

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
División de Estudios de Postgrado



Caracterización cinética de la reacción tirosinfenoliasa  
catalizada por células libres e inmovilizadas de  
Citrobacter freundii para la síntesis del aminoácido  
L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA).

## TESIS

Que como requisito parcial para obtener el grado de

**DOCTOR EN CIENCIAS**  
**CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA**

Presenta:

**M.C. GERARDO DE JESUS SOSA SANTILLAN**

San Nicolás de los Garza, N. L.

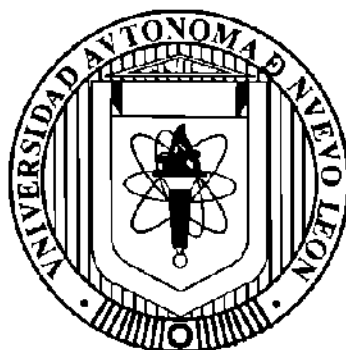
Julio de 2001

TD  
QR92  
.A6  
S6  
2001  
c.1



1080124443

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



CARACTERIZACION CINETICA DE LA REACCION  
TIROSINFENOLIASA CATALIZADA POR CELULAS LIBRES E  
INMOVILIZADAS DE *Citrobacter freundii* PARA LA SINTESIS  
DEL AMINOACIDO L-3,4- DIHIDROXIFENILALANINA  
(L-DOPA).

TESIS

*Que como requisito parcial para obtener el grado de*

DOCTOR EN CIENCIAS  
CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA

*Presenta*

M.C. GERARDO DE JESUS SOSA SANTILLAN

San Nicolás de los Garza, N.L.

Julio de 2001

TD  
QR92  
.A6  
S6  
2001



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**

**CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE LA REACCIÓN TIROSINFENOLIASA CATALIZADA POR  
CÉLULAS LIBRES E INMOVILIZADAS DE *Citrobacter freundii* PARA LA SÍNTESIS DEL  
AMINOÁCIDO L-3,4-DIHIDROXIFENILALANINA (L-DOPA).**

**TESIS**

*Que como requisito parcial  
Para obtener el grado de*

**DOCTOR EN CIENCIAS  
CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGÍA**

**Presenta**

**M.C. GERARDO DE JESÚS SOSA SANTILLÁN**

**COMITÉ DE TESIS**

---

**DRA. NORMA LAURA HEREDIA ROJAS  
PRESIDENTE (DIRECTOR INTERNO)**

---

**DR. CARLOS E. HERNÁNDEZ LUNA  
SECRETARIO**

---

**Ph.D. JESÚS RODRÍGUEZ MARTÍNEZ  
1<sup>er</sup> VOCAL (DIRECTOR EXTERNO)**

---

**DR. J. SANTOS GARCÍA ALVARADO  
2<sup>o</sup> VOCAL**

---

**DRA. LETICIA A. HAUAD MARROQUIN  
3<sup>er</sup> VOCAL**

## ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
INTRODUCCIÓN.....	5
IMPORTANCIA DEL ESTUDIO.....	7
JUSTIFICACIÓN.....	8
OBJETIVOS.....	9
HIPÓTESIS.....	10

## ANTECEDENTES

GENERALIDADES SOBRE LA PRODUCCIÓN DE AMINOÁCIDOS.....	11
Importancia de los Aminoácidos.....	11
Métodos de Obtención y Producción de Aminoácidos.....	15
Inmovilización de Células y Enzimas.....	27
PAPEL DE LA L-DOPA EN EL TRATAMIENTO DEL MAL DE PARKINSON....	32
Metabolismo de Dopaminas.....	32
Características de la L-DOPA.....	35
PROPIEDADES Y MECANISMO DE ACCIÓN DE LA TFL.....	42
Propiedades de la Tirosinfenoliasa (TFL).....	42

Mecanismo de Acción de la Tirosinfenoliasa.....	53
Distribución de la Tirosinfenoliasa en Microorganismos.....	57
Uso de la Tirosinfenoliasa para la Síntesis de Tirosina y L-DOPA.....	58

## METODOLOGÍA

FUENTE DE ENZIMA.....	65
CONSERVACIÓN Y PROPAGACIÓN DE LAS CÉLULAS DE <i>C. freundii</i> .....	65
DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA CELULAR.....	66
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	66
ESTUDIO CINÉTICO DE LA REACCIÓN DE SÍNTESIS DE L-DOPA UTILIZANDO CÉLULAS LIBRES DE <i>C. freundii</i> CON ACTIVIDAD TFL.....	67
Estudio de la Influencia de la Temperatura Sobre la Reacción de Síntesis de L-DOPA Catalizada por Células Libres de <i>C. freundii</i> con Actividad TFL.....	68
Estudio de la Influencia del pH Sobre la Reacción de Síntesis de L-DOPA Catalizada por Células Libres de <i>C. freundii</i> con Actividad TFL.....	69
Estudio de la Influencia de la Concentración de Catecol, Piruvato de Sodio y Acetato de Amonio Sobre la Reacción de Síntesis de L-DOPA Catalizada por Células Libres de <i>C. freundii</i> con Actividad TFL.....	70
Estudio de la Influencia de la Cantidad de Catalizador Sobre la Reacción de Síntesis de L-DOPA Catalizada por Células Libres de <i>C. freundii</i> con Actividad TFL.....	72
DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	73
INMOVILIZACIÓN DE LAS CÉLULAS DE <i>C. freundii</i> CON ACTIVIDAD TFL EN GEL DE $\kappa$ -CARRAGENINA Y EN GEL DE ALCOHOL POLIVINÍLICO (PVA)...	75



Inmovilización de las Células de <i>C. freundii</i> en Gel de $\kappa$ -carragenina.....	76
Inmovilización de las Células de <i>C. freundii</i> en Gel de Alcohol Polivinílico.....	77
Estudio Sobre la Capacidad de Retención de las Células por Parte de los Diferentes Soportes Empleados para la Inmovilización.....	79
Influencia de la Concentración de Carragenina Sobre la Actividad Enzimática de las Células de <i>C. freundii</i> con Actividad TFL en la Reacción de Síntesis de L-DOPA.....	79
Influencia del Tamaño de Gránulo Sobre la Actividad Enzimática de las Células de <i>C. freundii</i> con Actividad TFL en la Reacción de Síntesis de L-DOPA.....	80
ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA, EL pH Y LA CONCENTRACIÓN DE LOS SUSTRATOS SOBRE LA REACCIÓN DE SÍNTESIS DE L-DOPA UTILIZANDO CÉLULAS DE <i>C. freundii</i> CON ACTIVIDAD TFL INMOVILIZADAS EN GEL DE $\kappa$ -CARRAGENINA.....	81

## RESULTADOS

ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA SOBRE LA REACCIÓN DE SÍNTESIS DE L-DOPA CATALIZADA POR CÉLULAS LIBRES DE <i>C. freundii</i> CON ACTIVIDAD TFL.....	83
ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL pH SOBRE LA REACCIÓN DE SÍNTESIS DE L-DOPA CATALIZADA POR CÉLULAS LIBRES DE <i>C. freundii</i> CON ACTIVIDAD TFL.....	85
ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE CATECOL, PIRUVATO DE SODIO Y ACETATO DE AMONIO SOBRE LA REACCIÓN DE	

SÍNTESIS DE L-DOPA CATALIZADA POR CÉLULAS LIBRES DE <i>C. freundii</i> CON ACTIVIDAD TFL.....	87
ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE BIOCATALIZADOR SOBRE LA REACCIÓN DE SÍNTESIS DE L-DOPA CATALIZADA POR CÉLULAS LIBRES DE <i>C. freundii</i> CON ACTIVIDAD TFL..	94
INMOVILIZACIÓN DE LAS CÉLULAS DE <i>C. freundii</i> CON ACTIVIDAD TFL EN GEL DE $\kappa$ -CARRAGENINA Y EN GEL DE ALCOHOL POLIVINÍLICO (PVA)...	97
INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE $\kappa$ -CARRAGENINA SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LAS CÉLULAS DE <i>C. freundii</i> CON ACTIVIDAD TFL EN LA REACCIÓN DE SÍNTESIS DE L-DOPA.....	99
INFLUENCIA DEL TAMAÑO DE GRÁNULO SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LAS CÉLULAS DE <i>C. freundii</i> CON ACTIVIDAD TFL EN LA REACCIÓN DE SÍNTESIS DE L-DOPA.....	100
ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA, EL pH Y LA CONCENTRACIÓN DE SUSTRATOS SOBRE LA REACCIÓN DE SÍNTESIS DE L-DOPA CATALIZADA POR CÉLULAS DE <i>C. freundii</i> CON ACTIVIDAD TFL INMOVILIZADAS EN GEL DE $\kappa$ -CARRAGENINA.....	102

## DISCUSIÓN

ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA SOBRE LA REACCIÓN DE SÍNTESIS DE L-DOPA CATALIZADA POR CÉLULAS LIBRES DE <i>C. freundii</i> CON ACTIVIDAD TFL.....	108
---	-----

ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL pH SOBRE LA REACCIÓN DE SÍNTESIS DE L-DOPA CATALIZADA POR CÉLULAS LIBRES DE <i>C. freundii</i> CON ACTIVIDAD TFL.....	109
ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE CATECOL, PIRUVATO DE SODIO Y ACETATO DE AMONIO SOBRE LA REACCIÓN DE SÍNTESIS DE L-DOPA CATALIZADA POR CÉLULAS LIBRES DE <i>C. freundii</i> CON ACTIVIDAD TFL.....	111
ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE BIOCATALIZADOR SOBRE LA REACCIÓN DE SÍNTESIS DE L-DOPA CATALIZADA POR CÉLULAS LIBRES DE <i>C. freundii</i> CON ACTIVIDAD TFL.....	114
INMOVILIZACIÓN DE LAS CÉLULAS DE <i>C. freundii</i> CON ACTIVIDAD TFL EN GEL DE $\kappa$ -CARRAGENINA Y EN GEL DE ALCOHOL POLIVINÍLICO (PVA).....	115
INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE $\kappa$ -CARRAGENINA SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LAS CÉLULAS DE <i>C. freundii</i> CON ACTIVIDAD TFL EN LA REACCIÓN DE SÍNTESIS DE L-DOPA.....	116
INFLUENCIA DEL TAMAÑO DE GRÁNULO SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LAS CÉLULAS DE <i>C. freundii</i> CON ACTIVIDAD TFL EN LA REACCIÓN DE SÍNTESIS DE L-DOPA.....	118
ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA, EL pH Y LA CONCENTRACIÓN DE SUSTRATOS SOBRE LA REACCIÓN DE SÍNTESIS	

DE L-DOPA CATALIZADA POR CÉLULAS DE <i>C. freundii</i> CON ACTIVIDAD TFL INMOVILIZADAS EN GEL DE $\kappa$ -CARRAGENINA.....	119
CONCLUSIONES.....	122
REFERENCIAS.....	124

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Regulación de la vía de síntesis de aminoácidos aromáticos en <i>Escherichia coli</i> .....	22
Figura 2. Principales vías de degradación de levodopa y dopamina.....	34
Figura 3. Reacción de $\alpha$ - $\beta$ eliminación catalizada por tirosinfenoliasa.....	43
Figura 4. Reacción de síntesis de L-DOPA catalizada por tirosinfenoliasa.....	44
Figura 5. Representación generalizada de la secuencia a seguir en el estudio cinético de la reacción de síntesis de L-DOPA utilizando como catalizadores células de <i>Citrobacter freundii</i> con actividad tirosinfenoliasa.....	74
Figura 6. Influencia de la temperatura sobre la velocidad inicial en la reacción de síntesis de L-DOPA catalizada por células libres de <i>C. freundii</i> con actividad TFL.....	84
Figura 7. Cinética de formación de L-DOPA en la reacción de síntesis catalizada por células libres de <i>C. freundii</i> con actividad TFL bajo diferentes condiciones de temperatura.....	84
Figura 8. Influencia del pH sobre la velocidad inicial en la reacción de síntesis de L-DOPA catalizada por células libres de <i>C. freundii</i> con actividad TFL.....	86
Figura 9. Cinética de formación de L-DOPA en la reacción de síntesis catalizada por células libres de <i>C. freundii</i> con actividad TFL bajo diferentes condiciones de pH.....	86

Figura 10. Influencia de la concentración de catecol sobre la velocidad inicial en la reacción de síntesis de L-DOPA catalizada por células libres de <i>C. freundii</i> con actividad TFL.....	89
Figura 11. Cinética de formación de L-DOPA en la reacción de síntesis catalizada por células libres de <i>C. freundii</i> con actividad TFL a diferentes concentraciones de catecol.....	89
Figura 12. Gráfica de Lineweaver-Burk para la determinación de $K_m$ y $V_{max}$ para catecol.....	90
Figura 13. Influencia de la concentración de piruvato de sodio sobre la velocidad inicial en la reacción de síntesis de L-DOPA catalizada por células libres de <i>C. freundii</i> con actividad TFL.....	91
Figura 14. Cinética de formación de L-DOPA en la reacción de síntesis catalizada por células libres de <i>C. freundii</i> con actividad TFL a diferentes concentraciones de piruvato de sodio.....	91
Figura 15. Gráfica de Lineweaver-Burk para la determinación de $K_m$ y $V_{max}$ para piruvato de sodio.....	92
Figura 16. Influencia de la concentración de acetato de amonio sobre la velocidad inicial en la reacción de síntesis de L-DOPA catalizada por células libres de <i>C. freundii</i> con actividad TFL.....	93
Figura 17. Cinética de formación de L-DOPA en la reacción de síntesis catalizada por células libres de <i>C. freundii</i> con actividad TFL a diferentes concentraciones de acetato de amonio.....	93
Figura 18. Gráfica de Lineweaver-Burk para la determinación de $K_m$ y $V_{max}$ para acetato de amonio.....	94

Figura 19. Influencia de la concentración de biocatalizador sobre la velocidad inicial en la reacción de síntesis de L-DOPA catalizada por células libres de <i>C. freundii</i> con actividad TFL.....	96
Figura 20. Cinética de formación de L-DOPA en la reacción de síntesis catalizada por células libres de <i>C. freundii</i> con actividad TFL a diferentes concentraciones de biocatalizador.....	96
Figura 21. Porcentaje de proteína celular retenida a diferentes concentraciones de carragenina utilizada como soporte para la inmovilización en función del tiempo.....	98
Figura 22. Porcentaje de proteína celular retenida a diferentes concentraciones de PVA utilizado como soporte para la inmovilización en función del tiempo....	98
Figura 23. Influencia de la concentración de carragenina empleada para la inmovilización sobre la velocidad inicial en la síntesis de L-DOPA catalizada por células inmovilizadas de <i>C. freundii</i> .....	100
Figura 24. Influencia del tamaño de gránulo sobre la velocidad inicial en la síntesis de L-DOPA catalizada por células inmovilizadas de <i>C. freundii</i> .....	101
Figura 25. Influencia de la temperatura sobre la velocidad inicial en la reacción de síntesis de L-DOPA catalizada por células de <i>C. freundii</i> con actividad TFL inmovilizadas en carragenina.....	104
Figura 26. Influencia del pH sobre la velocidad inicial en la reacción de síntesis de L-DOPA catalizada por células de <i>C. freundii</i> con actividad TFL inmovilizadas en carragenina.....	104

Figura 27. Influencia de la concentración de catecol sobre la velocidad inicial en la reacción de síntesis de L-DOPA catalizada por células de <i>C. freundii</i> con actividad TFL inmovilizadas en carragenina.....	106
Figura 28. Influencia de la concentración de piruvato de sodio sobre la velocidad inicial en la reacción de síntesis de L-DOPA catalizada por células de <i>C. freundii</i> con actividad TFL inmovilizadas en carragenina.....	106
Figura 29. Influencia de la concentración de acetato de amonio sobre la velocidad inicial en la reacción de síntesis de L-DOPA catalizada por células de <i>C. freundii</i> con actividad TFL inmovilizadas en carragenina.....	107



