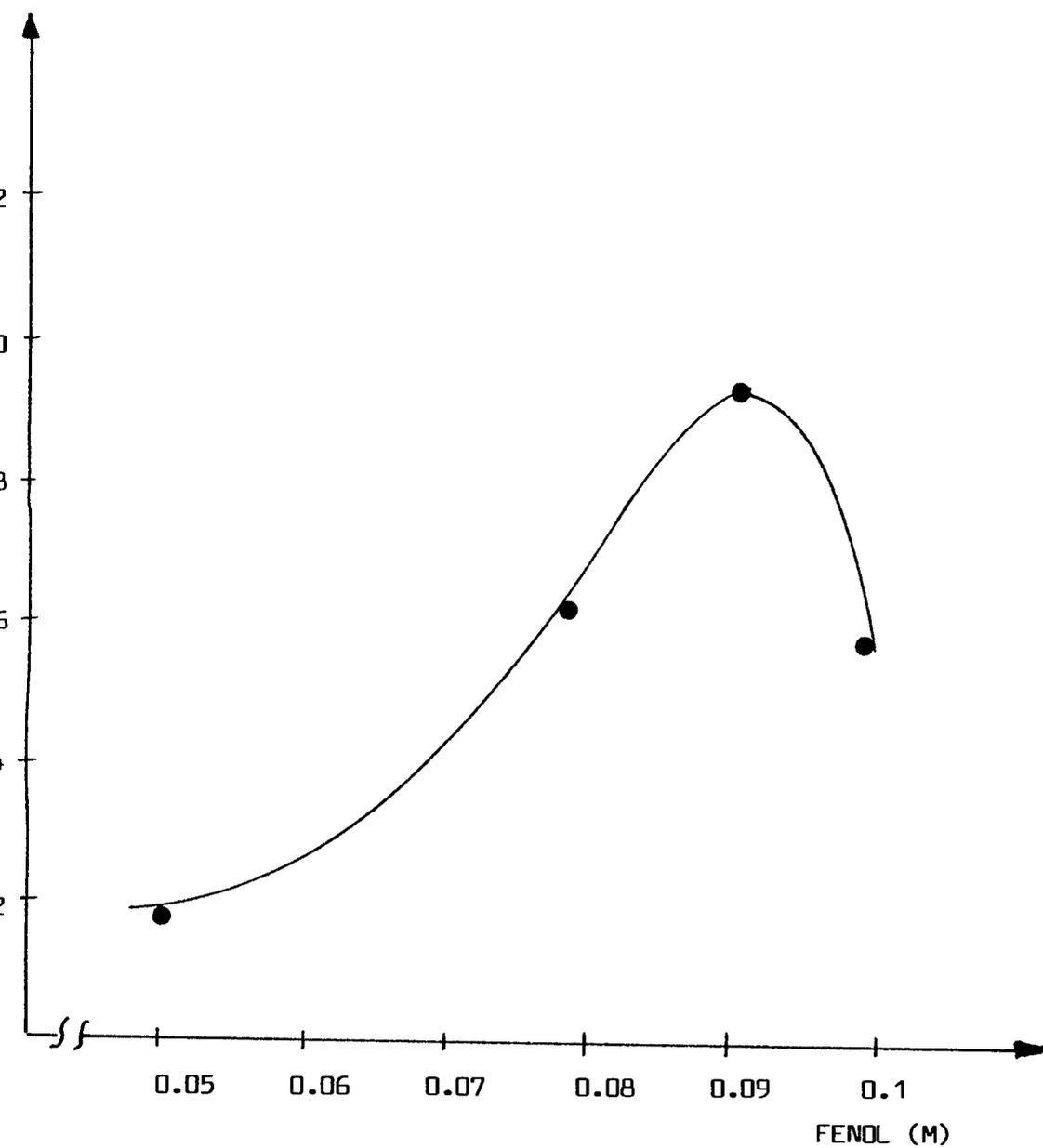


FIG.9 INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE FENOL SOBRE LA ACTIVIDAD TFL EN CELULAS DE Citrobacter intermedius.  
 CONDICIONES DE REACCION: TIEMPO DE INCUBACION 12 HRS.,  
 3-4 mg.PROTEINA/ml.MR., pH 8.0, TEMP. 35°C, SUSTRATOS:  
 ACETATO DE AMONIO 0.5M, PIRUVATO DE SODIO 0.15M Y FENOL.

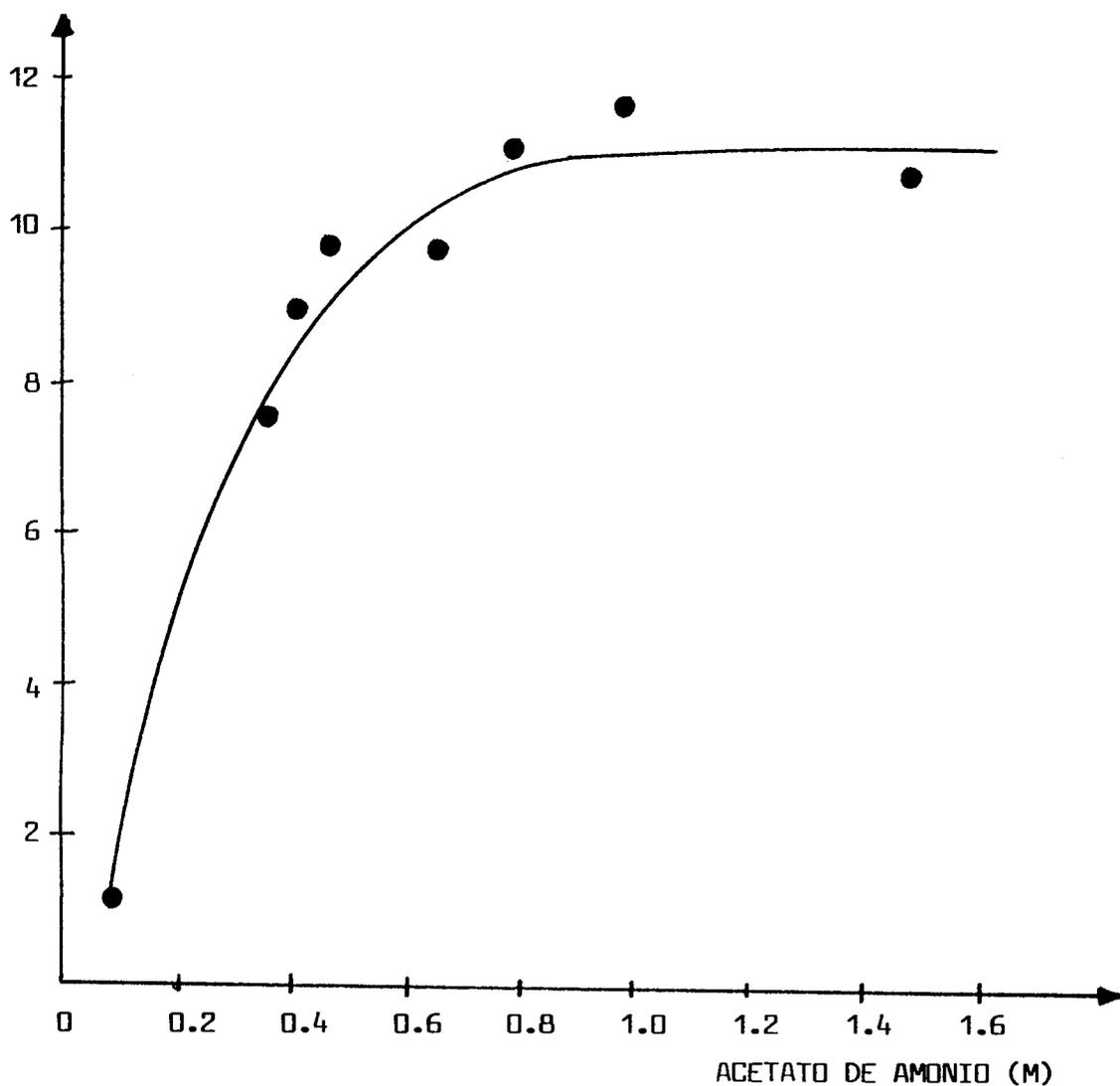


FIG.10 INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE ACETATO DE AMONIO SOBRE LA ACTIVIDAD TFL DE CELULAS DE Citrobacter intermedius.