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Efecto de la temperatura sobre la constante de Michaelis para L-tirosina.....	45
Tabla 2. Efecto de los cationes sobre la actividad tirosinfenoliasa.....	46
Tabla 3. Inhibición de la tirosinfenoliasa por aminoácidos.....	49
Tabla 4. Formación de piruvato a partir de varios aminoácidos por tirosinfenoliasa.....	49
Tabla 5. Síntesis biológica de aminoácidos fenólicos catalizada por tirosinfenoliasa de diferentes fuentes.....	58
Tabla 6. Influencia de la temperatura sobre la reacción de síntesis de L-DOPA catalizada por células de <i>C. freundii</i> con actividad TFL.....	83
Tabla 7. Influencia del pH sobre la reacción de síntesis de L-DOPA catalizada por células de <i>C. freundii</i> con actividad TFL.....	87
Tabla 8. Influencia de la concentración de catecol sobre la reacción de síntesis de L-DOPA catalizada por células de <i>C. freundii</i> con actividad TFL.....	88
Tabla 9. Influencia de la concentración de piruvato de sodio sobre la reacción de síntesis de L-DOPA catalizada por células de <i>C. freundii</i> con actividad TFL.....	90

Tabla 10. Influencia de la concentración de acetato de amonio sobre la reacción de síntesis de L-DOPA catalizada por células de <i>C. freundii</i> con actividad TFL.....	95
Tabla 11. Influencia de la concentración de biocatalizador sobre la reacción de síntesis de L-DOPA catalizada por células de <i>C. freundii</i> con actividad TFL.....	95
Tabla 12. Porcentaje de inmovilización de las células de <i>C. freundii</i> con respecto al tiempo para cada concentración de carragenina probada.....	97
Tabla 13. Porcentaje de inmovilización de las células de <i>C. freundii</i> con respecto al tiempo para cada concentración de PVA probada.....	99
Tabla 14. Influencia de la concentración de carragenina sobre la actividad enzimática TFL en la síntesis de L-DOPA.....	99
Tabla 15. Influencia del tamaño de gránulo sobre la actividad enzimática TFL en la síntesis de L-DOPA.....	101
Tabla 16. Influencia de la temperatura sobre la reacción de síntesis de L-DOPA catalizada por células de <i>C. freundii</i> con actividad TFL inmovilizadas en $\kappa$ -carragenina.....	102
Tabla 17. Influencia del pH sobre la reacción de síntesis de L-DOPA catalizada por células de <i>C. freundii</i> con actividad TFL inmovilizadas en $\kappa$ -carragenina.....	103
Tabla 18. Influencia de la concentración de catecol sobre la reacción de síntesis de L-DOPA catalizada por células de <i>C. freundii</i> con actividad TFL inmovilizadas en $\kappa$ -carragenina.....	103

<b>Tabla 19. Influencia de la concentración de piruvato de sodio sobre la reacción de síntesis de L-DOPA catalizada por células de <i>C. freundii</i> con actividad TFL inmovilizadas en <math>\kappa</math>-carragenina.....</b>	<b>105</b>
<b>Tabla 20. Influencia de la concentración de acetato de amonio sobre la reacción de síntesis de L-DOPA catalizada por células de <i>C. freundii</i> con actividad TFL inmovilizadas en <math>\kappa</math>-carragenina.....</b>	<b>105</b>

## RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo la caracterización cinética de la reacción de síntesis de L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) catalizada por células libres e inmovilizadas de *Citrobacter freundii* con actividad tirosinfenoliasa (TFL). Esta investigación estuvo orientada al desarrollo de biocatalizadores fundamentados en células de microorganismos para la obtención de aminoácidos de interés económico, siendo la L-DOPA de gran importancia por su amplio uso como medicamento para el tratamiento del Mal de Parkinson.

Se establecieron las condiciones óptimas de la reacción de síntesis del aminoácido en reactores tipo batch utilizando como catalizador células libres e inmovilizadas de *C. freundii*. Se determinó que para ambos casos las condiciones eran las mismas, siendo éstas las siguientes: temperatura, 30°C; pH, 7.5; concentración de catecol, 0.075 M; concentración de piruvato de sodio, 0.15 M, acetato de amonio, 0.60 M; concentración de catalizador, 1.63 mg por mL de mezcla reaccionante.

En base a este estudio se calcularon las constantes de Michaelis aparentes y la velocidad máxima para cada uno de los tres sustratos de la reacción.

Para el caso de la inmovilización de las células, se probaron dos soportes:  $\kappa$ -carragenina y alcohol polivinílico (PVA), encontrándose que bajo las condiciones estudiadas el primero de ellos era el más idóneo; en este sentido, una concentración de carragenina de entre el 3 y el 4% resultó ser la más adecuada para la inmovilización de *C. freundii*.

El presente trabajo de investigación dio origen a diversas ponencias presentadas en los siguientes eventos de índole académica:

- 99<sup>th</sup> General Meeting de la American Society for Microbiology. Chicago, USA. 1999.
- VIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y IV Congreso Latinoamericano de Biotecnología y Bioingeniería. Huatulco, México. 1999. (dos ponencias).
- XXII Encuentro Nacional de la Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química, A.C. (AMIDIQ). Mazatlán, México. 2001.
- 101<sup>st</sup> General Meeting de la American Society for Microbiology. Orlando, USA. 2001.

Esta investigación fue desarrollada con el apoyo brindado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), el Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León y el Departamento de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila.

## ABSTRACT

The present work had as objective to characterize kinetically the reaction of synthesis of L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) catalyzed by free and immobilized *Citrobacter freundii* cells with tyrosine phenol-lyase (TPL) activity. This investigation was guided to the development of biocatalyst based in cells of microorganisms for the obtaining of amino acids of economic interest, being the L-DOPA of great importance for the wide use like medication for the treatment of Parkinson's disease.

It was established optimal conditions for the reaction of synthesis of the amino acid in batch reactors using free and immobilized *C. freundii* cells as catalyst. It was determined that for both cases the conditions were the same, being these the following: temperature, 30<sup>0</sup>C; pH, 7.5; catechol concentration, 0.075 M; sodium pyruvate concentration, 0.15 M; ammonium acetate concentration, 0.60 M; catalyst concentration, 1.63 mg/mL of reaction mixture.

Based in this study, were calculated the apparent Michaelis constants and the maximum velocities for each one of the three substrates of the reaction.

For the case of cell immobilization, two supports were proven:  $\kappa$ -carrageenan and poly(vinyl alcohol) (PVA), being that under the studied condition the first of them was the most suitable; in this sense, a concentration

of carrageenan between 3 and 4% it turned out to be the more appropriate for the *C. freundii* immobilization.

The present work from investigation gave origin to diverse report presented in the following events of academic nature:

- 99<sup>th</sup> General Meeting of the American Society for Microbiology (ASM). Chicago, U.S.A. 1999.
- VIII National Congress of Biotechnology and Bioengineering and IV Latin American Congress of Biotechnology and Bioengineering. Huatulco, Mex. 1999. (Two reports).
- XXII National Encounter of the Mexican Academy of Investigation and Docent in Chemical Engineering (AMIDIQ). Mazatlán, Mex. 2001.
- 101<sup>st</sup> General Meeting of the American Society for Microbiology (ASM). Orlando, U.S.A. 2001.

This investigation was developed with the support offered by the National Council of Science and Technology (CONACyT) in Mexico, the Laboratory of Biochemistry and Genetics of Microorganisms of the Faculty of Biological Science of the Autonomous University of Nuevo León, Mexico, and the Department of Biotechnology of the Faculty of Chemical Science of the Autonomous University of Coahuila, Mexico.

## INTRODUCCIÓN

En los últimos 20 años se ha desarrollado intensamente a nivel mundial la producción de aminoácidos para uso medicinal, industria pecuaria, alimenticia y farmacéutica. Por ello, es de gran importancia la búsqueda de nuevos y más eficaces métodos para la síntesis de aminoácidos, en particular de la forma L-, ya que es la forma biológicamente activa.

Un método adecuado para la obtención de aminoácidos es la síntesis enzimática. Las enzimas superan notablemente a los catalizadores químicos utilizados por el hombre; y las razones de éxito pueden resumirse por su alta especificidad, eficiencia catalítica y capacidad de activación en condiciones suaves de temperatura y pH; el producto se obtiene además con un alto rendimiento y grado de pureza y en forma selectiva el isómero L-.

El uso de enzimas en la industria es un ejemplo de aplicación tecnológica que ha impactado de manera extraordinaria en las industrias farmacéutica y alimenticia, y que a largo plazo tendrá repercusiones muy importantes en los campos del petróleo, hule y plásticos. Uno de los campos en los que el uso de enzimas ha tenido un amplio desarrollo es el de la producción de



aminoácidos; a nivel mundial se tiene una gran producción enzimática de alanina, lisina, treonina, aspartato, fenilalanina, metionina y glutamato.

La tirosinfenoliasa (TFL; E.C. 4.1.99.2) es una enzima que está ampliamente distribuida entre los microorganismos y se sabe que *Citrobacter freundii* y *Erwinia herbicola* la producen en niveles altos. Esta enzima cataliza una serie de reacciones de  $\alpha,\beta$ -eliminación,  $\beta$ -sustitución y racemización. La tirosinfenoliasa cataliza la degradación de tirosina a piruvato, fenol y amonio. En 1975 se determinó que las reacciones de  $\alpha,\beta$ -eliminación eran reversibles y en el caso particular de tirosina y sus análogos, el equilibrio aparente tiende hacia la dirección de síntesis del aminoácido cuando están presentes grandes cantidades de fenol, piruvato y amonio. Esta misma enzima cataliza la reacción de síntesis de L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) si el fenol es sustituido por catecol. La TFL ha sido utilizada para la síntesis de L-tirosina o L-DOPA.

La L-3,4-dihidroxifenilalanina es utilizada en el tratamiento del mal de Parkinson. Este aminoácido es el precursor inmediato de la dopamina, un neurotransmisor esencial en el sistema nervioso central. La L-DOPA, como tal, es prácticamente inerte desde el punto de vista farmacológico; por tanto, sus efectos biológicos se deben al producto de su descarboxilación, la dopamina. En el paciente con parkinsonismo, la levodopa disminuye la bradicinesia, rigidez, temblor y depresión mental. El alivio en las manifestaciones más importantes del Mal de Parkinson se acompaña de una mejoría proporcional en las alteraciones en la expresión facial, habla, escritura, deglución, respiración y de las funciones mentales.

En México la L-DOPA se encuentra principalmente bajo cuatro presentaciones comerciales, todas ellas de importación: Larodopa® (Laboratorios Roche); Madopar® (levodopa y bencerazida, Laboratorios Roche); Racovel® (levodopa y carbidopa, Laboratorios Cryopharma); y Sinemet® (levodopa y carbidopa, Laboratorios Prosalud).

### **IMPORTANCIA DE ESTE ESTUDIO.**

De acuerdo con la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) México ocupa el sitio 37 de 44 países clasificados respecto al desarrollo científico, por lo que continua la importación de tecnología, equipos y bienes de capital costosos y obsoletos del extranjero, que significan una fuga de divisas calculada por el Banco de México en alrededor del uno por ciento del Producto Interno Bruto (PIB).

La importancia de esta investigación se relaciona con las repercusiones en el contexto regional y nacional, ya que permitirá desarrollar tecnología propia a nivel nacional, enfocada a la producción de L-aminoácidos. Además, se generará el conocimiento teórico-práctico sobre el uso de microorganismos en procesos biotecnológicos contribuyendo así al enriquecimiento del conocimiento de la microbiología aplicada, lo que, en retroalimentación, permitirá a su vez optimizar y eficientizar dichos procesos. Además, los métodos de producción de biomoléculas utilizando enzimas o

células de microorganismos reducen la inversión de capital total y los costos de operación con respecto a los métodos tradicionales.

## **JUSTIFICACIÓN.**

En el Departamento de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila, se ha realizado investigación pionera en México en el estudio cinético de la síntesis enzimática de aminoácidos. Estas investigaciones permiten plantear la posibilidad de utilizar células de *Citrobacter freundii* como catalizador para la síntesis del aminoácido L-3,4-dihidroxifenilalanina a partir de catecol, amonio y piruvato.

Por otra parte, es de todos conocido que la situación actual del desarrollo industrial lleva consigo el grave problema de la contaminación ambiental. Ante este panorama, una alternativa para disminuir este problema es la introducción de tecnologías limpias. El empleo de células de microorganismos con actividad enzimática tiene una serie de ventajas que pueden contribuir para alcanzar este propósito, motivos que justifican el realizar investigación tendiente a desarrollar tecnología menos dañina para el entorno, esto es, tecnología limpia.

Aunado a lo anterior, existe actualmente una demanda cada vez mayor de aminoácidos en diferentes ramas de la economía mundial. En este contexto la L-3,4-dihidroxifenilalanina es empleada ampliamente en medicina como parte del tratamiento del mal de Parkinson y, en nuestro país, constituye un producto de importación.

## **OBJETIVOS.**

### **OBJETIVO GENERAL.**

Establecer los parámetros fisicoquímicos óptimos de la reacción tirosinfenoliasa para la síntesis de L-DOPA utilizando células libres e inmovilizadas de *Citrobacter freundii* como catalizadores.

### **OBJETIVOS PARTICULARES.**

- 1.- Determinar los parámetros óptimos de la reacción tirosinfenoliasa (temperatura, pH, concentración de sustratos, concentración de biocatalizador) catalizada por células libres de *Citrobacter freundii* para la síntesis de L-DOPA.
- 2.- Determinar las condiciones de inmovilización en gel de  $\kappa$ -carragenina y/o en alcohol polivinílico de las células de *C. freundii* para su uso como biocatalizador en la síntesis de L-DOPA.
- 3.- Determinar los parámetros óptimos de la reacción tirosinfenoliasa (temperatura, pH, concentración de sustratos) catalizada por células inmovilizadas de *C. freundii* para la síntesis de L-DOPA.

## HIPÓTESIS.

La actividad tirosinfenoliasa de las células de *Citrobacter freundii* utilizadas en la síntesis de L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) es influenciada por las condiciones de reacción, por lo que es posible optimizar dicha actividad mediante el establecimiento de las condiciones adecuadas para la síntesis del aminoácido de interés.

## ANTECEDENTES

### GENERALIDADES SOBRE LA PRODUCCIÓN DE AMINOÁCIDOS.

#### Importancia de los Aminoácidos.

Las proteínas son unos de los componentes más importantes y abundantes de cualquier sistema biológico, constituyen la clase de compuestos biológicos de mayor diversidad. Las proteínas justifican la integridad estructural de ciertos organismos, así como la de las enzimas que controlan las funciones vitales<sup>75</sup>. De acuerdo con Alvarez y De la Garza<sup>1</sup>, tradicionalmente se aprecia un alimento en función de su contenido proteínico. Más aún, el precio que tienen los alimentos está frecuentemente basado en dicho parámetro. Sin embargo, no todas las proteínas tienen el mismo valor. Esto está dado por la *composición propia de la proteína*, esto es, el tipo de aminoácidos que la componen.

Del total de 20 aminoácidos que existen en las proteínas, aproximadamente doce de ellos pueden ser sintetizados por el ser humano, es decir, no necesitamos ingerirlos como tales en los alimentos, sino que podemos obtenerlos transformando algún otro componente alimenticio. Sin embargo otros ocho no son sintetizables, y por lo tanto, son esenciales; tienen que estar incluidos en nuestra dieta<sup>96</sup>.

En el caso del ser humano la necesidad de aminoácidos no es tan evidente ya que al ser omnívoro, la dieta no es tan rígida y la gran variedad de ingredientes complementa los desequilibrios aminoacídicos que puedan existir. Sin embargo, en ciertos casos como el de niños con desnutrición avanzada, ancianos, convalecientes, comatosos o inmunocomprometidos se requiere de alimentación parenteral que contenga la totalidad de aminoácidos, por lo menos aquellos que son esenciales o más limitantes. Así, las dietas para regímenes especiales pueden contener: treonina, valina, isoleucina, histidina, metionina, lisina, fenilalanina y triptófano. Estos dos últimos son particularmente escasos en fuentes tradicionales de alimentación de los mexicanos, como es el maíz.

Además de su uso como componente directo en la alimentación, algunos aminoácidos tienen por sí mismos otras aplicaciones. Tal es el caso de fenilalanina, que es empleada para la síntesis de péptidos con propiedades edulcorantes como el aspartame®. Por otro lado, el ácido glutámico (en forma de glutamato monosódico) es ampliamente utilizado, sobre todo en países de Oriente, como potenciador de sabor. Asimismo, se emplea en la síntesis de glutatión, hormona de gran importancia.

Alvarez y De la Garza<sup>1</sup> mencionan que la fenilalanina es un producto que ha adquirido recientemente una gran importancia en el mercado de producción de aminoácidos. Anteriormente fue utilizado en formulación de soluciones nutritivas, pero en los último años se ha incrementado su demanda al utilizarse como materia prima de un grupo de sustancias con poder edulcorante, dentro

de las cuales destaca el éster metílico de la aspartil-fenilalanina, conocido bajo las marcas de Aspartame® o Nutra Sweet®.

La síntesis de los mencionados edulcorantes es totalmente dependiente de la disponibilidad de dicho aminoácido; más aún, sólo la L-fenilalanina produce un péptido con poder edulcorante. Esto obliga a que el proceso de síntesis del aminoácido sea estereoespecífico. Por ello, la mejor manera de obtenerlo es por vía biológica. Las posibilidades de producción que existen son: síntesis química, a partir de fenilacetaldehído hidantoína; por bioconversión o por fermentación con glucosa.

La tecnología para obtener este aminoácido por vía biológica se ha trabajado desde los sesentas. La investigación reciente ha permitido obtener cada vez procesos más rentables y productivos<sup>1, 75</sup>.

Un ejemplo más es la tirosina. Este aminoácido es el precursor inmediato para la síntesis de la dihidroxifenilalanina (DOPA), en este momento uno de los fármacos más empleados en el tratamiento del mal de Parkinson. La arginina se ha utilizado para tratar algunos casos de problemas hepáticos y de esterilidad masculina.

De acuerdo con Quintero<sup>77</sup>, la producción de aminoácidos por procesos biotecnológicos ha sido una de las grandes aportaciones de la biotecnología a la alimentación. Se trata de un sector donde los procesos químicos han sido sustituidos poco a poco por biotecnologías.

Este autor<sup>77</sup>, hace una breve reseña de cómo se dio este proceso. A inicios de este siglo se descubrieron en Japón las propiedades del ácido



glutámico como saborizante, comenzando la producción comercial de glutamato de sodio a partir de hidrolizados ácidos de trigo y proteína de soya. En 1957 se descubrió que *Corynebacterium glutamicum* producía ácido L-glutámico y a partir de ese momento esta bacteria se convirtió en la principal fuente del aminoácido. Este descubrimiento y su explotación comercial tuvieron enorme impacto en la industria de la fermentación japonesa, ocasionando que la mayoría de los procesos de fermentación para la producción de aminoácidos hayan sido desarrollados en ese país.

En el sudeste asiático (Japón, Corea y Taiwan) se encuentran localizados 13 de los 17 mayores productores de aminoácidos a nivel mundial; siendo las empresas japonesas (Ajinomoto, Kyowa Hakko y Tanabe Seiyaku) las de mayor capacidad productiva. En México la empresa Kyowa Hakko tiene una planta productora de L-lisina, treonina y triptófano.

Como resultado de los constantes desarrollos de la biotecnología moderna se espera que la producción de aminoácidos aumente. Entre estos desarrollos se encuentran<sup>77</sup>:

- Aislamiento y construcción (vía ingeniería genética) de cepas hiperproductoras, superiores a las actuales, que han sido obtenidas por métodos de selección de organismos desregulados.
- Procesos combinados de síntesis química, enzimática y microbiana.
- Mejoramiento de los procesos de fermentación: escalamiento óptimo de las condiciones de fermentación y control del proceso.

## **Métodos de Obtención y Producción de Aminoácidos.**

### **Síntesis química.**

Esta alternativa es en nuestros días menos utilizada que las de origen biológico, ya que la complejidad de las estructuras químicas de los aminoácidos son todo un reto para la síntesis orgánica; más aún, la necesidad de que dichos productos sean estructuralmente "L" complica más el proceso de obtención. Sin embargo, existen casos en que no se ha logrado un proceso de tipo biológico eficiente, como en el caso de la metionina; por lo que no puede dejarse de lado la síntesis química<sup>1</sup>.

### **Síntesis enzimática.**

Debido a la complejidad estructural de los aminoácidos, es muy común que la síntesis química total no sea una respuesta adecuada. Sin embargo, una alternativa puede ser la síntesis catalizada por enzimas; esto es, que uno o más de los pasos de transformación sean catalizados por enzimas aisladas<sup>1</sup>.

Empero, para que esta alternativa sea aplicable, se tienen que cumplir con ciertos requisitos como son: que las enzimas que vayan a actuar sean fácilmente aislables y estables en condiciones de producción; que los sustratos de dichas reacciones sean económicos y accesibles y que se puedan lograr con facilidad las condiciones de reacción. Así, no cualquier reacción enzimática puede ser utilizable a nivel productivo.

Un ejemplo en el que se ha logrado lo anterior es la producción de serina a partir de glicina y formaldehído. En este caso se utiliza la enzima serina hidroximetil transferasa de una cepa recombinante de *Klebsiella*<sup>1</sup>.

### Producción microbiana.

La producción de aminoácidos a partir de microorganismos es sin duda el procedimiento más utilizado, y se basa en un principio muy simple: estos seres sintetizan en forma natural aminoácidos a partir de sustratos elementales y en forma muy eficiente. Sin embargo, dichos organismos producen aminoácidos sólo en la medida de sus necesidades. Esto es, para satisfacerse a sí mismos, no a nosotros. Por ello, es necesario "alterar" estas células para que ahora, sin sus controles propios, sinteticen aminoácidos en forma descontrolada. Esto es lo que se conoce como sobreproducción o hiperproducción. Estos fenómenos han sido descritos desde finales de la década de los cincuenta<sup>24</sup>.

Para obtener sistemas sobreproductores, existen varias estrategias que se comentan a continuación<sup>1, 20</sup>.

a) Bacterias que en forma normal excretan aminoácidos. En este caso se encuentran las bacterias que sobreproducen ácido glutámico o aspártico. Existen algunos casos en la naturaleza como lo son *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium lactofermentum* y *Brevibacterium flavum*, las cuales en condiciones limitantes de biotina en el medio de cultivo excretan estos metabolitos. Esto es debido a que al limitarse esta vitamina, la síntesis de lípidos de membrana se ve trastornada, ésta se vuelve porosa y la bacteria es

incapaz de acumular los aminoácidos, los cuales son eliminados al medio tan pronto como se producen.

b) **Biotransformaciones microbianas.** Las biotransformaciones son transformaciones químicas las cuáles son catalizadas por microorganismos o sus enzimas<sup>63</sup>. Las reacciones de biotransformaciones son catalizadas por enzimas producidas por células microbianas y por todo organismo vivo. En su función *natural las enzimas catalizan y controlan las reacciones anabólicas y catabólicas* necesarias para los procesos de la vida tales como bioenergética, crecimiento y replicación. Las enzimas anabólicas, implicadas en las vías biosintéticas, usualmente son sustrato específicas; mientras que muchas enzimas catabólicas, involucradas en papeles digestivos, defensivos y de degradación en los organismos vivos, parecen haber evolucionado con rangos más extensos de especificidad<sup>63</sup>. Así, la mayoría de los compuestos orgánicos (excluyendo a los compuestos inestables o altamente reactivos) pueden servir como sustratos para transformaciones catalizadas por enzimas<sup>63</sup>.

Las biotransformaciones pueden hacer posible las siguientes operaciones:

- Introducción a un centro de simetría.
- Transformación de un grupo funcional entre varios grupos de reactividad similar.
- Funcionalidad selectiva de átomos de carbono no activados.
- Resolución de racematos por la transformación selectiva de un enantiómero.

Generalmente, tales transformaciones son posibles solamente por métodos químicos por secuencias indirectas y complicadas de reacciones o no son posibles de ninguna manera. Usualmente, un microorganismo adecuado para una transformación deseada puede ser seleccionado mediante un laborioso proceso de screening o tamizaje. Para estos propósitos, se utiliza cualquier colección de cultivos puros disponible o los microorganismos son aislados de muestras de suelo. Estos microorganismos se hacen crecer en medios de cultivo adecuados para sus demandas nutricionales y posteriormente son probados para evaluar su capacidad para realizar la transformación deseada sobre el sustrato<sup>20</sup>.

Otro método para encontrar los microorganismos adecuados, está basado en el enriquecimiento de estos microorganismos a partir de muestras de suelos, los cuáles son capaces de crecer sobre el sustrato que van a transformar utilizándolo como única fuente de carbono. Estos tendrán posteriormente el sistema enzimático necesario. Sin embargo, lo que se desea es una ruta bloqueada, de tal manera que el intermediario deseado se acumule sin ser usado completamente para asimilación. Por lo tanto, estos cultivos son tratados con agentes mutagénicos y los mutantes que puedan crecer sobre fuentes comunes de carbono pero no por largo tiempo sobre el sustrato que será transformado, son seleccionados para reproducirlos en cajas petri. En estos mutantes, el metabolismo del sustrato está bloqueado<sup>6,12</sup>.

Las biotransformaciones pueden ser efectuadas con células en crecimiento o en reposo o sus esporas. En algunos casos, es necesario trabajar con enzimas aisladas para prevenir reacciones adicionales debido a otras enzimas del organismo. Las células o las enzimas inmovilizadas hacen posible el uso continuo

y repetido del biocatalizador. El sustrato que será transformado es añadido posteriormente como una sustancia pura o una solución concentrada a un solvente con la más baja toxicidad, tales como el agua, etanol, acetona y dimetilsulfóxido<sup>25</sup>.

En biotransformaciones con células en crecimiento, los microorganismos son inoculados y crecidos en un medio que provee un crecimiento óptimo bajo condiciones adecuadas de pH, temperatura y concentración de oxígeno disuelto. El sustrato que será transformado es añadido durante la fase de crecimiento; sin embargo, el momento más favorable para la adición será determinado experimentalmente. Este método es simple y con frecuencia es realizado en el screening para microorganismos e incluye la posibilidad de inducir la actividad enzimática deseada por crecimiento en presencia del sustrato. Sin embargo, las mejores conversiones son, con frecuencia, logradas en la fase estacionaria<sup>20,25</sup>.

En biotransformaciones con células estacionarias, el microorganismo es cultivado en un medio de crecimiento optimizado y después es recogido por centrifugación o filtración. Las células son entonces resuspendidas en un medio de transformación y el sustrato es añadido. Una solución amortiguadora con un pH óptimo es suficiente para este medio de transformación; con la finalidad de retener la viabilidad el mayor tiempo posible, ciertos nutrientes tales como la glucosa son con frecuencia incluidos en los medios de transformación. La adición del sustrato que será transformado al medio de crecimiento durante el cultivo inicial puede realzar la actividad enzimática deseada. En éste método, desde el crecimiento y la biotransformación, las etapas son separadas; los efectos de inhibición del crecimiento del sustrato o producto son eliminados. La

concentración celular puede ser ajustada hasta un nivel óptimo para la biotransformación y el aislamiento del producto desde un medio simple de biotransformación resulta ser más sencillo<sup>20</sup>.

En los biotransformaciones con esporas, los microorganismos capaces de esporular son cultivados bajo condiciones que favorecen una buena esporulación. Las esporas son entonces colectadas y pueden ser almacenadas en forma de pasta a bajas temperaturas por un largo tiempo. Las biotransformaciones son realizadas por esporas en medios con propiedades amortiguadoras. La ventaja en este caso, es la alta estabilidad de las esporas<sup>20,25</sup>.

Para biotransformaciones con células inmovilizadas o enzimas, se utilizan matrices inertes para la inmovilización tales como: gel de poliacrilamida, alginatos, κ-carragenina o celulosa<sup>108</sup>. Si es necesario, las células pueden ser rejuvenecidas o crecidas *in situ* en la matriz donde están inmovilizadas para prolongar su uso<sup>20</sup>.

c) Cepas auxótrofas. Las cepas auxótrofas son aquellas que requieren un metabolito para su crecimiento, al ya no poder producirlo. Frecuentemente, las vías metabólicas que conducen a la síntesis de un aminoácido se encuentran ramificadas: esto es, vías que producen aminoácidos parecidos tienen un tronco común al inicio y luego se ramifica. Tal es el caso de los aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano), así como los de la familia del aspártico (lisina, metionina, treonina e isoleucina). En este último caso, el ácido aspártico es precursor común de los cuatro posteriores y se transforma en aspartil fosfato en el primer paso común de la vía<sup>1</sup>.

Si dañamos el gen que codifica para alguna de las enzimas de las vías posteriores a la ramificación, la bacteria será ahora incapaz de producir una enzima activa, y por ello tampoco producirá el metabolito final; se convertirá entonces en auxótrofa a ese metabolito. La consecuencia de ello es que el flujo de materia prima se canalizará ahora sólo a la (o las) ramificación (es) libres, y así aumenta el producto final de ellas (s). Esto es, tendremos una cepa sobreproductora del (o los) aminoácido (s) cuya vía de síntesis no fue dañada.

Esto no es todo, analicemos los mecanismos de regulación de la síntesis de aminoácidos: los productos finales de una vía ramificada regulan su propia síntesis modulando la actividad de la primera enzima de dicha vía (Figura 1). Esto implica que en una cepa auxótrofa en que no se produce uno de los reguladores, esta regulación no se dará o será de menor cuantía, aumentando así la síntesis de otro producto final<sup>1</sup>. Ejemplos de esto son las auxótrofas a homoserina, que sobreproducen lisina; las que requieren tirosina y sobreproducen fenilalanina, etcétera

Es importante mencionar que por el hecho de ser auxótrofas, estas cepas requieren de la adición de un metabolito para poder crecer y por lo tanto producir un aminoácido. Sin embargo, es muy importante que las cantidades que se agreguen del suplemento sean limitantes, esto es, que apenas sostengan el crecimiento. De otro modo, un exceso de dicha sustancia hará que se inhiba la síntesis de dicho producto, tal como si se produjera de forma normal.



d) Mutantes regulatorias. Hay que recordar que el fenómeno de regulación a nivel de sustrato está dado a partir de la interacción física del producto final (cuya síntesis se desea modular), con la primera enzima de la vía en el sitio alostérico de ésta (un sitio diferente del activo).

Ahora bien, si dañamos el gene que codifica para la citada enzima regulable, precisamente en la parte donde se codifica el sitio alostérico, éste no será funcional al no poder reconocer al producto final. Estas mutantes serán sobreproductoras, ya que, aunque el producto se acumule, su síntesis no se detendrá al no funcionar el mecanismo regulador.