CONDICIONES DE REACCION: TIEMPO DE INCUBACION 12 HRS.,  
 3 - 4 mg.PROTEINA/ml.MR., pH 8.0, TEMP. 35°C, SUSTRATOS:  
 FENOL 0.09M, PIRUVATO DE SODIO 0.15M Y ACETATO DE AMONIO

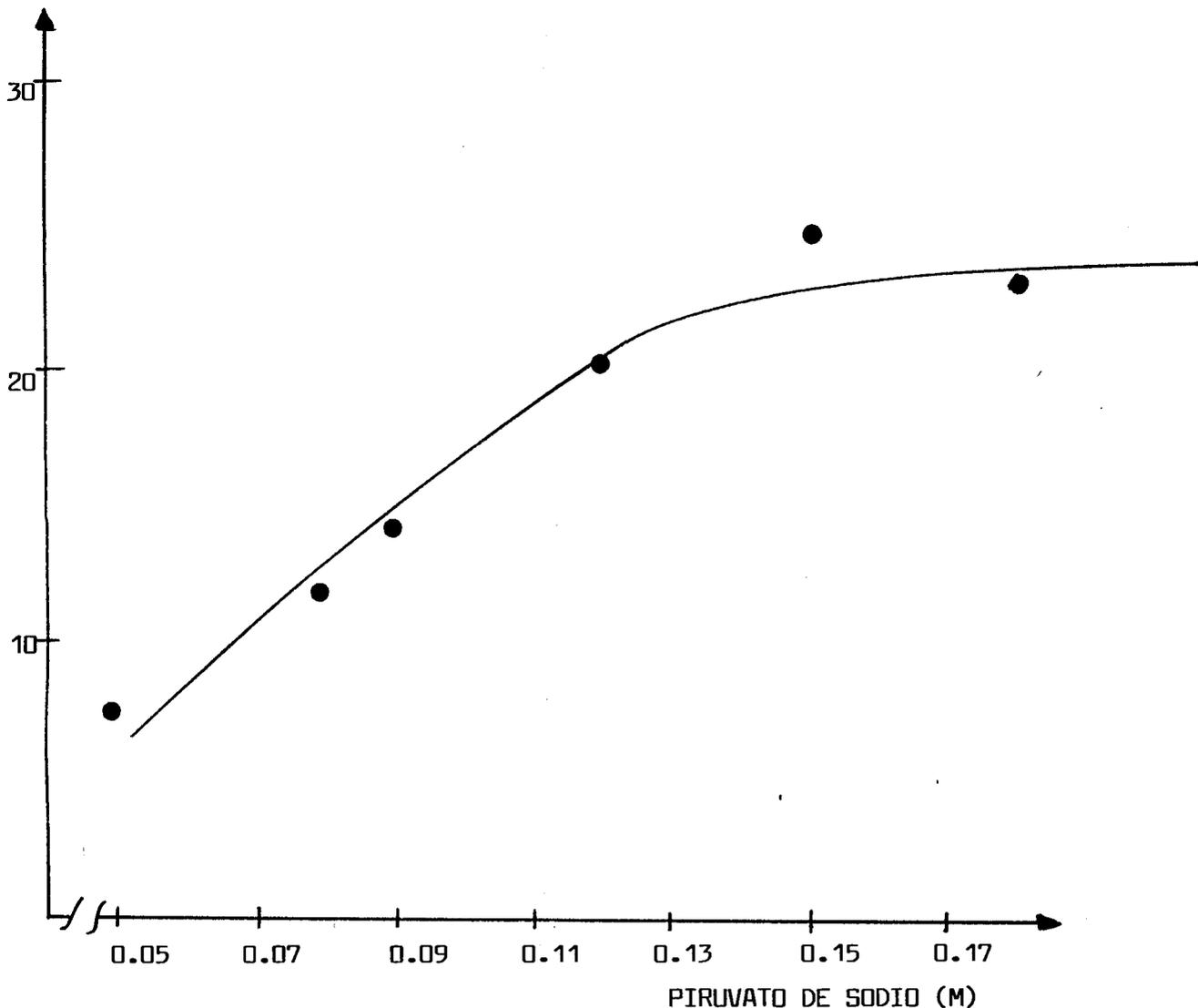


FIG.11 INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE PIRUVATO DE SODIO SOBRE LA ACTIVIDAD TFL DE CELULAS DE Citrobacter intermedius.

CONDICIONES DE REACCION: TIEMPO DE INCUBACION 12 HRS.,  
 3 - 4 mg.PROTEINA/ml.MR., pH 8.0, TEMP. 35°C, FENOL  
 0.09M, ACETATO DE AMONIO 0.45M Y PIRUVATO DE SODIO.

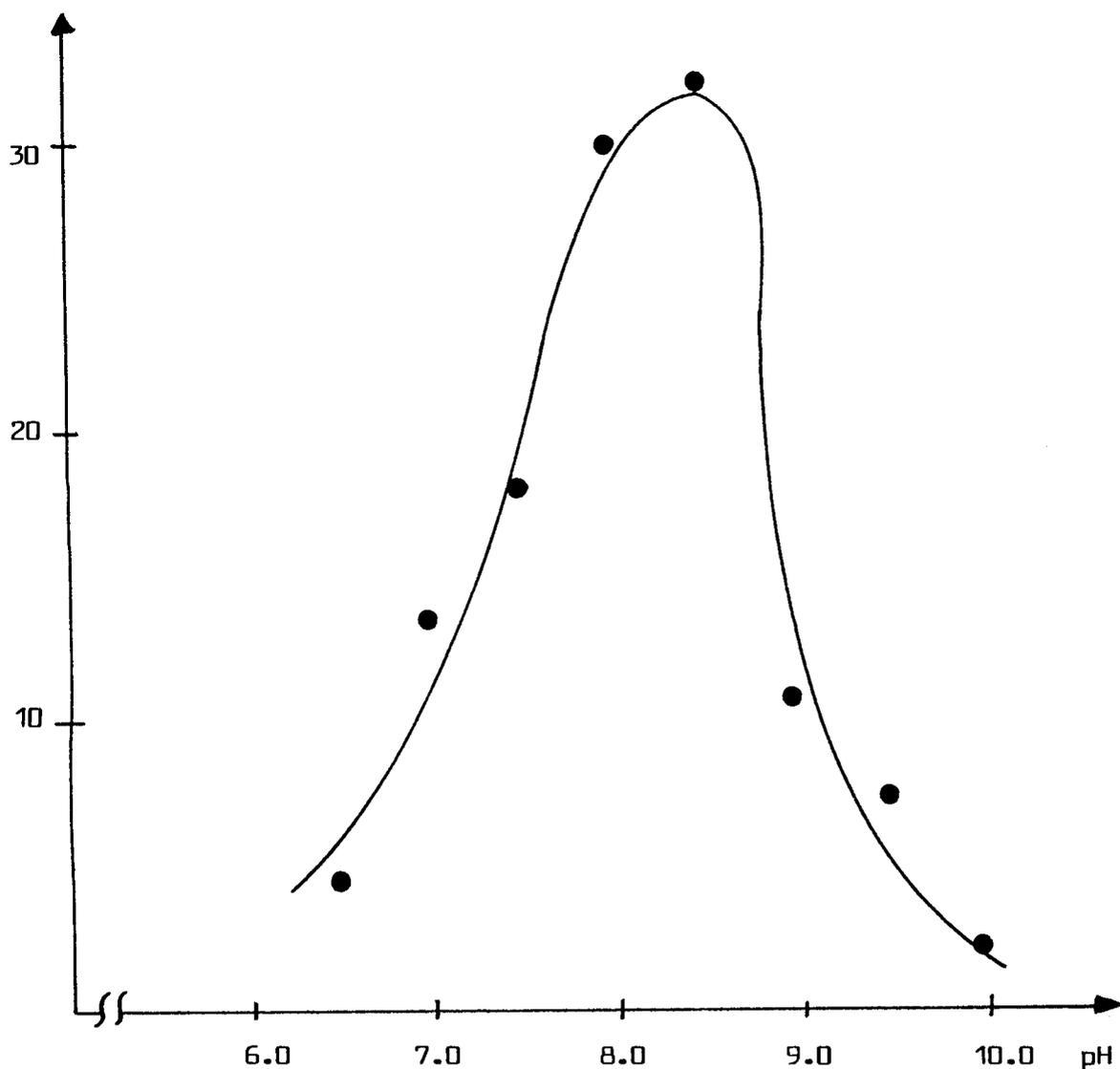


FIG.12 INFLUENCIA DEL pH DE REACCION SOBRE LA ACTIVIDAD TFL DE CELULAS DE Citrobacter intermedius.  
 CONDICIONES DE REACCION: TIEMPO DE INCUBACION 12 HRS.,  
 3 - 4 mg.PROTEINA/ml.MR., TEMP. 35°C, SUSTRATOS: FENOL  
 0.09M, ACETATO DE AMONIO 0.45M Y PIRUVATO DE SODIO 0.12M

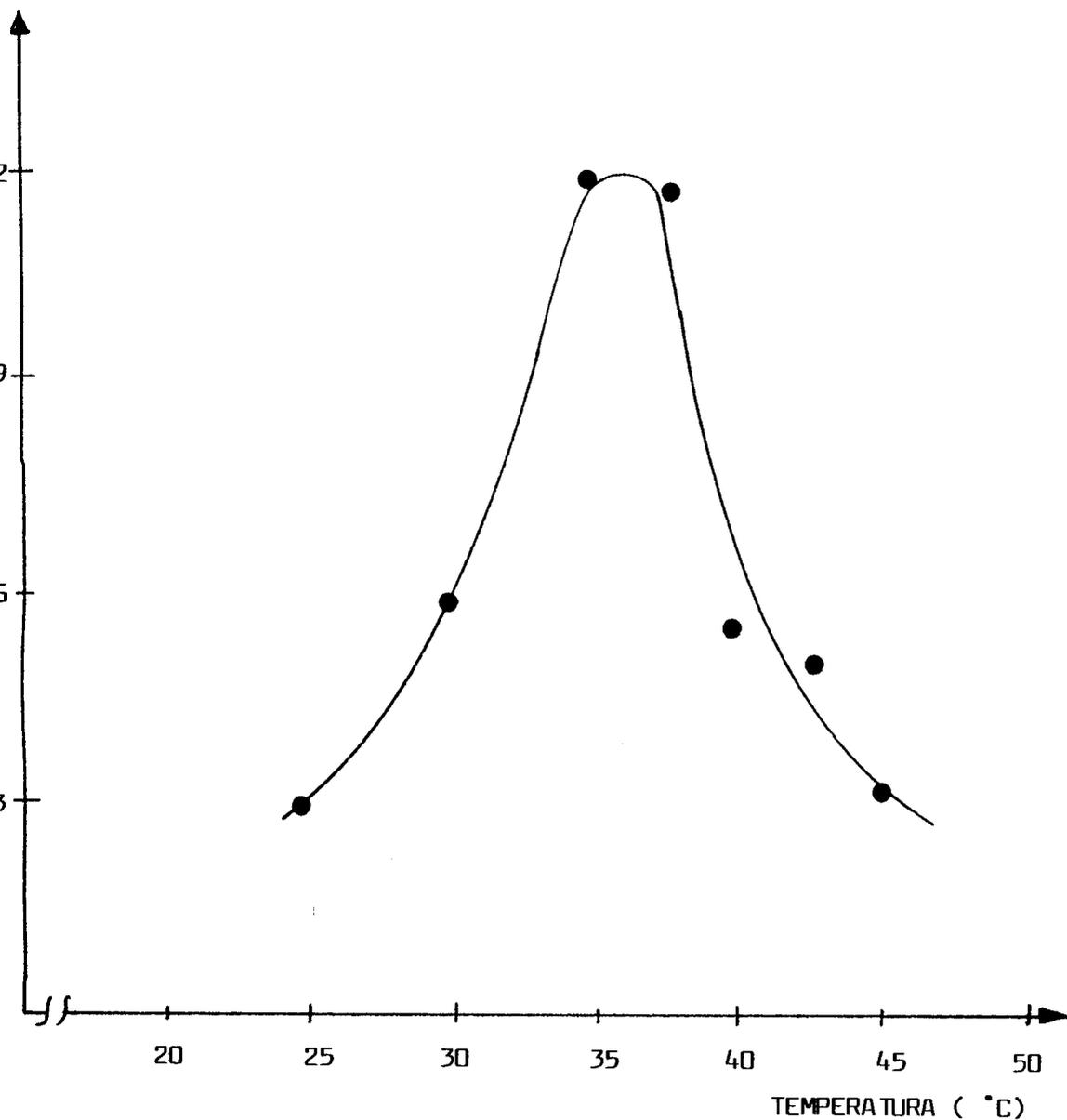


FIG.13 INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA DE LA REACCION SOBRE LA ACTIVIDAD TFL DE CELULAS DE Citrobacter intermedius.  
 CONDICIONES DE REACCION: TIEMPO DE INCUBACION 12 HRS.,  
 3 - 4 mg.PROTEINA/ml.MR., pH 8.5, SUSTRATOS: FENOL  
 0.09M, ACETATO DE AMONIO 0.45M Y PIRUVATO DE SODIO 0.12M

En el estudio de la influencia de la concentración de proteína celular sobre el proceso de síntesis de L-tirosina a partir de fenol, piruvato de sodio y acetato de amonio reflejó que al aumentar la concentración de biocatalizador basado en células de C.intermedius con alta actividad TFL la velocidad inicial del proceso de síntesis de tirosina aumentó en forma proporcional, en el estudio de concentración de proteína celular en un rango de 1-5 mg/ml el periodo de inducción se ve disminuído (Cuadro IX) y la velocidad depende linealmente de la concentración de proteína celular dentro de este rango (Fig 14). De esta manera las condiciones óptimas definidas por nosotros para el proceso de síntesis de L-tirosina mediante células de Citrobacter intermedius con alta actividad TFL a partir de fenol, pirivato de sodio y acetato de amonio fueron las siguientes: pH 8.5; temperatura 35-37°C; concentración de biomasa 3-4 mg/ml.MR; concentraión de fenol 0.09M; concentración de acetato de amonio 0.45M; concentración de piruvato de sodio 0.12 M; tiempo de incubación de las células 12 hrs.