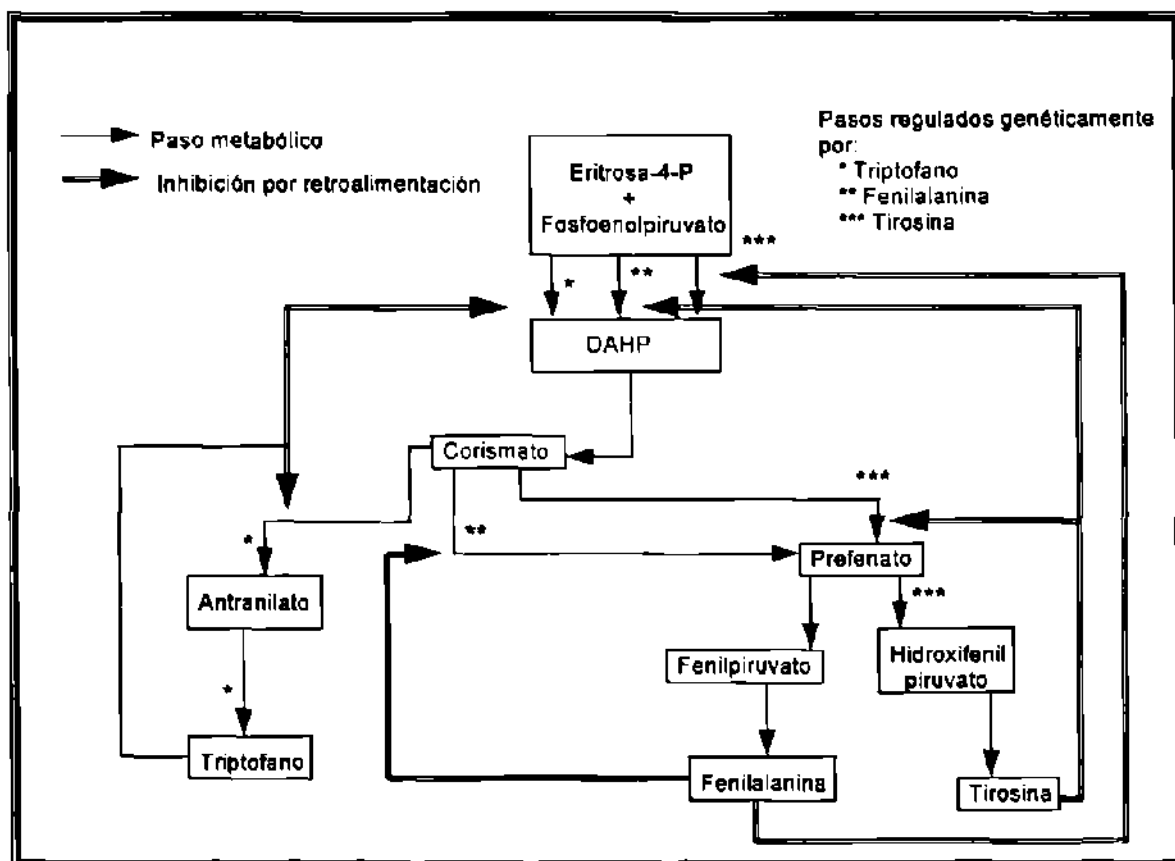


Figura 1. Regulación de la vía de síntesis de aminoácidos aromáticos *Escherichia coli*.

Por otro lado, si dicha mutante no reconoce a su regulador (producto final), es muy probable que tampoco pueda hacerlo con una molécula muy parecida a él (análogo), que en forma normal es tóxica para la bacteria, pues detiene la síntesis de un aminoácido sin que éste exista, ya que interacciona con el sitio alostérico por la semejanza estructural. Por lo tanto, una mutante resistente al análogo es muy probablemente sobreproductora. Este tipo de mutantes es muy fácil de identificar.

Además del control de la síntesis a nivel de sustrato que ya se mencionó, existe la regulación a nivel de expresión genética. En el modelo del "operon" vemos que se produce una proteína la cual, sólo en presencia del aminoácido cuya síntesis se regulará, se adherirá al llamado sitio operador, impidiendo así la expresión de los genes que codifican para la vía metabólica de la síntesis del aminoácido (control negativo). También mediante este mecanismo la acumulación del producto final detiene su propia síntesis.

En este caso también es válida la estrategia de selección con análogos tóxicos, ya que una mutante no regulable a este nivel (mutante constitutiva) no será sensible ni al producto final ni al análogo. De este modo tendremos también sobreproducción.

Es muy frecuente encontrar que las cepas de interés industrial son mutantes con varias marcas genéticas, en que se han utilizado varias de las estrategias arriba comentadas. Con estas cepas se han logrado mayores índices de sobreproducción, más aún, en ocasiones se presentan fenómenos de sinergismo en que una doble mutación es más productiva que la suma de dos independientes<sup>1</sup>.

e) Cepas productoras mejoradas por ingeniería genética. Las técnicas de ingeniería genética son (al menos en teoría) muy útiles para mejorar la sobreproducción de aminoácidos. Esto se basa en que, al clonar (en plásmidos pequeños) los genes (mutados o no) responsables de la síntesis de las enzimas de la vía metabólica, podrán encontrarse en un número de copias muy elevado, con una gran capacidad productiva. Este planteamiento ha sido fácilmente utilizable, y en algunos casos ha dado muy buenos resultados. En la producción de treonina se ha logrado clonar todos los genes de la vía particular ya mutados (esto es, que provienen de una cepa sobre productora) y se ha llegado a producciones mayores que las de las cepas no recombinantes<sup>30, 95</sup>.

Sin embargo, los resultados no son en realidad tan alentadores como se esperaba. La mayor parte del trabajo de ingeniería genética para producción de aminoácidos se ha realizado en *Escherichia coli*, ya que de esta bacteria se conocen muchas herramientas moleculares que permiten la manipulación requerida; no así en el caso de bacterias como *Brevibacterium* o *Corynebacterium* (ambas Gram positivas), las cuales han demostrado ser mejores productoras de algunos aminoácidos, como los de la familia del ácido aspártico. Las técnicas de biología molecular en estas especies se encuentran apenas en desarrollo, y los mejores resultados se obtienen con la técnica de fusión de protoplastos, muy utilizada en bacterias Gram positivas (el protoplasto es una célula en la que las paredes se han digerido por medio de enzimas; la fusión de protoplastos que existen en sucesión se favorece por aditivos como polietilenglicol)<sup>31</sup>.

Para el futuro los espectaculares avances que están teniendo lugar en las técnicas de ingeniería genética ofrecen la perspectiva de que será posible obtener fácilmente una enzima con independencia de su función catalítica o su origen en la misma cantidad y al mismo precio que las pocas enzimas como las proteasas y las carbohidrasas utilizadas en el proceso del azúcar y del almidón actualmente dominantes. Esto podrá conseguirse incrementando el número de copias de un gen en un organismo dado y por tanto las concentraciones y cantidades de enzima producida, o mediante técnicas de transferencia genética intercepas. Estas técnica, como la fusión de protoplastos, tienen la ventaja de que trabajan bien con células de características y orígenes filogenéticos muy diferentes, ya que además las células hijas no están en general severamente mutiladas por la acumulación de mutaciones perjudiciales, como ocurre con las técnicas mutagénicas convencionales. Sin embargo, la expresión del material genético introducido es incierta, constituyendo probablemente el principal problema planteado en este campo. La expresión de enzimas en los microorganismos huéspedes se ve afectada por muchas variables, y entre ellas se incluye la selección de la cepa huésped, el punto de unión del ribosoma, el número de copias del plásmido, la secuencia de aminoácidos y el N-terminal de la enzima. Por ejemplo, en uno de los huéspedes más conocidos, *E. coli*, los genes extraños dan lugar frecuentemente a grandes depósitos de proteínas insolubles en forma no nativa. Puesto que las células obtenidas mediante ingeniería genética pueden estar con frecuencia metabólicamente mutiladas de forma que su velocidad de crecimiento sea menor que la de las células madres, podría parecer que su

empleo como células inmovilizadas representaría alguna ventaja, ya que éstas no necesitan crecer cuando se utilizan en esta forma<sup>31, 61</sup>.

Winter *et al.*<sup>107</sup> han descrito una aplicación de las técnicas de manipulación genética al convertir la cisteína 35 del centro activo de la tirosil tRNA sintetasa de *Bacillus stearothermophilus* en serina clonando el gen para la enzima en un vector de forma que con un oligonucleótido sintético mal emparejado se facilitara la mutagénesis. Hee-Sung *et al.*<sup>45</sup> construyeron una vía metabólica híbrida para la síntesis de L-DOPA clonando en *E. coli* los genes para las enzimas tolueno dioxigenasa y tolueno cis-glicol deshidrogenasa provenientes de *Pseudomonas putida*, y el gen para la enzima tirosinfenolasa proveniente de *Citrobacter freundii*. Esta nueva vía metabólica permitió evitar el problema de la rápida oxidación del catecol cuando se utiliza sólo la tirosinfenolasa para la síntesis del aminoácido.

Sin embargo, tales técnicas de modificación suponen un conocimiento preciso acerca de la relación entre la estructura primaria de la enzima en investigación y su actividad, estabilidad y otras propiedades características que no han sido establecidas para las enzimas industrialmente importantes, o incluso para cualquier otra. Las técnicas de clonado genético que implican la manipulación de las regiones promotoras pueden utilizarse para amplificar la expresión de ciertos genes de forma que sus proteínas representen una proporción mayor entre las proteínas de las células. Las células recombinadas genéticamente también pueden ser utilizadas en forma inmovilizada. Por ejemplo, *B. subtilis* inmovilizado que transporta un plásmido para la proinsulina de rata produce proinsulina continuamente cuando la célula crece, pero la síntesis o excreción de proteínas no se inhibe por la adición de un antibiótico como la

novotiocina, que inhibe la replicación del DNA. En este estudio las células se inmovilizaron en perlas de agarosa de 100-300  $\mu\text{m}$  de diámetro utilizando aceite de soya como medio de suspensión<sup>108</sup>.

Recientemente se ha reportado la clonación de la fenilalanina-transaminasa de *Paracoccus denitrificans* en *E. coli*, obteniéndose rendimientos altos en la producción de fenilalanina<sup>31</sup>.

De este modo, aunque las técnicas moleculares han demostrado ser útiles, hasta el momento no han significado un avance revolucionario en este campo, como se esperaba<sup>64, 107</sup>.

### **Inmovilización de Células y Enzimas.**

Una enzima inmovilizada es definida como "la enzima físicamente confinada o localizada en una cierta región con retención de su actividad catalítica"<sup>12</sup>. El término inmovilizado no sólo es aplicable a enzimas, sino también a organelos celulares, células microbianas, células vegetales, células animales o a todo tipo de catalizadores<sup>100</sup>.

Se han establecido varias aplicaciones industriales con biocatalizadores inmovilizados y hay un gran número de referencias sobre inmovilización disponibles<sup>13,14,65</sup>. La primera aplicación industrial de enzimas inmovilizadas fue realizada por Chibata y sus colaboradores de la Tanabe Seiyaku Co., en Japón, en 1969. En este proceso una aminoacilasa fúngica fue inmovilizada sobre DEAE-Sephadex por medio de unión iónica y utilizada para la hidrólisis enantioselectiva de N-acil-D,L-aminoácidos<sup>11</sup>. La primera aplicación industrial

de células microbianas inmovilizadas fue también llevada a cabo exitosamente por Chibata y sus colaboradores en 1973 para producir L-aspartato a partir de fumarato de amonio utilizando células de *Escherichia coli* con alta actividad aspartasa atrapadas en gel de poliacrilamida.

La inmovilización de enzimas y células es un método práctico cuando se consideran bioprocesos que emplean biocatalizadores. En la actualidad, la aplicación de biocatalizadores inmovilizados incluye (i) la producción de compuestos útiles por reacciones de estereoespecificidad, (ii) la producción de energía por procesos biológicos, (iii) el tratamiento selectivo de contaminantes para resolver problemas ambientales, (iv) el análisis de diversos compuestos con alta sensibilidad y especificidad, y (v) la utilización en la manufactura de nuevas drogas, órganos artificiales etcétera<sup>100</sup>.

Sin embargo, la inmovilización de células tiene algunas desventajas que debe ser consideradas para cuestiones prácticas: (i) pueden sintetizarse productos secundarios debido a que las células pueden contener enzimas que catalizan reacciones indeseables y (ii) la pared y membrana celular de células intactas a menudo evitan que los sustratos, productos y otros componentes de las reacciones atraviesen con facilidad al interior o exterior de la célula. En el primero de los casos la selección de cepas, la mutación, el tratamiento adecuado de las células o el mejoramiento genético pueden resolver el problema; en el segundo caso, las barreras de permeabilidad deben ser rotas con tratamientos apropiados de las células antes o después de inmovilizarlas<sup>100</sup>.

Los métodos de inmovilización pueden ser clasificados en cuatro categorías: unión con soportes, entrecruzamiento, atrapamiento y combinado<sup>14,88</sup>.

#### Método de unión con soportes.

Este método se basa en la unión del biocatalizador a un soporte insoluble en agua a través de enlace covalente o iónico, adsorción física, o unión biospecífica. Varios tipos de materiales insolubles tales como polisacáridos insolubles en agua (v.g. celulosa, dextrano y derivados de la agarosa), proteínas (v.g. gelatina y albúmina), polímeros sintéticos (v.g. derivados de poliestireno, resinas de intercambio iónico y poliuretano), y materiales inorgánicos (v.g. arena, vidrio, cerámica y magnetita) pueden ser utilizados directamente o después de las modificaciones apropiadas o activación<sup>100</sup>.

#### Método de entrecruzamiento.

Este método utiliza compuestos bi o multifuncionales. Estos compuestos sirven como reactivos para el entrecruzamiento intermolecular del biocatalizador. El biocatalizador así entrecruzado se vuelve insoluble en agua. Además del glutaraldehído, el cual es el reactivo para entrecruzamiento más popular<sup>78,89</sup>, otros compuestos bi o multifuncionales tales como disocianato de tolueno y disocianato de hexametileno pueden ser utilizados. La actividad del biocatalizador inmovilizado por este método es, en general, reducida<sup>100</sup>.



### Método de atrapamiento.

Este método se clasifica en cinco tipos principales: látices, microcápsulas, liposomas, membranas, y micelas inversas.

En el tipo látices el biocatalizador es atrapado en la matriz de uno o varios polímeros. El tipo microcápsula involucra atrapamiento dentro de microcápsulas de un polímero sintético semipermeable. El tipo liposoma emplea atrapamiento dentro de una membrana anfipática líquido-surfactante preparada con lípidos. En el tipo membrana el biocatalizador está separado de la solución reaccionante por una membrana de ultrafiltración, una membrana de microfiltración o una fibra hueca. En el tipo micelas inversas el biocatalizador está atrapado dentro de micelas inversas las cuales se forman mezclando un surfactante con un solvente orgánico<sup>100</sup>.

Una ventaja del método de atrapamiento es que no sólo se pueden inmovilizar enzimas sencillas, sino también enzimas múltiples, organelos celulares, y células intactas o tratadas. Sin embargo, las desventajas son que (i) sustratos de alto peso molecular pueden no ser capaces de atravesar el soporte y entrar en contacto con el biocatalizador, y (ii) la renovación del soporte es difícil<sup>100</sup>.

Entre los métodos de atrapamiento, el tipo látices es el más ampliamente utilizado. Varias técnicas representativas del tipo látices son: inmovilización en gel de poliacrilamida, inmovilización en gel de alginato e inmovilización en gel de  $\kappa$ -carragenina<sup>100</sup>.

El método de inmovilización en carragenina es en especial interesante ya que este polisacárido es fácil de conseguir y es no tóxico. La carragenina es ampliamente utilizada en la industria alimentaria y de cosméticos como agente gelificante y estabilizante<sup>100</sup>. La  $\kappa$ -carragenina forma un gel al someterse a enfriamiento o al ponerse en contacto con reactivos inductores de la gelificación tales como el cloruro de potasio<sup>101</sup>. Diversos cationes, tales como amonio, calcio, aluminio y magnesio también sirven como buenos agentes inductores de la gelificación. Las condiciones de inmovilización por este método son suaves. Otra ventaja de este método es que se puede dar diversas formas (gránulos, pelets, membranas) al biocatalizador inmovilizado<sup>101</sup>.

El gel de  $\kappa$ -carragenina puede ser solubilizado fácilmente en agua o en solución salina para liberar el biocatalizador e investigar sus propiedades. Por otra parte, la pérdida del biocatalizador puede ocurrir fácilmente debido a la disolución del gel cuando no está presente un agente inductor de la gelificación. Para incrementar la estabilidad del biocatalizador atrapado en la carragenina, el tratamiento con glutaraldehído o hexametildiamina es a menudo efectivo<sup>100</sup>.

Una seria desventaja de los soportes convencionales es la barrera que representan para la difusión de los sustratos hacia las células inmovilizadas (especialmente para sustratos gaseosos) y para los metabolitos que salen de la biomasa atrapada en el gel. Para reducir esto, se hace necesario el empleo de matrices con poros mayores<sup>59</sup>. Uno de estos soportes es el criogel macroporoso de poli(vinil-alcohol) o alcohol polivinílico (PVA) que, a decir de Lozinsky<sup>59</sup>, muestra una remarcable estabilidad al permanecer durante periodos

prolongados en medios ácidos, alcalinos o salinos, bajo condiciones en las cuales la mayoría de los soportes tales como la carragenina, el alginato o el agar son destruidos<sup>59</sup>. Sin embargo, entre los problemas asociados con la inmovilización de células en criogeles de PVA está la influencia de la biomasa atrapada sobre las características físicas de los geles obtenidos, ya que si las células dentro del soporte reducen significativamente la fuerza de la inmovilización este efecto indeseable podría superar a la mayoría de las propiedades positivas de las matrices de crioPVA<sup>59</sup>.

## **PAPEL DE LA L-DOPA EN EL TRATAMIENTO DEL MAL DE PARKINSON.**

### **Metabolismo de Dopaminas.**

Las principales catecolaminas que se encuentran en el cuerpo, noradrenalina, adrenalina y dopamina, se forman por hidroxilación y descarboxilación de los aminoácidos fenilalanina y tirosina. La fenilalaninahidroxilasa se encuentra principalmente en el hígado. La tirosina es transportada hacia las neuronas secretoras de catecolaminas y las células medulares suprarrenales. Se convierte en DOPA y, a continuación, en dopamina en el citoplasma de las células por medio de la tirosina hidroxilasa y la dopa descarboxilasa. La descarboxilasa, que también recibe el nombre de L-aminoácido descarboxilasa aromática, es muy similar pero probablemente no idéntica a la 5-hidroxitriptofanodescarboxilasa. La dopamina es almacenada en vesículas granuladas, dentro de las cuales es convertida en noradrenalina por

la dopamina  $\beta$ -hidroxilasa. El isómero involucrado es L-DOPA; pero la noradrenalina que se forma se encuentra en configuración D-. Esto es cierto a pesar de ser levorrotatoria. La noradrenalina dextrorrotatoria (+) es mucho menos activa. El paso limitante de la tasa de síntesis es la conversión de la tirosina en dopa. La tirosinhidroxilasa, que cataliza este paso, está sujeta a retroacción inhibitoria por la dopamina y la noradrenalina, proporcionando así un control interno del proceso sintético. El cofactor para la tirosinhidroxilasa es la tetrahidrobiopterina, que es convertida en dihidrobiopterina cuando la tirosina es convertida en dopa<sup>39</sup>.

Algunas neuronas y células de la médula suprarrenal contienen también la enzima feniletanolamina-N-metiltransferasa (FNMT) la cual cataliza la conversión de noradrenalina en adrenalina<sup>38,39</sup>.

La dopamina (3,4-dihidroxi feniletilamina) es el precursor metabólico inmediato de la noradrenalina y la adrenalina; es un neurotransmisor central y posee propiedades farmacológicas importantes; aunque según Michael Aminoff el papel exacto de la dopamina no se conoce<sup>2</sup> y William Ganong<sup>39</sup> mencionó que se desconocen las acciones fisiológicas de la dopamina circulante. La dopamina es sustrato para la monoaminoxidasa (MAO) y la catecol-O-metiltransferasa (COMT) provocando su inactivación, debido a esto la dopamina no es efectiva cuando se administra por vía oral<sup>5</sup>. La MAO se localiza en la superficie externa de las mitocondrias. Esta distribuida ampliamente; pero en particular es abundante en las terminaciones nerviosas donde son secretadas las catecolaminas. La COMT también esta ampliamente distribuida, con

concentraciones elevadas en el hígado y los riñones, pero no se encuentra en las terminaciones nerviosas. En consecuencia, existen dos patrones diferentes de metabolismo de las catecolaminas (Figura 2)<sup>39</sup>.

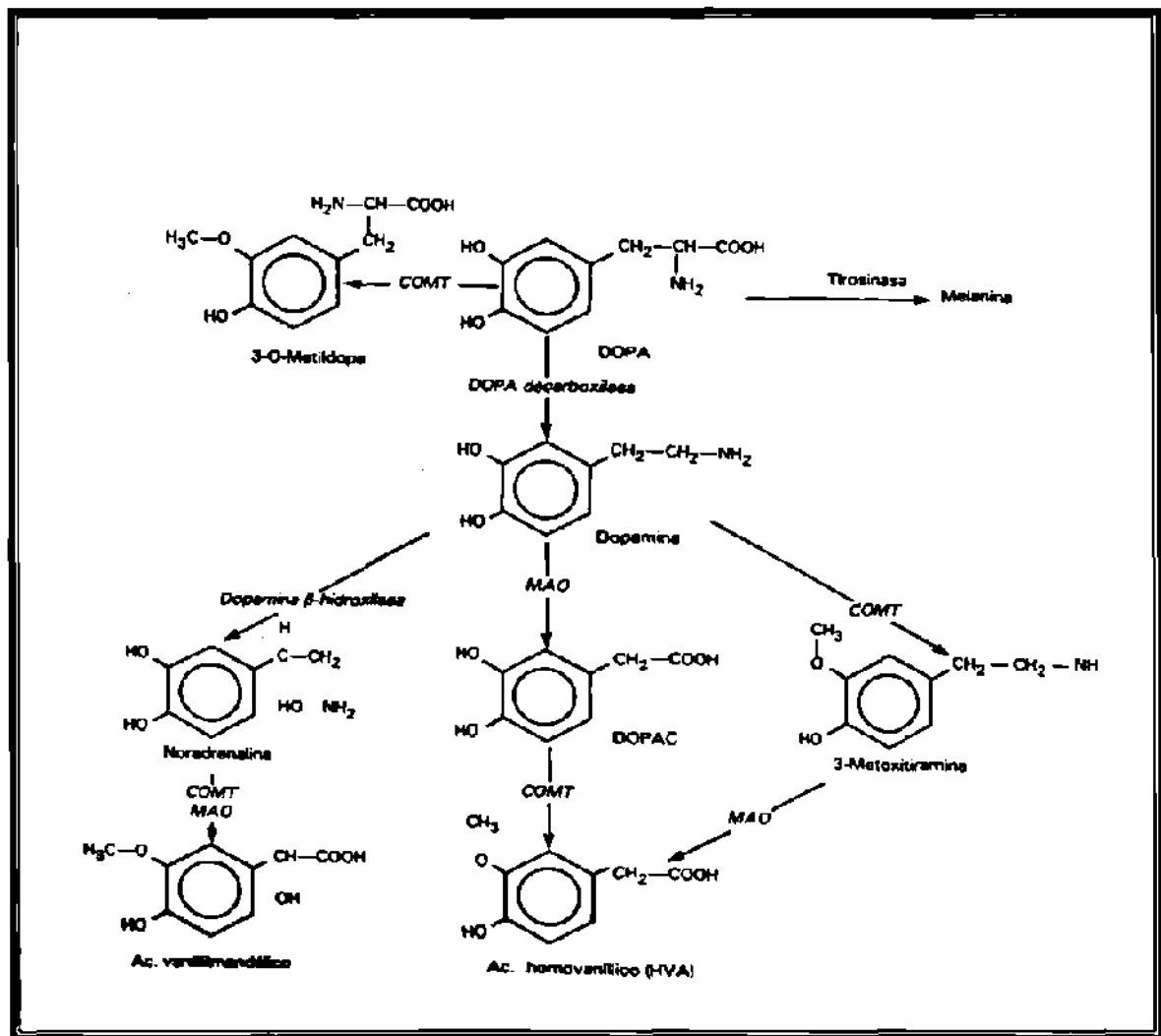


Figura 2. Principales vías de degradación de levodopa y dopamina.  
 MAO= Monoamino-oxidasa, COMT= Catecol-Ometiltransferasa  
 DOPAC= Ácidodihidroxiifenilacético

## **Características de la L-DOPA.**

### Propiedades fisicoquímicas.

La L-DOPA, aminoácido aromático, es un compuesto blanco cristalino, ligeramente soluble en agua, con peso molecular de 197.2 daltones y punto de fusión de 276<sup>0</sup>C a 278<sup>0</sup>C. Su nombre químico es ácido L- $\alpha$ -amino- $\beta$ -(3,4 dihidroxibenceno) propanoico. Su exposición ocasiona irritación en la piel y en el sistema respiratorio<sup>80</sup>.

La L-DOPA es utilizada en el tratamiento del Mal de Parkinson, formas juveniles de la corea de Huntington e intoxicación crónica por manganeso. Entre sus efectos secundarios más graves figuran alteraciones del movimiento, cambios emocionales, arritmias cardíacas y anorexia<sup>5</sup>.

### Propiedades terapéuticas .

Las drogas para la enfermedad de Parkinson tienen en común su capacidad para mejorar la función del músculo esquelético por medio de acciones primarias sobre el sistema nervioso central (SNC). Estas drogas se dividen en dos categorías de acuerdo a sus propiedades farmacológicas y sus usos terapéuticos. El primer grupo actúa principalmente sobre los ganglios basales; sus miembros ejercen efectos dopaminérgicos o anticolinérgicos y son útiles para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson y trastornos afines. La *levodopa* es el prototipo de las drogas dopaminérgicas centrales y el trihexifenidilo representa los agentes anticolinérgicos centrales<sup>5</sup>.

Como se mencionó en el apartado anterior, en el parkinsonismo hay marcada deficiencia del componente dopaminérgico de los ganglios basales, que se atribuye a pérdida de neuronas en la *sustancia nigra*. Esta deficiencia de dopamina provoca los signos y síntomas que señalamos antes. Por lo tanto, el objetivo teórico del tratamiento del Parkinson es balancear la actividad estriatal, reduciendo la actividad colinérgica (excitadores), o aumentar la función dopaminérgica (inhibidores) con drogas anticolinérgicas y dopaminérgicas de acción central, respectivamente.

El conocimiento de que el parkinsonismo es un síndrome de deficiencia de dopamina y el descubrimiento de la levodopa como droga importante para el tratamiento de la enfermedad fueron la culminación lógica de una serie de observaciones básicas y clínicas relacionadas. Las mediciones de las concentraciones regionales de la dopamina en el encéfalo humano fueron el eslabón básico entre los estudios de laboratorio y las aplicaciones clínicas<sup>5</sup>.

Como la dopamina no atraviesa la barrera hematoencefálica cuando se administra sistémicamente, no tiene efecto terapéutico en el parkinsonismo. Sin embargo, la levodopa, precursor inmediato de la dopamina, penetra por permeabilidad en el tejido estriado, donde se descarboxila a dopamina. La introducción más reciente de "potenciadores" de la levodopa (inhibidores de la dopadescarboxilasa) ha aumentado más aún el valor clínico de esta droga<sup>5</sup>.

Los primeros ensayos clínicos con pequeñas dosis intravenosas de D,L-DOPA dieron resultados alentadores, pero la droga causaba prominentes reacciones adversas. Posteriormente se demostró claramente que pequeños incrementos graduales de la dosis oral reducían al mínimo los efectos

indeseables de la D,L-DOPA. Los hallazgos clínicos fueron rápidamente confirmados y extendidos en numerosos ensayos con el isómero activo levodopa que resultó más efectivo que la mezcla racémica. La introducción de la levodopa ha tenido importancia fundamental no sólo para el cuidado de la mayoría de los pacientes con la enfermedad de Parkinson, sino también porque se suministró el primer ejemplo importante de la exitosa aplicación terapéutica de información de origen bioquímico a un trastorno neurológico degenerativo crónico<sup>5</sup>.

#### Química.

La levodopa se forma a partir de la L-tirosina como intermediario de la síntesis enzimática de las catecolaminas. La dopamina se sintetiza directamente a partir de la levodopa por acción de una enzima citoplasmática, la L- aminoácido aromático descarboxilasa<sup>5</sup>.

#### Propiedades farmacológicas.

Los efectos principales de la levodopa se deben al producto de su descarboxilación, la dopamina; la levodopa, como tal, es prácticamente inerte farmacológicamente. Cerca del 95% de la levodopa administrada por vía oral se descarboxila rápidamente en la periferia dando dopamina, que no atraviesa la barrera hematoencefálica, deben administrarse grandes dosis para permitir la acumulación suficiente de la levodopa en el encéfalo, donde su descarboxilación eleva la concentración central de dopamina. De lo contrario, administrando al mismo tiempo inhibidores de la dopa descarboxilasa que



actúan en la periferia, se puede reducir la dosis requerida de levodopa. La tolerancia a dosis necesariamente altas sólo se logra mediante la titulación gradualmente ascendente de la dosis durante semanas hasta obtener una respuesta clínica máxima o hasta que aparecen efectos secundarios inaceptables<sup>5</sup>.

Un 75% de los pacientes parkinsonianos responden por lo menos razonablemente bien a la levodopa. En esencia, todos los signos y síntomas del parkinsonismo, excepto la demencia, pueden responder a la administración de la levodopa<sup>5</sup>.

#### Sistema nervioso central.

Los efectos farmacológicos de la levodopa sobre el tono muscular y el movimiento no se ven en los individuos normales. La bradicinesia y la rigidez suelen responder más rápido y de modo más constante que el temblor, pero una significativa disminución de este último se obtiene a menudo con el tratamiento continuo. Las manifestaciones motoras secundarias como perturbaciones de la postura, la marcha, los movimientos asociados, la expresión facial, el habla, la escritura, la deglución y la respiración también mejoran proporcionalmente<sup>5</sup>.

#### Efectos psicicos.

En la mayoría de los pacientes la levodopa alivia, al menos en parte, los cambios de estado de ánimo característicos de la enfermedad de Parkinson. Al comienzo del tratamiento la sensación de apatía se reemplaza generalmente

por un aumento de vigor y una sensación de bienestar. El resultado se describe como una respuesta general de alerta caracterizada por la aparente mejoría de la función mental y mayor interés en sí mismo y en lo que rodea al paciente. Sin embargo, un número significativo de pacientes presenta serios efectos secundarios de conducta. Ya se mencionó que no se comprobó que la levodopa mejore los síntomas de demencia, que existen en una tercera parte de los pacientes con enfermedad de Parkinson<sup>5</sup>.

#### Sistema cardiovascular.

La descarboxilación periférica de la levodopa aumenta marcadamente la concentración sanguínea de dopamina<sup>5</sup>.

#### Mecanismo de acción.

Abundantes pruebas sugieren que el parkinsonismo es una deficiencia de dopamina, y que el precursor metabólico inmediato, la levodopa, debería actuar respondiendo a estas reservas agotadas. Las pruebas a favor de este mecanismo incluyen una correlación positiva entre los síntomas de la enfermedad de Parkinson y la pérdida de neuronas en el *locus niger* y el cuerpo estriado. Además, el encéfalo de los pacientes con enfermedad de Parkinson que recibieron grandes dosis de levodopa hasta su muerte, contiene concentraciones de dopamina en el cuerpo estriado de cinco a ocho veces mayores que las de los pacientes no tratados y que parecen tener correlación con su respuesta clínica a la droga<sup>5</sup>.

Absorción, distribución, destino y excreción.