Cabe mencionar que para la identificación de cada uno de estos parámetros fueron montados un mínimo de 5 experimentos, logrando bajo estas condiciones la síntesis de L-tirosina de 8 gr./lt. \* hr., comparando este dato con los de otros autores, solamente en un caso el resultado es semejante y en comparación con los demás nuestros resultados son superiores (Cuadro XI).

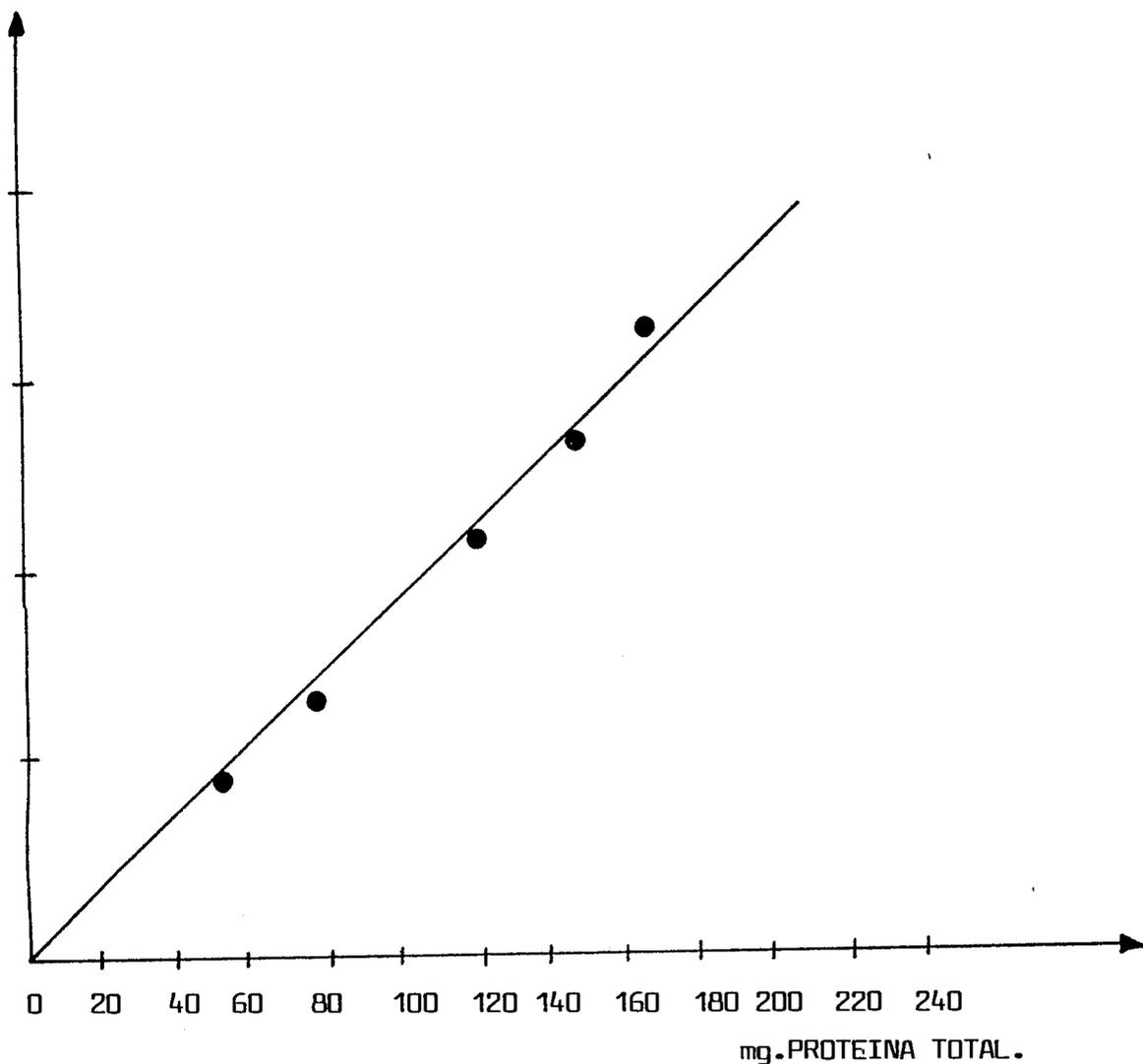


FIG.14 INFLUENCIA DE LA CANTIDAD DE PROTEINA BACTERIANA SOBRE LA VELOCIDAD INICIAL DE LA REACCION DE SINTESIS DE L-TIROSINA CATALIZADA POR CELULAS DE Citrobacter intermedius CON ACTIVIDAD TFL. CONDICIONES DE REACCION: TIEMPO DE INCUBACION 12 HRS., pH 8.5, TEMP. 35°C, SUSTRATOS: FENOL 0.09M, ACETATO DE AMONIO 0.45M Y PIRUVATO DE SODIO 0.12M.

CUADRO XI. Obtención de L-tirosina por métodos propuestos por diferentes autores.

Método	Cantidad de L-tirosina obtenida ( gr/lt/hr.)	Ref.
Enzimático, usando células de <u>Citrobacter intermedius</u> , con actividad TFL.	8	X
Enzimático, usando células de <u>Erwinia herbicola</u> con actividad TFL.	0.029	31
Enzimático, usando enzima cristalizada de <u>Citrobacter freundii</u>	6.11 * 10 <sup>-3</sup>	76
Fermentativo, usando cepa mutante de <u>Bravibacterium flavum</u>	4.16 * 10 <sup>-3</sup>	92
Enzimático, usando células libres de <u>Citrobacter freundii</u> con actividad TFL.	2.64	81
Enzimático, usando células inmovilizadas de <u>Citrobacter freundii</u> con actividad TFL.	2.72	81
Enzimático, usando células de <u>Erwinia herbicola</u> con actividad TFL.	6.0	69
Enzimático, usando enzima aislada de <u>Citrobacter freundii</u>	8.0	69
Enzimático, reacción acomplada de enzimas purificadas de <u>Citrobacter freundii</u> ATCC 6750.	7.0	69
Enzimático, usando células de <u>Citrobacter freundii</u>	6.0	55

#### 5.6. Identificación y determinación de pureza del producto de reacción.

Con reactivo de ninhidrina se identificó al producto de reacción una vez cristalizado como aminoácido. Al hacer uso de la técnica de cromatografía en capa fina al revelar los corrimientos con ninhidrina, los Rf obtenidos de los cromatogramas fueron iguales tanto la L-tirosina grado analítico utilizada como patrón, como el Rf del producto de reacción cristalizado. Demostrando con esto que el producto de reacción que obtuvimos a partir de fenol, acetato de amonio y piruvato de sodio fué tirosina. En la Fig. 15 se presenta el cromatograma en capa fina.