La levodopa se absorbe rápidamente del intestino delgado por un sistema de transporte activo para aminoácidos aromáticos. Las concentraciones plasmáticas de la droga suelen culminar 30 minutos a 2 horas después de una dosis oral. La vida media en el plasma es corta, de sólo 1 a 3 horas. La velocidad de absorción de la levodopa depende en gran parte de la velocidad de evacuación gástrica, del pH del jugo gástrico y del tiempo que la droga permanece expuesta a las enzimas degradativas de la mucosa gástrica y flora intestinal; de lo contrario, alteraciones de estos factores pueden interferir en la biodisponibilidad de la levodopa<sup>5</sup>.

Más del 95% de la levodopa se descarboxila en la periferia por acción de la descarboxilasa de L-aminoácidos aromáticos ampliamente distribuida. La droga se descarboxila en gran parte en su primer paso por el hígado, que es rico en descarboxilasa, de modo que una cantidad relativamente pequeña de droga sin cambios llega a la circulación cerebral y probablemente menos del 1% penetra en el SNC. La inhibición de la descarboxilasa periférica aumenta marcadamente la fracción de levodopa administrada que permanece sin metabolizarse y disponible para atravesar la barrera hematoencefálica<sup>5</sup>.

La mayor parte de la L-DOPA administrada se convierte a dopamina, de la cual a su vez pequeñas cantidades se metabolizan a norepinefrina y epinefrina. La biotransformación de la dopamina prosigue rápidamente, dando los principales productos de excreción ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) y ácido 3-metoxi-4-hidroxifenilacético (ácido homovainílico, HVA). Por lo menos 30 metabolitos de la L-DOPA se han identificado, varios de ellos tienen

poderosos efectos farmacológicos que contribuyen al espectro de toxicidad. Algunas pruebas indican que el metabolismo de la levodopa puede acelerarse durante el tratamiento prolongado, debido posiblemente a la inducción de las enzimas.

Los metabolitos de la dopamina se excretan rápidamente por la orina; alrededor del 80% de una dosis<sup>5</sup>.

#### Efectos secundarios y toxicidad.

La mayoría de los pacientes con enfermedad de Parkinson tratados con levodopa experimentan efectos secundarios cuya intensidad y tipo son muy variables en las diferentes etapas del tratamiento. Aunque muchos de ellos son relativamente inocuos, otros son muy molestos y exigen la reducción de la dosis o el retiro total de la droga. Los efectos secundarios dependen generalmente de la dosis y son reversibles. La administración concurrente de levodopa y de un inhibidor periférico de dopa descarboxilasa es el medio más efectivo para disminuir los efectos secundarios extracelulares de la levodopa<sup>5</sup>.

Todos los efectos secundarios son reversibles y pueden controlarse generalmente con una reducción de la dosis.

#### Interacciones con otras drogas.

La descarboxilación de la levodopa a dopamina es catalizada por la enzima L-aminoácido descarboxilasa dependiente de la piridoxina; dosis de esta última un poco mayores que la cantidad alimentaria recomendada

enlaces<sup>56</sup>. Así, en la mayoría de los casos, dos moléculas de sustrato están involucradas en la reacción en una dirección, pero sólo una molécula en la reacción inversa. Muchas de estas reacciones son importantes en biosíntesis, y cuando la reacción sintética es la biológicamente importante o la única que ha sido demostrada, la enzima es referida como "sintasa". En buen número de casos la reacción catalizada podría ser clasificada en otra parte de la lista de enzimas, pero hay evidencia de que el mecanismo de reacción involucra un paso de tipo liasa. Esto es cierto, por ejemplo, para un número considerable de enzimas dependientes del piridoxal fosfato<sup>23</sup>. La tirosinofenolasa (TFL) pertenece a este tipo de enzimas.

La tirosinofenolasa (E.C. 4.1.99.2)<sup>23</sup>, descubierta no hace mucho tiempo y llamada anteriormente  $\beta$ -tirosinasa (Eneji, 1986)<sup>32,35,53,55,96,99</sup>, es una enzima intracelular y multifuncional<sup>37</sup> dependiente del piridoxal 5'-fosfato (PLP)<sup>27,55,98</sup> que cataliza una serie de reacciones de  $\alpha,\beta$ -eliminación (Figura 3),  $\beta$ -sustitución y racemización<sup>20,36</sup>. Está establecido que la TFL es una enzima de alto peso molecular que posee una estructura cuaternaria compuesta de dos subunidades<sup>28,29,57</sup>.

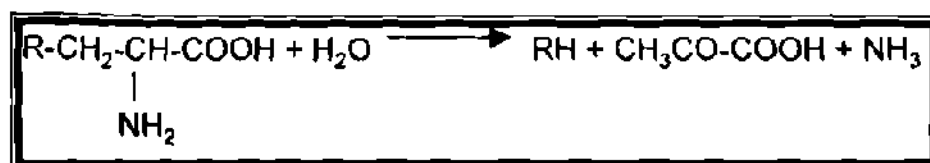


Figura 3. Reacción de  $\alpha,\beta$ -eliminación catalizada por Tirosinofenolasa.

Esta enzima normalmente cataliza la degradación de tirosina a piruvato, fenol y amonio; en 1975 se determinó que las reacciones de  $\alpha,\beta$ -eliminación eran reversibles<sup>36,37</sup> y en el caso particular de tirosina y sus análogos, el equilibrio aparente tiende hacia la dirección de síntesis del aminoácido cuando están presentes grandes cantidades de fenol, piruvato y amonio<sup>32</sup>. Esta misma enzima cataliza la reacción de síntesis de L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) si el fenol es sustituido por catecol, como se muestra en la Figura 4. La TFL ha sido utilizada para la síntesis de L-tirosina o L-DOPA; la catálisis se ha realizado utilizando células en suspensión<sup>28,29,35</sup> y/o células inmovilizadas<sup>22,58,70,71,72</sup>.

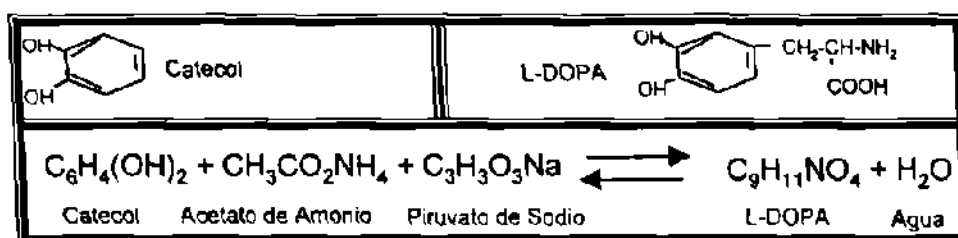


Figura 4. Reacción de síntesis de L-DOPA catalizada por tirosinfenoliasa.

Carman y Levin<sup>9</sup>, en un estudio realizado específicamente con tirosinfenoliasa de *Aeromonas phenologenes*, observaron los efectos de ciertos parámetros sobre la actividad tirosinfenoliasa. A continuación se describen brevemente los resultados obtenidos de sus estudios.

#### Efecto de la temperatura sobre la Constante de Michaelis para L-tirosina.

La actividad tirosinfenoliasa fue examinada con cantidades variables de L-tirosina a temperaturas de 0, 10, 20, 30 y 40°C. Las constantes de Michaelis fueron determinadas por el método de Lineweaver-Burk (1934) y variaron

considerablemente con la temperatura (Tabla 1). El valor más alto de  $K_m$  (0.58 mM) fue obtenido a la temperatura más baja (0°C) y el siguiente más alto (0.29 mM) a 10°C. Los valores de  $K_m$  a 20, 30 y 40°C fueron notablemente más bajos y variaron de 0.17 mM a 0.23 mM.

#### Gráfica de Arrhenius para tirosinfenoliasa.

Una curva de Arrhenius (0-40°C) para tirosinfenoliasa fue construida usando los valores de la Tabla 1. Se encontró que la energía de activación ( $E_a$ ) era de 13,800 calorías por mol.

Tabla 1. Efecto de la temperatura sobre la Constante de Michaelis para la L-tirosina<sup>a</sup>.

Temperatura (°C)	$K_m$	V (unidades/mL)
0	0.58 mM	0.026
10	0.29 mM	0.065
20	0.17 mM	0.160
30	0.23 mM	0.460
40	0.21 mM	0.733

<sup>a</sup>Una preparación enzimática parcialmente purificada que contenía 0.46 unidades de actividad fue examinada con varias concentraciones de L-tirosina a las temperaturas indicadas. La actividad tirosinfenoliasa fue examinada midiendo el decremento de la absorbancia de NADH a 340 nm en mezclas estándares para análisis que contenían LDH y NADH.

#### Efecto de cationes sobre la actividad TFL.

Carman y Levin<sup>9</sup> encontraron que la presencia de metales pesados ( $Cu^{++}$  y  $Co^{++}$ ) inhibía la actividad. Examinaron también la actividad utilizando una mezcla reaccionante conteniendo  $Cu^{++}$  y añadiendo después de un corto período mercaptoetanol a la mezcla examinada; con ello mostraron que la inhibición por  $Cu^{++}$  es reversible por la adición de mercaptoetanol. El efecto de cationes sobre la actividad tirosinfenoliasa se muestra en la Tabla 2.

Asimismo, Sundararaju *et al.*<sup>96</sup> señalaron que la TFL de *Citrobacter freundii* es activada cerca de 30 veces por cationes monovalentes, siendo los más efectivos  $K^+$ ,  $NH_4^+$  y  $Rb^+$ . Estos autores demostraron que el sitio de unión de estos cationes está en la interfase entre subunidades de la enzima. Sin embargo, también encontraron que la alta concentración (>100 mM) de cualquiera de los cationes resulta en la inhibición de la actividad TFL del tipo silvestre. Esta inhibición podría ser debida a la unión del catión con el complejo ES para formar un complejo que interacciona lentamente con el piruvato.

Tabla 2. Efecto de los cationes sobre la actividad tirosinfenoliasa<sup>a</sup>

Catión	Actividad Relativa (%)
Control	100
$Ca^{++}$	100
$Fe^{++}$	81
$Ba^{++}$	91
$Co^{++}$	17
$Cu^{++}$	0
$Zi^{++}$	86
$Mg^{++}$	100
$Na^+$	100
$K^+$	100
$NH_4^+$	95
$Li^+$	100
$Rb^+$	90
$Cs^+$	100

<sup>a</sup>La enzima, conteniendo 0.026 unidades de actividad fue analizada con 1 mM de los cationes indicados. La actividad fue analizada como en la Tabla 1

#### Efecto de aminoácidos sobre la actividad tirosinfenoliasa.

Los aminoácidos que tienen una semejanza estructural con la L-tirosina fueron incluidos en las mezclas para los análisis estándar para determinar su efecto sobre la actividad de la enzima en la tirosina. Entre los aminoácidos examinados sólo la L-alanina y la L-fenilalanina produjeron inhibición (Tabla 3).



La actividad tirosinfenoliasa fue luego examinada con cantidades variables de L-tirosina en presencia de L-alanina y L-fenilalanina. Las curvas de Lineweaver-Burk mostraron que la inhibición por estos aminoácidos es de tipo competitivo. Los valores de  $K_i$  para la L-alanina y la L-fenilalanina fueron calculados en 18 mM y 4.4 mM respectivamente.

**Tabla 3. Inhibición de la tirosinfenoliasa por aminoácidos**

Aminoácido	Actividad relativa ( % )
Control	100
L- alanina	74
L- fenilalanina	20
L- valina	100
L- leucina	100

#### Inhibición por Fenol.

El fenol, un producto final de la reacción catalizada, a una concentración que produce un 50% de inhibición, fue incluido por Carman y Levin<sup>9</sup> en mezclas reaccionantes y examinada con cantidades variables de L-tirosina. Una curva de Lineweaver-Burk muestra una inhibición por fenol de tipo mezclado con un  $K_i$  calculado de 50  $\mu$ m.

#### Especificidad por Sustrato de la Tirosinfenoliasa.

La formación de piruvato a partir de varios aminoácidos por tirosinfenoliasa parcialmente purificada se presenta la Tabla 4. La formación de piruvato fue observada con L-tirosina metil éster, S-metil-L-cisteína, y L-serina pero a tasas más bajas si la comparamos con L-tirosina. Los valores de  $K_m$

encontrados por Carman y Levin<sup>9</sup> fueron de 0.37 mM, 0.40 mM, y 1.2 mM respectivamente.

#### Características del sitio activo.

Tyr71 es un residuo invariable en todas las secuencias conocidas de la tirosinofenolasa<sup>10</sup>. La sustitución de este residuo por fenilalanina en el mutante Y71F TPL no registra actividad detectable. La constante de unión del piridoxal fosfato en Y71F TPL fue estimada en 1 mM, comparada con 0.6  $\mu$ M para el tipo silvestre<sup>10</sup>. Sundararaju *et al.*<sup>97</sup> señalaron que la Arg381 también forma parte del sitio de unión del sustrato. Estos autores evaluaron el papel de este residuo preparando mutantes en los cuales la Arg381 era sustituida por alanina (R381A), por isoleucina (R381I) y por valina (R381V). La actividad de  $\beta$ -eliminación de la R381A fue muy inferior a la del tipo silvestre, mientras que los otros dos mutantes no presentaron actividad detectable. Los estudios realizados por estos autores los llevaron a concluir que la Arg381 es responsable, al menos parcialmente, de la especificidad por sustrato de la TFL.

De acuerdo con Jansonius<sup>48</sup>, el papel catalítico de la TFL es atribuido a los residuos Lys257, Arg381 y Tyr71 del sitio activo, mientras que el Arg404 participa en la unión de los  $\alpha$ -carboxilatos de los sustratos formando un doble puente de hidrógeno. Pletnev *et al.*<sup>76</sup> realizaron un estudio con la TFL de *Erwinia herbicola* enfocado a determinar la estructura de la apoenzima, la holoenzima y la apoenzima acomplejada con el cofactor y análogo de sustrato fosfopiridoxil-L-tirosina. Ellos encontraron que el tetrámero completo en la

unidad asimétrica y las posiciones relativas de los dos dominios difieren entre monómeros. Esto llevó a los autores a proponer un mecanismo catalítico fuertemente diferente, con otros papeles para la Arg381 y la Tyr71. No obstante, Jansonius<sup>48</sup> señala que son necesarios mayores estudios.

Tabla 4. Formación de piruvato a partir de varios aminoácidos por tirosinfenoliasa

Aminoácido	K <sub>m</sub>	V Relativa (100 %)
L-tirosina	0.23 mM	100
L-tirosina metil éster	0.37 mM	25
S-metil-L-cisteina	0.40 mM	14
L-serina	1.2 mM	3
L-fenilalanina	0 mM	0
L-cisteina	0	0
L-dopa	0	0
L-histidina	0	0
L-triptofano	0	0
Ácido L-aspártico	0	0
L-valina	0	0
L-metionina	0	0
L-alanina	0	0
L-leucina	0	0

Barbolina *et al.*<sup>4</sup> señalaron que la Asn185 es también un residuo invariable de todas las secuencias conocidas de la TFL. Este residuo no interacciona con el cofactor piridoxal fosfato pero participa en un cambio que ocurre en la aldimina externa el cual se acompaña de la formación de un enlace de hidrógeno entre la Asn185 y el átomo de oxígeno en la posición 3 del cofactor. La sustitución del residuo Asn185 por alanina en el mutante N185A resulta en una moderada actividad residual (cerca del 2%) con respecto a la enzima silvestre. Estos autores sugieren que el papel que juega el residuo

Asn185 consiste en la estabilización de un intermediario de tipo quinonoide en el transcurso de la reacción.

#### Constante de equilibrio.

Carman y Levin<sup>9</sup> encontraron que la reacción catalizada por tirosinfenoliasa se completó en un 93% en aproximadamente 2.5 horas cuando la L-tirosina se utilizó a una concentración inicial de 1.25 mM. A partir de esto, ellos calcularon la constante de equilibrio en  $1.7 \times 10^{-5}$ .

#### Reacción reversa de la Tirosinfenoliasa.

La formación de L-tirosina a partir de fenol, piruvato y amonio fue monitoreada siguiendo el consumo de fenol respecto al tiempo. Se encontró que el pH óptimo de esta reacción reversa era de 9.0 y la  $K_m$  para el fenol de 5.0 mM.

En concordancia con lo encontrado por Carman y Levin<sup>9</sup>, Brot *et al.*<sup>7</sup> reportaron que la actividad tirosinfenoliasa de *Clostridium tetanomorphum* era dependiente de  $Mg^{++}$ . Reportaron también que esta enzima mostraba un decremento marcado en actividad cuando el amortiguador Tris era sustituido por fosfato, y que la actividad podía ser restaurada añadiendo iones  $K^+$  o  $NH_4^+$ . La actividad tirosinfenoliasa de *A. phenologenes* no muestra dependencia de  $Mg^{++}$  ni tampoco hay un efecto estimuladorio<sup>9</sup>. Carman y Levin<sup>9</sup> observaron un pequeño incremento en la actividad cuando el amortiguador de fosfatos fue reemplazado con amortiguador Tris, y no se observó estimulación de la

actividad en presencia de iones de  $K^+$  o  $NH_4^+$ . Kumagai *et al.*<sup>51,52</sup> también reportaron que los amortiguadores Tris y de fosfatos podrían ser usados indistintamente sin efecto sobre la actividad.

Respecto de la inhibición por efecto de metales pesados, Carman y Levin<sup>9</sup> estudiaron la formación de mercaptidos con grupos sulfhidrilos de la enzima por  $Cu^{++}$ . Puesto que la reacción de grupos sulfhidrilos con grupos formadores de mercaptidos es rápidamente reversible, la adición de otros compuestos sulfhidrilos (mercaptoetanol) a la mezcla reaccionante revierte la inhibición. Por lo tanto, el grupo sulfhidrilo parece esencial para la actividad. Una inhibición similar de la actividad tirosinfenoliasa por  $Cu^{++}$  y el restauramiento de la actividad por la adición de mercaptoetanol ha sido reportada para la tirosinfenoliasa de *Bacterium coli phenologenes*<sup>47</sup>.

La inhibición competitiva de la tirosinfenoliasa por L-alanina y L-fenilalanina, y la inhibición por fenol, fueron similarmente reportadas con *Escherichia intermedia*<sup>51</sup> y *Erwinia herbicola*<sup>52</sup>.

La especificidad del sustrato de la tirosinfenoliasa de *A. Phenologenes* reportada por Carman y Levin<sup>9</sup> es similar a la reportada para la enzima de *E. intermedia*<sup>51</sup> y *E. herbicola*<sup>52</sup>. Resultados similares respecto a la especificidad por sustrato fueron reportados para la triptofanasa de *E. coli*<sup>68</sup> y para cistationina sintetasa de *Salmonella typhimurium*<sup>49</sup>.

Estudios anteriores han mostrado que los valores de  $K_m$  para S-metil-L-cisteína para la enzima de *E. intermedia* y *E. herbicola* fueron de 1.82 mM y 4.17 mM respectivamente<sup>51,52</sup>. Los valores de  $K_m$  para la L-serina con tirosinfenoliasa de estas respectivas fuentes fueron de  $3.45 \times 10^{-2}$  y  $2.86 \times 10^{-2}$

mM. Los valores de  $K_m$  para la S-metil-L-cisteína (0.40 mM) y L-serina (1.2 mM) de *A. phenologenes* reportados por Carman y Levin<sup>9</sup> difieren sólo ligeramente del valor de  $K_m$  para la L-tirosina (0.23 mM), y parece que estos compuestos son mejores sustratos para la tirosinfealiasa de *A. phenologenes* si la comparamos con la tirosinfeoliasa de *E. herbicola*<sup>52</sup> y *E. intermedia*<sup>51</sup>.

De acuerdo con la constante de equilibrio calculada por Carman y Levin<sup>9</sup> para la reacción directa catalizada por la tirosinfeoliasa, la reacción reversa donde la L-tirosina es producida a partir de fenol, piruvato y amonio fue favorecida cuando estos sustratos fueron incorporados en altas concentraciones en las mezclas reaccionantes examinadas. Yamada *et al.*<sup>110</sup> demostraron, similarmente, la síntesis de L-tirosina a partir de fenol, piruvato y amonio por tirosinfeoliasa de *E. intermedia*.

Por su parte, Faleev *et al.*<sup>33</sup> realizaron un estudio sobre la tirosinfeoliasa de *Citrobacter intermedius* y reportaron que algunos aminoácidos son inhibidores competitivos de la TFL de este microorganismo. El ácido aspártico y el ácido glutámico son inhibidores potentes debido a la baja hidrofobicidad de sus cadenas laterales. Esto hizo que sugirieran la presencia de un grupo electrofílico en el sitio activo el cual interacciona con el grupo carboxilo terminal de estos aminoácidos. La tiramina, la  $\beta$ -feniletilamina y la triptamina no mostraron inhibición detectable. Los ésteres y amidas de los aminoácidos L-aromáticos, la D-fenilalanina y el D-triptófano son inhibidores competitivos.

## **Mecanismo de Acción de la Tirosinfenoliasa.**

Como se mencionó anteriormente, las reacciones de  $\alpha,\beta$ -eliminación catalizadas por TFL son reversibles<sup>37</sup>, en el caso particular de L-tirosina y sus análogos el equilibrio aparente tiende hacia la dirección de síntesis del aminoácido cuando están presentes grandes cantidades de fenol, piruvato y amonio<sup>32</sup>. La reacción reversible (Figura 3) es la de mayor interés práctico<sup>27,37,55,56</sup>.

En muchos procesos enzimáticos se requiere de una sustancia adicional junto al sustrato y la enzima para que la reacción pueda llevarse a cabo, de modo que tales coenzimas pueden tomar parte en etapas intermedias de la reacción catalizada por la enzima (o el ciclo de reacciones catalizadas por un sistema enzimático); estas coenzimas no se consumen durante el proceso y se encuentran en su forma original al final de la catálisis. Pueden, sin embargo, ser considerados como parte esencial del mecanismo catalítico<sup>23</sup>.

El piridoxal 5'-fosfato (PLP) actúa como coenzima de varias enzimas que participan en el metabolismo de aminoácido<sup>23</sup>, de hecho casi todas las liasas que actúan sobre aminoácidos requieren de PLP<sup>23</sup>. La racemasa de aminoácidos<sup>23</sup>, la tirosinfenoliasa<sup>27,32,37,99</sup>, la triptofanasa<sup>37</sup> y la triptofano-indoliasa<sup>23</sup>, se consideran enzimas dependientes de piridoxal 5'-fosfato.

La coenzima PLP es necesaria para la tirosinfenoliasa<sup>27,32,37,55,110</sup>, la coenzima se une al grupo  $\epsilon$ -amino del sitio activo de la enzima con la formación

de la base de Schiff bajo altas concentraciones de ésta con residuos de histidina y algunas partes de la macromolécula que no son activas<sup>18</sup>.

La TFL, así como la triptófano indol-liasa (TIL), difieren de otras liasas dependientes del piridoxal fosfato que catalizan reacciones de eliminación en que los enlaces C-C formalmente inactivados se rompen. La reacción es compleja debido a 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. Ambas enzimas, la TFL y la TIL requieren de dicha activación del enlace C-C para facilitar la eliminación del fenol e indol, respectivamente<sup>27</sup>.

Los valores de  $K_m$  de las enzimas PLP-dependientes, para sustratos como aminoácidos, son en la mayoría igual a la constante de disociación de sus complejos PLP y, al menos en un caso, la constante de disociación y  $K_m$  varían similarmente en función del pH<sup>23</sup>; sin embargo, la especificidad para aminoácidos en particular y el tipo de reacción que ocurre está determinado por la parte proteica de la enzima<sup>23</sup>.

La mayoría, muy probablemente todas, las racemasas de aminoácidos requieren de PLP y no hay duda de que el intermediario surge de la formación de la base de Schiff. El sitio activo de la enzima debe tener un arreglo de grupos que lo hacen específico para una cadena lateral de aminoácidos en particular y también grupos funcionales que hacen específica a la racemasa y no a una aminotransferasa o a una aminodescarboxilasa, ya que todas estas enzimas usan complejos de aminoácido-PLP<sup>23</sup>.



No obstante todo lo anterior, se debe mencionar que no siempre la adición de PLP mejora la actividad de las enzimas piridoxal fosfato dependientes. Existen antecedentes en los cuales se observó que la adición de PLP no mejora la actividad TFL<sup>55</sup>. A este respecto, Lloyd-George y Chang<sup>58</sup> mencionan que la enzima tirosinofenolasa pura requiere cofactores tales como piridoxal fosfato y cationes como  $K^+$  o  $NH_4$  para ser activa; sin embargo, las células intactas de *Erwinia herbicola* han acumulado los cofactores necesarios durante su crecimiento, y por lo tanto pueden ser usadas directamente para la producción de L-tirosina o L-DOPA<sup>28</sup>. Consecuentemente, es más conveniente usar células completas que la enzima libre.

La máxima actividad TFL se presenta en presencia de cationes monovalentes: potasio, rubidio, cesio o amonio; con el cambio de éstos por cationes de litio o sodio, disminuye la actividad de la enzima<sup>18</sup>. Las enzimas que catalizan reacciones de transaminación no son activadas por estos cationes<sup>18</sup>.

Al igual que lo ya mencionado para la TFL de otros microorganismos, la TFL de *Citrobacter freundii* presenta activación por cationes como potasio, sodio y amonio, mientras que el cobre y el mercurio interactúan sobre los grupos sulfhidrilos de la enzima interviniendo en la estabilidad conformacional de la misma<sup>99</sup>. La inhibición de la actividad de la enzima por cationes de  $Cu^{2+}$  es reversible; la actividad se restablece añadiendo mercaptoetanol; un efecto similar se observa en la TFL de *Bacterium colifenologenes*<sup>99</sup>.

La producción de tirosina a partir de amonio, piruvato y fenol ocurre por un mecanismo de tercer orden<sup>111</sup> del tipo descrito por Cleland<sup>16</sup>. Si todos los pasos ocurren rápidamente respecto al paso de formación de producto, se

pueden utilizar los principios de equilibrio rápido para derivar la tasa de reacción como una función de la concentración de los sustratos<sup>91</sup>. Si la constante de equilibrio de la reacción es grande y la reacción está lejos del equilibrio, el efecto de la reacción reversa sobre la tasa de reacción puede ser ignorado<sup>91</sup>. Así, la tasa de reacción,  $v$ , puede ser predicha por:

$$\frac{v}{V_{max}} = \frac{\frac{[A][B][C]}{K_A K_B K_C}}{1 + \frac{[A]}{K_A} + \frac{[A][B]}{K_A K_B} + \frac{[A][B][C]}{K_A K_B K_C} + \frac{[P]}{K_P}}$$

donde A, B y C son, respectivamente, el primero, el segundo y el tercer sustrato en unirse al sitio activo en este mecanismo de tercer orden. De acuerdo con Lloyd-George y Chang<sup>58</sup>, A, B y C son, respectivamente, amonio, piruvato y fenol; P es el producto (tirosina);  $K_A$ ,  $K_B$ ,  $K_C$  y  $K_P$  son, respectivamente, las constantes de equilibrio rápido para la disociación de amonio, fenol, piruvato y tirosina a partir del complejo enzima-sustrato (o complejo enzima-producto); y  $V_{max}$  es la velocidad máxima de reacción que puede ocurrir si todos los sitios activos de la enzima estuvieran saturados con sustrato.

## Distribución de la Tirosofenolasa en Microorganismos.

La actividad de la enzima tirosofenolasa se ha encontrado en diversas bacterias, la mayoría de las cuales pertenecen a la familia Enterobacteriaceae<sup>18</sup>. Las especies típicas que producen la TFL son: *Escherichia coli*, *Aerobacter aerogenes*, *Pseudomonas ovalis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megatherium*, *Xanthomonas campestris*, *Proteus mirabilis*, *Proteus morgani*, *Paracolobacterium coliforme*, *Salmonella gallinarum*, *Alcaligenes faecalis*<sup>69</sup>, *Escherichia intermedia* (actualmente conocida como *Citrobacter intermedius*)<sup>37,99</sup>, *Erwinia herbicola*<sup>26,52,69</sup> y *Citrobacter freundii*<sup>69</sup>, siendo estas dos últimas las estudiadas con más detalle.

Los microorganismos capaces de producir la enzima se distribuyen ampliamente y la fuente de obtención es el caldo donde el microorganismo es cultivado, el filtrado de células libres del mismo, una suspensión acuosa de microorganismos, una suspensión de células crecidas, un filtrado de la suspensión, o enzimas libres o inmovilizadas altamente purificadas<sup>69</sup>.

Los microorganismos con actividad TFL catalizan la síntesis de L-tirosina, L-DOPA y sus derivados en reacciones de  $\beta$ -sustitución a partir de piruvato, amonio y fenol (o catecol) y sus derivados<sup>69</sup>. En la ex Unión Soviética se aislaron células de *Citrobacter freundii* con alta actividad TFL para la producción de L-tirosina y L-DOPA<sup>69</sup>; mientras que en Japón se ha trabajado con TFL de células de *Erwinia herbicola* inmovilizadas en colágeno y de *C. freundii* inmovilizadas en gel de poliacrilamida (PAAG)<sup>110</sup>.

La fuente de TFL ( $\beta$ -tirosinasa) más usada es la de *Erwinia herbicola*<sup>57</sup> y, aunque la enzima de *Citrobacter freundii* es más estable, su actividad específica es sólo la mitad de la de *E. herbicola*<sup>57</sup>.

En la Tabla 5 se comparan los rendimientos de las reacciones de síntesis de derivados de la fenilalanina por métodos biológicos donde se utilizan como fuente de la enzima TFL de diferentes microorganismos<sup>96</sup>.

Tabla 5. Síntesis biológica de aminoácidos fenólicos catalizada por tirosinfenoliasa de diferentes fuentes<sup>96</sup>.

MICROORGANISMO	Cantidad de aminoácido producido (g/dL)		
	L-TIROSINA	L-DOPA	2,4-DIHIDROXIFENILALANINA
<i>E. herbicola</i>	1.2-1.0*	0.8-0.8*	0.7-0.6*
<i>C. freundii</i> (ATCC 6750)	0.9-0.8	0.6-0.6	0.5-0.5
<i>E. coli</i>	0.8	0.5	0.4
<i>C. freundii</i> (ATCC 8090)	0.5-0.4	0.3-0.2	0.4-0.3
<i>P. morganii</i>	0.5	0.3	0.3
<i>P. mirabilis</i>	0.4-0.8	0.3-0.5	0.3-0.5
<i>Ps. Perlutida</i>	0.3-0.5	0.2-0.5	0.2-0.5
<i>Aerob. aerogenes</i>	0.3-0.5	0.2-0.5	0.2-0.5
<i>S. gallinarum</i>	0.5-0.5	0.4-0.3	0.2-0.3
<i>Parac. coliforme</i>	0.4-0.4	0.3-0.2	0.2-0.3
<i>X. campestris</i>	0.4-0.3	0.2-0.2	0.1-0.2
<i>Alc. Faecalis</i>	0.3-0.3	0.1-0.2	0.1-0.1

\* Sustituto de piruvato de potasio: ácido oxalacético.

### Uso de la Tirosinfenoliasa para la Síntesis de Tirosina y L-DOPA.

De acuerdo con Harrison<sup>44</sup> la tirosinfenoliasa es una de las enzimas con amplio potencial para la producción de los aminoácidos L-tirosina y L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA).