FIG. 15 CROMATOGRAMA PARA LA IDENTIFICACION DEL PRODUCTO DE LA REACCION TIROSINFENOLIASA.  
 1.- CONTROL (AMINOACIDO L-TIROSINA GRADO ANALITICO); 2.- MEZCLA DE AMINOACIDOS: HISTIDINA, LISINA, ACIDO L-ASPARTICO, L-TIROSINA (PRODUCTO DE LA REACCION TFL) Y TRIPTOFANO; 3.- PRODUCTO DE LA REACCION TFL (L-TIROSINA).  
 FASE MOVIL: ACIDO ACETICO: BUTANOL: AGUA (1:4:1)  
 FASE FIJA: SILICA GEL. REVELADOR: NINHIDRINA.

## CONCLUSIONES

1.- Se logró establecer una metodología eficiente para el estudio de la biosíntesis de L-tirosina usando células de Citrobacter intermedius con alta actividad tirosinfenoliasa. La reacción se monitoreó por consumo de fenol en función del tiempo.

2.- Se estableció que el factor limitante de la reacción en lo que respecta a los sustratos fué la concentración de fenol, debido a su doble papel, tanto de plasmolizador como de sustrato de la reacción, mientras que las otras dos sustancias usadas en calidad de sustratos (acetato de amonio y piruvato de sodio) no son limitantes en la reacción estudiada.

3.- El periodo de inducción de la reacción de síntesis de L-tirosina catalizada por células de Citrobacter intermedius se ve influenciado por la concentración de fenol usado como sustrato y la temperatura del sistema reaccionante.

4.- El estudio de las condiciones de la síntesis enzimática del aminoácido L-tirosina catalizada por células de Citrobacter intermedius donde participan tres diferentes sustratos permitió establecer los parámetros óptimos de la misma:

\* Concentración de biocatalizador 3 - 4 mg./ml.

\*Tiempo de incubación de las células de Citrobacter intermedius 12 hrs.

\*Concentración de sustratos fenol 0.09 M, acetato de amonio 0.45 M., piruvato de sodio 0.12 M.

\*pH de la reacción 8.5.

\*Temperatura de la reacción 35 - 37°C.

5.- El método enzimático estudiado resulta prospectivo comparado con los propuestos por otros autores, desde el punto de vista del rendimiento del proceso que es de un 80-90% y la obtención de 7-8 gr. de L-tirosina/ lt.\* hr. Considerando de importancia el hecho de que se usen células de bacterias en calidad de biocatalizador, evitando de esta manera el proceso adicional de la extracción de la enzima intracelular TFL.

6.- El conocimiento de las condiciones óptimas de esta reacción permiten tener un mayor control y aplicación de la misma, por lo cual se propone como un método alternativo para la obtención del aminoácido L-tirosina que tiene importancia en la industria en general, incluyendo la alimentaria.

## BIBLIOGRAFIA

### CAPITULO VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.- Alexandrov, V.Y. 1975. Células, macromoléculas, temperatura. Ed. Ciencia.
- 2.- Andres, C. 1985. Combination biotechnology, ultrafiltration and dialysis produces fractionated whey products. Food Processing. 46(8).
- 3.- Badui, D.S. 1988. Química de los alimentos Cap. 5: Enzimas. pp. 207-222. Alhambra Universidad, México, D.F.
- 4.- Badway, A.B.A; Williams, L.D.; Snape, M.B. and Evans M. 1982. Biochemical Journal Letters: Brain tyrosine aminotransferase identity and possible role in the regulation of catecholamine synthesis. The biochemical Journal, Cellular aspects. 204 (3): 621-622.
- 5.- Badawy, A.B. and Williams, L.D. 1988. Enhancement of rat brain catecholamine synthesis by administration of small doses of tyrosine and evidence for substrate inhibition of tyrosine hydroxylase activity by large doses of the aminoacid. The Biological Journal, Cellular aspects. 206 (1): 165-168.
- 6.- Baeverle, P.A. and Huttner, W.B. 1987. Tyrosine sulfation is a trans-Golgi-specific Protein Modification. J. of Cell Biology. 105(6):2655-2664, part 1.
- 7.- Berezin, I.V. and Martinek, K. 1977. Fundamentos fisicoquímicos de la catálisis enzimática. Ed. Alta Escuela. pp. 269. (Russ).

- 8.- Binger, M.O. 1982. Manual sobre métodos de investigación en microbiología y virología. Ed. Moscú Medicina. pp.49-50. (Russ)
- 9.- Branen, L.A.; Davidson, P.M. and Salminen, S. 1990. Food Additives. Chapter 12: Enzymes. Marcel Dekker INC.
- 10.- Braunshtein, A.E. and Zhemiakin, M.M. 1952. Simposium de la Academia de Ciencias de la URSS. 85:1115-1118. (Russ).
- 11.- Brot, N. and Weissbach, H. 1965. Arch. Biochem. Biophys. 112: 1-6.
- 12.- Bru, R.; Sanchez, F.A. and García, C.F. 1989. Characteristics of tyrosinase in AOT-isooctane reverse micelles. Biotech. and Bioeng. 34: 304-308.
- 13.- Buck, R.A. and Knutson, U.P. 1988. The quantitation of insuline receptor tyrosine phosphorylation without the use of radiolabeled substrates. J. of Cell Biology 107(6):722a part 3.
- 14.- Byng, G.S.; Sánchez, F.A. and García, C.F. 1980. Variable enzymological patterning in tyrosine biosynthesis as a means of determining natural relatedness among the pseudomonadaceae. J. of Bacteriology. 144 (1): 247-257.
- 15.- Carman, G.M. and Levin, R.E. 1977. Appl. and Environ. Microbiol. 33 (I): 192-198.
- 16.- Carman, G.M and Levin, R.E. 1977. J. of Food Biochemistry. I: 282-299.

- 17.- Charley, H. 1988. Preparación de los alimentos. Tomos I,III,IV. pp. 30,429,662-663. Ed. Orientación.
- 18.- Chemische Industrie. 1971. 23 (8): 514.
- 19.- Chemische Industrie. 1973. 25 (I): 5.
- 20.- Chen, T.S. 1982. Industrial Fermentation in China .  
J. Chem. Tech. Biotechnol. 1982. 32:669-673.
- 21.- Cleland, W. 1970. The Enzymes. Academic Press. 2: 1-65.
- 22.- Croce, M.C.; Litwack, G. and Koprowski, H. 1973. Human regulatory gene for inducible tyrosine aminotransferase in rat-human hybrids. Proc. Natl. Acad. Sci. 70(4): 1268-1272.
- 23.- Cronan, E.J.J. 1980.  $\beta$ -alanine synthesis in Escherichia coli. J. of Bacteriology. 141 (3):1291-1297.
- 24.- Davis, L. and Metzler, D.E. 1972. The Enzymes. Academic Press. 2: 33-74.
- 25.- De, B.K.; Brown, T.L.; Collins, M.; Suchy, F.J. and Scott, W. 1988. Identification of a tyrosine kinase in developing rat and mouse embryos. J. of Cell Biology. 107 (6): 724a part 3.
- 26.- Degly, C. and Nicholson, D. 1971. Metabolic ways. pp.314.
- 27.- Deutscher, M.P. 1974. J.Bacteriol. 118: 633-639.
- 28.- Dixon, M. and Webb, C.E. 1979. Enzymes. Third Edition, Longman.

- 29.- Dougan, D.; Wade, D. and Mearrick, P. 1975. Effects of L-DOPA metabolites at a dopamine receptor suggest a basis for on-off effect in Parkinsons's disease. Nature, 254:70
- 30.- Earp, H.S.; Prokoi, C.A. and Mc. Cune, B.K. 1988. EGF-receptor/kinase in liver epithelial cell. I. Studies on suppression of autophosphorylation during endocytosis. J. of Cell Biology. 107 (6): 722a part 3.
- 31.- Enei, H; Matsui, H.; Yamashita, K.; Okumura, S. and Yamada, H. 1972. Distribution of tyrosine phenol lyase microorganisms. Agric. Biol. Chem. 36(11):1861
- 32.- Enei, H.; Matsui, H.; Okumara, S. and Yamada, H. 1972. Elimination replacement and isomerization reactions by intact cells containing tyrosine phenol-lyasa. Agric. Biol. Chem. 36 (11): 1869-1876.
- 33.- Enei, H.; Nakazama, N.; Matsui, H. and Okumura, S. 1972. FEBS Lett. 21 (I): 39-41.
- 34.- Enei, H.; Yamashita, K.; Okumura, S. and Yamada, H. 1973. Culture conditions for the preparation of cells contain high tyrosine phenol lyase activity. Agric. Biol. Chem. 37(3):485.
- 35.- Faleev, N.G.; Vinogradova, N.K.; Martinkova, N.S.; Saporovskaya, M.V. and Belikov, V.M. 1985. D-serine deshidratase in extracts of Citrobacter intermedius. Appl. Bioch. and Microb. 21 (2): 180-182.

- 36.- Faleev, N.G.; Martnikova, N.S.; Saporovskaya, M.B. and Belikov V.M. 1977. Proceeding of the third joint US/URSS joint working group on the production of the substances by microbiologicals means. p.642. Tallin, URSS. (Russ).
- 37.- Faleev, N.G.; Sandovnikova, M.S.; Vinogradova, N.K.; Saporovskaya M.B.; Tsyryapkin V.A. and Belikov V.M. 1987. Selective conversion of D-serine to L-tyrosine under the action of Citrobacter intermedius cells on racemic serine in the presence of phenol. Appl. Biochem. and Microb. 23(4):392-396.
- 38.- Fineaf, J.B. 1972. Sub-cell Biochem. 1 (4): 363.
- 39.- Fujita-Yamauchi, Y.; Marmon, J.T. and Kathuria, S. 1988. Radiation inactivation experiments predict that a large form of the insulin receptor is a highly active tyrosine-specific protein kinase. J. of Cell Biology. 107 (6): 722a part 3.
- 40.- Fukui, S.; Ikeda, S. and Fujimura, M. 1975. Production of L-tryptophan, L-tyrosine and their analogues by use of immobilized tryptophanase and immobilized  $\beta$ -tyrosinase. European J. Appl. Microbiol. 1: 25-39.
- 41.- Furia, E.T. 1972. Hanbook of Food Additives. Charper 1: Enzymes. CRC Press, INC.
- 42.- Gorina, I.A. and Yakovleva, I.V. 1980. Rapid method for measuring protein content in microbial cells. Appl. Biochem. and Microbiol. XVI (6): 936-939.

- 43.- Gorr, S.U.; Foschitto, B.H. and Cohn, D.V. 1980. Tyrosine sulfation and secretion of Sp-I (chromogranin A) by the parathyroid. *J. of Cell Biology*, 107 (6): 350 part 3.
- 44.- Igram, D.L. and Evans, S.E. 1980. Dependence of thyroxine utilization rate on dietary composition. *The British J. of Nutrition*. 43 (3): 525-531.
- 45.- Jenkins, W.T. 1961. *J. Biol. Chem.* 238: 1121-1125.
- 46.- Kahn, C.R.; White, M.F. and Backer, J.M. 1988. Tyrosine phosphorylation of the insulin receptor is not required for insulin-stimulated internalization. *J. of Cell Biology* 107 (6): 722a part 3.
- 47.- Kaneko, T.; Izumi, Y. and Chibata, I. 1974. Synthetic production and utilization of aminoacids. Iton T.N.Y.; Kodansha, Ltd. Tokyo and Wiley.
- 48.- Kenney, F.T. and Flora, R.M. 1961. Induction of tyrosine  $\alpha$ -ketoglutarate transaminase in rat liver. *The Journal of Biological Chemistry*. 236 (10): 2699-2702.
- 49.- Kiick, M.D. and Phillips, S.R. 1988. Mechanistic deductions from multiple kinetic and solvent deuterium isotope effects and pH studies of pyridoxal phosphate dependent carbon-carbon lyases: Escherichia coli tryptophan indole lyase. *Biochemistry*. 27: 7339-7344.

- 50.- Kiick, M.D. and Phillips, S.R.1988. Mechanistic deductions from kinetic isotope effects and pH studies of pyridoxal phosphate dependent carbon-carbon lyases: Erwinia herbicola and Citrobacter freundii tyrosine phenol-lyase. Biochemistry 27 (9): 7333-7338.
- 51.- Kinzel, J.J. and Bhatlacharjee, J.K. 1982. Lysine biosynthesis in Rhodotorula glutinis: properties of pipecoliacoxidase. J. of Bacteriology. September: 1073-1077.
- 52.- Koreman, I.M. 1975. Photometric Analysis, determination methods of organic sustances. Ed. Chimia. (Russ).
- 53.- Kumagai, H.; Yamada, H; Matsui, H.; Ohgishi, H. and Ogata K. 1970. J.Biol.Chem. 245: 1767-1772.
- 54.- Kumagai, H.; Yamada, H.; Matsui, H.; Ohkishi, H. and Ogata K. 1970. J. Biol.Chem. 245: 1773-1777.
- 55.- Kumagai, H.; Kashima, N. and Yamada, H. 1970. Biochem. Biophys. Res.Comm. 39: 796-801.
- 56.- Kumagai, H.; Kashima, N.; Torii, H.; Yamada, H.; Enei, H. and Okumura, S. 1972. Agr. Biol. Chem. 36: 472-482.
- 57.- Kumagai, H.; Yamada, H.; Masugi, F. and Fukui, S. 1973. Biochem. Biophys. Acta. 327: 510-514.
- 58.- Kunain, R.A.1970. Obtención y empleo de los L-aminoácidos. Riga; Zinate.

- 59.- Kupletskaya, M.B. 1979. Síntesis de tirosina y L-3,4-DOPA por bacterias Citrobacter freundii. Academia de Ciencias de la URSS. Bioquímica y Microbiología Aplicada. 15(6):827-831. (Russ).
- 60.- Kupletskaya, M.B. 1981. Examination of tyrosine and 3,4-DOPA, synthesis by Citrobacter freundii 62. Academia de Ciencias de la URSS. Bioquímica y Microbiología Aplicada. 17(2): 278-283. (Russ).
- 61.- Lee, K.T. and Hsiao, H. 1986. Synthesis of L-tirosine by a coupled reaction of serine hydroxymethyltransferase and  $\beta$ -tyrosinase. Enzyme Microbiology. 9: 523-526.
- 62.- Lehninger. 1984. Bioquímica, Segunda Edición. Ed. Omega. Barcelona, España.
- 63.- López-Munguía, C.A. 1989. Producción de enzimas microbianas. Biotecnología alimentaria, Curso del PUAL (Programa Universitario de Alimentos, UNAM). Octubre 2-4 México, D.F.
- 64.- López-Munguía, C.A. 1989. La Tecnología enzimática. Biotecnología alimentaria, Curso del PAUL, UNAM. Oct.2-4 Méx., D.F.
- 65.- Maa, R.A. 1983. Microorganismos con actividad catalítica tirosinfenoliasa y su aplicación en la síntesis de aminoácidos. Tesis para obtener el título de Químico Farmaco Biólogo, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila.

- 66.- Maher, A.P. and Pasquale, B.E. 1989. Heat shock induces protein tyrosine phosphorylation in culture cells. *J. of Cell Biology.* 108 (6): 2029-2035.
- 67.- Mandal, K. and Chakrabarti, B. 1988. Structure and stability of  $\tau$ -crystallins: tryptophan, tyrosine and cysteine accessibility. *Biochemistry.* 27 (12): 4564-4571.
- 68.- Matsunaga, T.; Higashijima, M.; Sulaswatty, A. and Nishimura, Sh. 1988. Repeat batch production of L-phenylalanine from phenylpyruvate and  $\text{NH}_4$  by immobilized cells of Nocardia opaca under hydrogen high pressure. *Biotech. and Bioeng.* 31: 834-840.
- 69.- Muro, T.; Nakatami, H.; Hiromi, K.; Kumagai, H. and Yamada, H. 1978. *J. Biochem.* 84: 633-640.
- 70.- Nagaoaka, S.; Kato, M.; Aoyama, Y. and Yoshida, A. 1986. Comparative studies on the hipercholesterolemia by excess dietary tyrosine or polychlorinated biphenyls in rats. *British J. of Nutrition.* 56 (2): 509-517.
- 71.- Nakamichi, K.; Nabe, K.; Yamada, S.; Tosa, T. and Chibata, I. 1984. Phenilalanine production by Rhodotorula glutinis with phenyl-alanine-amoniaco-lyase activity. *Appl. Microb. Biotech.* 19: 100.
- 72.- Naukova, D. 1971. *Manual de Bioquímica.* pp.135.
- 73.- Nikaido, H.; Song, A.S.; Shaltiel, L. and Nutminen, M. 1977. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 76: 324-330.

- 74.- Ogata, K.; Yamada, H; Enei, H. and Okamura, S. 1974. Biological methods of producing phenolic aminoacids. USA patent 3.791.924.
- 75.- Ohisalo, J.J.; Anderson, M.B.; Viljanen, A.A. and Anderson M.S. 1982. Biochemical Journal Letters: Is there a brain tyrosine aminotransferase? The Biochemical Journal, Cellular aspects. 204 (3): 621-622.
- 76.- Orndorff, A.S.; Costantino, N.; Stewart, D. and Durham, R. D. 1988. Strain improvement of Rhodotorula graminis for production of a novel L-phenylalanine ammonia - lyase. Appl. and Enviromental Microbiology. 54 (4): 996-1002.
- 77.- Özingen, M. 1987. Kinetics of aminoacid production by over-producer mutant microorganisms. Enzyme Microb. Technol. 10: 110-114.
- 78.- Para, G. and Baratti, J. 1988. Synthesis of L-Dopa by Escherichia intermedia cells immobilized in a carragenin gel. Enzyme and Microbial Technology. 10 (12): 729-735.
- 79.- Pasquale, E.B. and Sinsger, S.J. 1988. Cloning of protein tyrosine kinases expressed in chicken embryos. J. of Cell Biology. 107 (6): 722a Part 3.
- 80.- Patent RFA # 2241390.
- 81.- Pelczar, J.M.; Reid, D.R. and Chan, S.C.E. 1979. Microbiology. 4th. Edition. Mc. Graw Hill.

- 82.- Phillips, R.S.; Krishnamurthy, R. and Von Tersch, R.L. 1989  
Synthesis of L-tyrosine from phenol and S-(o-nitrophenyl)-L-  
cysteine catalysed by tyrosine phenol lyase. Enzyme  
Microbiol. Technol. 11: 80-83.
- 83.- Pras, N. 1989. Kinetic aspects of the bioconversion of  
L-tyrosine into L-DOPA by cells of Mucuna pruriens L.  
Entrapped in different matrices. Biotech. and Bioengin.  
34: 214-222.
- 84.- Raibaud, O. and Goldberg, M.E. 1977. Eur. J. Biochem. 73:  
73:591-599.
- 85.- Ramachandran, P.A. 1974. J.Appl. Chem. Biotech. 24: 265.
- 86.- Riccardi, G.; Sora, S. and Ciferri, O. 1981. Production  
of aminoacids by analog-resistant mutants of the  
Cyanobacterium Spirulina platensis". J. of Bacteriology  
143 (3): 1002-1007.
- 87.- Rodríguez, M.J.; Tysichnaya, I.V. and Yakovleva, B.I.1983.  
Sintesis de tirosina por células inmovilizadas de bacterias.  
Conferencias y tesis del cuarto Symposium Nacional de  
ingeniería enzimática. Obtención y empleo de  
biocatalizadores. Kiev, URSS. (Russ).
- 88.- Rodríguez, M.J.; Tysichnaya, I.V.; Nguan Tji Tju Vin;  
Yakovleva, V.I and Berezin, I.V. 1989. Obtención  
fermentativa de L-tirosina por células de bacterias  
inmovilizadas en carragenina. Tesis y conferencia sobre la  
obtención de aminoácidos. Erevan. (Russ).

- 89.- Rodríguez, M.J. 1989. Curso Biotecnología y ciencia de las enzimas. Noviembre 13-17 . Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro.
- 90.- Rodríguez, M.J.; Tsyachnaya, I.V.; Yakovleva, V.I. and Berezin, I.V. 1986. Some kinetic regularities of tyrosin synthesis catalized by free and immobilized bacterial cells. Effect of mass transfer of reactants on the kinetics of tyrosine phenol-lyase. Academia de Ciencias de la URSS. Bioquímica y Microbiología Aplicada. 51: 1763-1775. (Russ).
- 91.- Rodríguez, M.J.; Garza, G.Y. y Zamudio, M.R. 1989. Influencia del tolueno en el proceso de difusión que se presenta en células de E.coli-50 que catalizan la reacción aspartatoamoniocoliase. Memorias del III Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Monterrey, N.L. Méx. Sept.
- 92.- Rodríguez, M.J.; Cortés, P.C.J. y Garza, G.Y. 1991. Desarrollo de la actividad TFL en cepas de C.intermedius con la finalidad de obtener un biocatalizador para la síntesis del aminoácido L-tirosina. Memorias del IV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Mérida, Yuc. Méx. Sep. 8-12.
- 93.- Rodríguez, M.J. y Cortés, P.C.J. 1991. Determinación de las condiciones óptimas de la reacción TFL catalizada por células de C.intermedius en la síntesis del aminoácido L-tirosina. Memorias del IV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Mérida, Yuc. Méx. Septiembre 8-12.

- 94.- Rothfield, L. and Finkelstein, A. 1968. Ann.Rev.Microbiol. 21: 417.
- 95.- Salton, M.R.Y. 1967. Ann.Rev.Microbiol. 21: 417.
- 96.- Samejima, H. 1974. Recent trends of enzyme engineering in Japan. Enzyme Engineering. 2:363-367; Plenum Press N.Y. London.
- 97.- Samejima, H. and Kimura, K. 1980. Enzyme engineering in the Japanese food industry. Food process engineering, Enzyme engineering in food processing 2:40-46. Appl.Science Published LTD, London.
- 98.- Saunders K.B. and D'Amore P.A. 1988. The receptor for acidic fibroblast growth factor (GFGF) is phosphorylated on tyrosine. Journal of Cell Biology.107(6) part 3, Dec. 1988, pp.274a.
- 99.- Scheider, L.W. 1983. Nutrición, conceptos básicos y aplicaciones. Mc.Graw Hill.
- 100.- Schirch, L. and Mason, M. 1962. J.Biol. Chem. 237: 2578-2581.
- 101.- Shetty, K.; Crawford, L.D. and Porretto L.A. 1986. Production of L-phenylalanine from starch by analog-resistant mutants of Bacillus polymixa. Appl. and Enviromental Microbiology. 52 (4): 637-643.
- 102.- Shuler, M.L.; Tsuchiya, M. and Aris, R. 1973. J. Theor. Biol. 41: 347-356.

- 103.- Skryabin, G.K. and Golableva, L.A. 1976. Utilización de microorganismos en la síntesis orgánica. Ed. M.Ciencias. (Russ).
- 104.- Snell, E.E. 1958. Vitamins, Hormones. 16, 77.
- 105.- Solomos, T.W.G. 1976. Química Orgánica. Ed. Limusa.
- 106.- Stein, W.D. 1967. The movement of molecule across cell membranes. Academic Press. N.Y.
- 107.- Suishev, V.A.; Tysichnaya, I.V.; Yakovleva, V.I.; Kupletskaya, M.B. and Berezin I.V. 1980. Facultad de Química, Academia de Ciencias de la URSS. (Russ).
- 108.- Sysev, V.A.; Tysichnaya, I.V.; Yakouleva, V.I.; Kupletskaya, M.B. and Berezin, I.V. 1980. Isolation, purification and some properties of tyrosine-phenol-lyase from Citrobacter freundii cells. Academia de Ciencias de la URSS. 45: 889-896.
- 109.- Tysichnaya, I.V.; Voivodov, K.I.; Rodríguez, M.J.; Ryabokon, A.M. and Yakovleva, V.I. 1984. Síntesis de L-tirosina y 3,4-dihidrofénilalanina (DOPA) con células libres e inmovilizadas de Citrobacter freundii. 16° Encuentro de la Federación de Sociedades Bioquímicas de Europa. (FEBS). Moscú, URSS. June. (Russ).

- 110.- Tysichnaya, I.V.; Rodríguez, M.J.; Yakovleva, V.I. and Berezin, I.V. 1986. Some kinetic regularities' of tyrosine synthesis catalyzed by free and immobilized bacterial cells. Effect of mass transfer of reactants on the kinetics of tyrosine-phenol-lyase. Academia de Ciencias de la URSS. Bioquímica. 51(11). (Russ).
- 111.- Tysichnaya, I.V.; Rodríguez, M.J.; Bairodov; Yakovleva, I.V. 1981. Métodos de obtención de L-tirosina y L-3,4 dioxifenilalanina. Academia de Ciencias de la URSS. Bioquímica y Microbiología. XVII (5): 645-659. (Russ).
- 112.- Tysichnaya, I.V.; Yakovleva, V.I.; Kupletskaya, M.B. and Berezin V.I. 1979. A kinetic study of tyrosine synthesis in in the tyrosine phenol-lyase reaction catalyzed by the cell of Citrobacter freundii. Bioquímica. 44(12):2201-2207 (Russ).
- 113.- Ueno, T.; Fukami, H.; Ohkishi, H.; Kumagai H. and Yamada H. 1970. Biochem. Biophys. Acta. 206: 476-479.
- 114.- Van Alphen, Z.; Verkleij, A.; Lednissen-Bijvelt, J. and Lugtenberg, B. 1978. J.Bacteriol. 134 (3): 1089-1098.
- 115.- Varfolomeev, S.D.; Sudina, G.F.; Safonov, M.S. and Berezin I.V. 1978. Simposium de la Academia de Ciencias de la URSS. 224 (3): 789-792. (Russ).

- 116.- Voivodov, K.I.; Zueva, N.N.; Yakovleva, V.I. and Berezin, I.V. 1987. Kinetic study of the synthesis of 3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine by cells of Citrobacter freundii immobilized in carrageenan. Appl. Bioch. and Micro. 23 (2): 164-170.
- 117.- Voivodov, K.I.; Tsyachnaya, I.V.; Gubnitskii, L.S.; Yakovleva, V.I. and Berezin, I.V. 1985. Enzymatic synthesis of 3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine by free and immobilized cell of Citrobacter freundii". Appl. Biochem. and Microbiology. 21 (2): 127-131.
- 118.- Watanable, T. and Snell, E.E. 1972. Prot. Nat. Acad. Sci. USA. 69 (5): 1086-1090.
- 119.- Watson, J.V.; Chamber, S.H.; Workman, P. and Horsnell, T.S. 1977. FEBS Letts. 81 (1): 179-182.
- 120.- Whitaker, R.J. 1990. Course Protein and catalytic natural of enzymes. September. SEP, ITC, México.
- 121.- Wiseman, A. and Gould, B.J. 1971. Enzymes, their nature and role. Hutchinson Educational, London.
- 122.- Yamada, H.; Kumaga, H.; Matsui, H.; Ohgishi, H. and Ogata K. 1968. Biochem. Biophys. Res. Commun. 33: 10-14.
- 123.- Yamada, H.; Kumagai, H.; Kashima, N.; Torii, H.; Enei, H. and Okumura, S. 1972. Biochem. Biophys. Res. Commun. 46(2): 370-374.

- 124.- Yamada, H. 1977. Biotech. and Bioeng. 19 (11): 1563-1621.
- 125.- Yamada, H.; Kumagai, H. 1978. Pure and Appl.Chem. 50(9-10): 1117-1127.
- 126.- Yamaguchi, K.; Tokoro, Y.; Oshima, K.; Tanaka, K. and Suzuki T. 1973. Agr. Biol. Chem. 37 (9): 2189-2190.
- 127.- Yoshida, H.; Kumagai, H. and Yamada, H. 1974. Agr. Biol. Chem. 38 (2): 2073-2079.
- 128.- Ziehr, H.; Kula, M.; Schmidt, E.; Wandrey, C. and Klein S. 1987. Continuos production of L-phenylalanine by transamination. Biotech. Bioeng. XXIX: 482-487.
- 129.- Zueva, N.N. 1982. Síntesis del ácido L-aspártico con ayuda de aspartasa en sistemas biocatalíticos heterogeneos. Facultad de Química, Universidad Estatal de Moscú. URSS. (Russ).
- 130.- Zueva, N.N; Shervakova, V.N.; Yakovleva, V.I.; Avsiuk, I.V. and Berezin I.V. 1980. Facultad de Química, Universidad Estatal de Moscú. URSS. (Russ).