La 3,4-dihidroxifenil-L-alanina fue primero aislada por Guggenheim en 1913 de la corteza y brote de *Vicia faba*<sup>30</sup>. Este aminoácido está contenido en

grandes cantidades en el cerebro<sup>60</sup> y ha atraído mucho la atención como una droga específica para el tratamiento de la enfermedad del mal de Parkinson<sup>19</sup>. Hay muchos reportes concernientes a esta producción. La L-DOPA ha sido obtenida anteriormente por extracción de órganos vegetales o preparados por un método sintético<sup>67,90</sup>. Sin embargo, el método de extracción no es aplicado en la producción a gran escala y el método sintético contiene un paso por resolución óptica. La producción microbiológica de este aminoácido ha sido extensivamente estudiada. C.J. Sih<sup>92</sup> reportó que N-formyl o N-carbobenzoxy L-tirosina fueron transformados en sus correspondientes derivados L-DOPA por *Aspergillus ochraceus* o *Glidacium deliquescens*. Haneda<sup>43</sup> hizo una búsqueda de los microorganismos los cuáles catalizan la síntesis de L-DOPA a partir de L-tirosina por  $\alpha$ -tyrosinasa. Los rendimientos en estos métodos microbiológicos, sin embargo, no son lo suficientemente altos como para que sea costeable su aplicación en la producción industrial. Yamada y su grupo encontraron que la tirosinofenolasa (TFL) catalizaba la síntesis de L-DOPA a partir de DL-serina y pirocatecol a concentraciones significativamente altas (arriba del 75%)<sup>67</sup>. Este método enzimático es simple y es uno de los procesos más económicos actuales para la preparación de L-DOPA.

Para *et al.*<sup>71</sup> realizaron un trabajo sobre síntesis de L-tirosina con células inmovilizadas de *Escherichia intermedia*, las cuales fueron inmovilizadas por atrapamiento en un gel de poliacrilamida y usadas para la producción enzimática de L-tirosina a partir de fenol, piruvato y amonio. Ellos observaron que una preparación que contenía 50 mg de células/g de gel conservó el 60%

de su actividad original. El efecto de la temperatura, pH y concentración de sustrato sobre la actividad de células libres fue casi idéntico al efecto sobre las células inmovilizadas. El fenol mostró inhibición e inactivación de la catálisis a altas concentraciones. La reacción de síntesis de L-tirosina fue llevada a cabo en reactores tipo batch y se alcanzó una alta tasa de conversión (95 a 100%), con una producción de 10 g/L y un máximo de productividad de 2g/L/h. En un reactor continuo, la catálisis mostró una alta estabilidad operacional (más de 54 días sin pérdidas). De este estudio Para *et al.*<sup>71</sup> concluyeron que la actividad tirosinofenolasa fue alta y que las condiciones probadas fueron óptimas para la síntesis de L-tirosina.

Estos mismos autores realizaron en 1988<sup>72</sup> una investigación sobre la síntesis de L-DOPA por células de *Escherichia intermedia* inmovilizadas en gel de poliacrilamida. Ellos llevaron a cabo la síntesis a partir de catecol, piruvato y amonio, utilizando una preparación de células inmovilizadas (75 mg de células por gramo de gel) en la cuál observaron una conservación del 45%-50% de la actividad de las células libres. El efecto de la temperatura, pH y concentración de sustrato para la tasa inicial de síntesis de L-DOPA fue muy similar para células libres e inmovilizadas. Observaron además una inhibición por sustrato para pirocatecol, piruvato y amonio. En un reactor batch se obtuvieron 5.4 g/L de L-DOPA con una conversión del 100% del pirocatecol y productividad de 0.18 g/L\*h. En este estudio también se observó que el uso de un complejo de pirocatecol-borato disminuía la inactivación por formación de producto.

Por su parte Foor *et al.*<sup>35</sup> realizaron un trabajo sobre la producción de L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) en *Escherichia coli* con el gen para

tirosinfenoliasa (TFL) clonado de *Erwinia herbicola*. La L-DOPA es usada en el tratamiento del mal de Parkinson. La inducción de altos niveles de TFL requiere arriba de 2 g de tirosina por litro en el medio de crecimiento. Esta cantidad de tirosina es cara en la producción a gran escala y además, en caso de haber presencia de tirosina en la mezcla reaccionante, se complica la purificación del producto final debido a la similitud de este aminoácido con la L-DOPA. El trabajo de Foor *et al.*<sup>35</sup> tuvo como objetivo establecer un método para inducir altos niveles de TFL en ausencia de tirosina. La TFL no se encuentra normalmente en *E. coli* K12; además, esta cepa no crece en medio con tirosina como única fuente de nitrógeno. Una librería de DNA genómico de *E. herbicola*, una especie que se sabe produce altos niveles de TFL, fue preparada en un vector de *E. coli* y examinada en búsqueda de plásmidos que confirieran a *E. coli* la habilidad de utilizar tirosina como única fuente de nitrógeno. Varios plásmidos fueron aislados y estudiados, el más pequeño de los cuales, pTFL1, contenía 5.8 kb de DNA insertado. Después de la retransformación de *E. coli* NM522 con pTFL1, cada transformante tuvo la habilidad para crecer en tirosina como única fuente de nitrógeno, confirmando que el plásmido confirió el fenotipo Tut\*. De lo anterior, Foor *et al.*<sup>35</sup> concluyeron que *E. coli* conteniendo pTFL1 produce altos niveles de TFL.

Lloyd-George y Chang<sup>58</sup> realizaron estudios con células completas de *Erwinia herbicola* con actividad tirosinfenoliasa, las cuales fueron microencapsuladas en una matriz alginato-polilisina-alginato. Ellos estudiaron el uso de éstas para la conversión de amonio y piruvato junto con fenol y catecol, respectivamente, en L-tirosina o L-DOPA. Observaron que el crecimiento de *E.*

*herbicola* a temperaturas de 22°C a 32°C fue estable, en estas condiciones las células alcanzaron la fase estacionaria y permanecieron allí por lo menos 10 horas. A 37°C las células crecieron rápidamente, pero también entraron rápidamente en fase de muerte; a 42°C hubo un crecimiento limitado de *E. herbicola*.

Las células de *E. herbicola* fueron microencapsuladas en alginato-polilisina-alginato. Estas células fueron utilizadas como catalizadores para la producción de L-tirosina o L-DOPA a partir de amonio, piruvato, y fenol o catecol respectivamente. Los resultados observados por Lloyd-George y Chang<sup>58</sup> fueron primeramente con respecto al crecimiento de las células de *E. herbicola* en el caldo de cultivo, en el cual la cantidad de biomasa en la fase estacionaria (creciendo a 32°C) dependió de la cantidad de aereación controlada por revoluciones por minuto (rpm). Estos estudios sugirieron que el inóculo con actividad tirosinofenolasa podría ser obtenido por crecimiento de las células a 180 rpm y 32°C o menos. Concluyeron además que la actividad tirosinofenolasa de las células se incrementaba en la fase estacionaria. La conversión de amonio, piruvato y fenol a L-tirosina se efectuó a 27°C, mientras que la conversión de amonio, piruvato y catecol a L-DOPA se llevo a cabo a 37°C. La conversión de los sustratos a L-DOPA comparada con la conversión de los sustratos pertinentes para L-tirosina, fue baja. Conforme la concentración de catecol se incrementó desde 10 hasta 40 mM, hubo una reducción en la cantidad de L-DOPA producida, pero el efecto no fue significativo. Cuando la reacción para la síntesis de L-DOPA se llevó a cabo bajo condiciones de



luminosidad, significativamente se produjo más dopa que cuando la reacción se llevó a cabo en condiciones de oscuridad.

Enei y Yamada<sup>29</sup> estudiaron las condiciones de reacción para la síntesis de L-DOPA por células intactas de *Erwinia herbicola* conteniendo alta actividad TFL. El pH óptimo para esta reacción fue alrededor de 8.0, y el rango óptimo de temperatura de 15-25°C. Agregaron sulfito de sodio y EDTA para bloquear la descomposición de la L-DOPA sintetizada. Debido a que altas concentraciones de pirocatecol desnaturalizaban la enzima, cada sustrato fue alimentado para mantener la concentración óptima durante la incubación. Las células obtenidas a partir de 100 mL de medio de cultivo fueron añadidas a 100 mL de mezcla reaccionante.

Estos investigadores también estudiaron la reacción de síntesis utilizando DL-serina como sustrato; en este caso la mezcla reaccionante (100 mL) contenía 4.0 g de DL-serina, 0.7 g de pirocatecol, 5.0 g de acetato de amonio y las células, y posteriormente fue incubada. El pirocatecol fue añadido a intervalos de tiempo durante la incubación para mantener la concentración inicial. Bajo estas condiciones lograron sintetizar 5.1 g de L-DOPA.

También se probó la reacción con piruvato de sodio como sustrato; se incubó una mezcla reaccionante (100 mL) que contenía 0.5 g de piruvato de sodio, 0.8 g de pirocatecol, 5.0 g de acetato de amonio, y las células. El piruvato de sodio y el pirocatecol fueron añadidos a intervalos. Bajo estas condiciones, fueron sintetizados 5.8 g de L-DOPA .

En México se han realizado investigaciones sobre el empleo de células libres e inmovilizadas en calidad de catalizadores para la producción de

aminoácidos. En el caso de la L-tirosina, se ha producido a partir de fenol, piruvato de sodio y acetato de amonio, utilizando como catalizador células de *Citrobacter freundii* con alta actividad tirosinfenoliasa<sup>81,82,83,84,86</sup>.

## METODOLOGÍA

### FUENTE DE ENZIMA.

Como biocatalizador de esta reacción se emplearon células completas de *Citrobacter freundii* con actividad tirosinfenoliasa (TFL) obtenidas del cepario del Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma de Coahuila. Esta cepa es utilizada tanto para síntesis de L-tirosina como para síntesis de L-DOPA, siendo la diferencia uno de los sustratos empleados ya que para tirosina se emplea fenol y para DOPA éste es sustituido por catecol.

### CONSERVACIÓN Y PROPAGACIÓN DE LAS CÉLULAS DE *C. freundii*.

Las células de *C. freundii* se cultivaron, para su conservación, en agar bacteriológico (Bioxon) (pH 7.0), de acuerdo con lo señalado por Contreras<sup>17</sup> y Cortés<sup>18</sup>. El medio de cultivo se esterilizó en autoclave a 1.5 kg/cm<sup>2</sup> y 120°C por 15 minutos y se colocó en tubos de cultivo para su solidificación. Las células se sembraron por estría y se incubaron a 30-32°C por 24 horas. Transcurrido este tiempo, las células se conservaron en refrigeración a 4°C.

Para la obtención del biocatalizador las células se cultivaron en medio líquido de referencia<sup>27</sup> modificado por Cortés<sup>18</sup>, ajustando el pH a 7.0 antes de

su esterilización. La propagación de las células se realizó inoculando 0.1 mL de suspensión celular de un cultivo de 24 horas, en 100 mL de medio de cultivo líquido.

El cultivo se realizó en matraces Erlenmeyer de 1000 mL, a una temperatura de 30-32°C con agitación constante (250 rpm) durante 12 horas. Una vez transcurrido este tiempo, se obtuvo la biomasa mediante centrifugación a 7,000 rpm durante 20 minutos a 4°C. Se desechó el sobrenadante y se procedió a suspender las células en 3 mL de amortiguador de fosfatos (0.01 M, pH de 8.5). La suspensión celular se empleó como biocatalizador en cada uno de los estudios realizados.

## **DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA CELULAR.**

Puesto que este estudio se realizó utilizando como catalizadores células completas de *C. freundii*, es de gran importancia conocer la cantidad total de proteína celular para, con este dato, poder realizar el cálculo de la actividad enzimática. Para este fin se preparó una dilución de 1:500 a partir de la suspensión celular; la cuantificación de la concentración de proteína celular se realizó de acuerdo con el método de Peterson, descrito y modificado por Gorina y Yakovleva<sup>41</sup>.

## **DISEÑO EXPERIMENTAL**

Para cada uno de los experimentos el diseño experimental fue completamente al azar. Una vez obtenidos los resultados se realizó un análisis

de varianza y una prueba de Scheffé de comparación de medias a fin de establecer los niveles responsables de las diferencias, en caso de haberlas, entre tratamientos.

## **ESTUDIO CINÉTICO DE LA REACCIÓN DE SÍNTESIS DE L-DOPA UTILIZANDO CÉLULAS LIBRES DE *C. freundii* CON ACTIVIDAD TFL.**

Para todos los casos descritos a continuación se utilizaron reactores tipo batch de mezclado ideal en los cuales se colocaron 3 mL de suspensión celular y un volumen de 30 mL de mezcla reaccionante. Esta mezcla reaccionante contenía, además de cantidades variables de catecol, piruvato de sodio y acetato de amonio, 0.2% de sulfito de sodio y 0.1% de EDTA de acuerdo a lo señalado por Enei *et al.*<sup>29</sup>, estos dos últimos compuestos son utilizados a fin de disminuir el grado de oxidación del catecol.

Además, fue importante certificar que la actividad TFL de las células de *C. freundii* era expresada correctamente, por lo que en cada caso se colocó un reactor (control) funcionando bajo las condiciones señaladas como óptimas para la síntesis de L-tirosina<sup>17,18</sup>, reacción ampliamente estudiada y de más fácil manejo que la de síntesis de L-DOPA.

En todos los experimentos el seguimiento de la reacción se hizo determinando cuantitativamente la presencia de L-DOPA mediante la formación de un complejo con el reactivo de ninhidrina según la metodología descrita por Voivodov *et al.*<sup>106</sup>. Las alícuotas para el monitoreo se tomaron y procesaron de la siguiente manera: se tomaron 0.5 mL de muestra directamente del reactor,

centrifugando para separar biomasa y tomando 0.1 mL del sobrenadante para diluir en 3 mL de agua destilada; de esta dilución se tomó 1 mL y se mezcló con 1 mL de solución de ninhidrina para posteriormente calentar a 100°C durante 3 minutos; se enfrió rápidamente en hielo y se realizó entonces la lectura espectrofotométrica a una longitud de onda de 508 nm. Las lecturas se compararon con una curva de calibración previamente establecida.

En todos los estudios realizados la reacción fue monitoreada durante 30 horas tomando alícuotas a las 0, 1, 2, 3, 8, 24 y 30 horas. Estos tiempos fueron determinados previamente al realizar monitoreos cada hora durante 30 horas, encontrándose que con los tiempos mencionados se podía cubrir de manera aceptable el comportamiento cinético de la reacción.

### **Estudio de la Influencia de la Temperatura Sobre la Reacción de Síntesis de L-DOPA Catalizada por Células Libres de *C. freundii* con Actividad TFL.**

La temperatura es uno de los factores que influyen sobre la velocidad de una reacción enzimática. Este efecto puede deberse a diferentes causas. Puede ser un efecto sobre la estabilidad de la enzima; un efecto sobre la velocidad de rompimiento del complejo enzima sustrato, determinado por el calor de activación de la reacción; un efecto sobre la afinidad de la enzima por el sustrato o por activadores o inhibidores; o incluso a un cambio en la concentración de oxígeno disuelto<sup>23</sup>.

Para este estudio se varió la temperatura de reacción a fin de determinar la óptima para la síntesis del aminoácido. Las temperaturas probadas se

seleccionaron de manera que se cubrieran los rangos encontrados en la literatura para la reacción de síntesis de L-DOPA utilizando la actividad TFL y éstas fueron: 15<sup>o</sup>C, 20<sup>o</sup>C, 25<sup>o</sup>C, 30<sup>o</sup>C, 35<sup>o</sup>C, 40<sup>o</sup>C y 45<sup>o</sup>C. El resto de las condiciones de reacción se mantuvieron constantes y fueron las siguientes<sup>58</sup>: pH, 8.0; catecol: 0.03 M; acetato de amonio: 0.1 M, piruvato de sodio: 0.08 M, sulfito de sodio: 0.2% y EDTA: 0.1%. En especial, las concentraciones de los sustratos fueron tomadas de la literatura<sup>58</sup> y se escogieron por ser aquellas en las que se manejaba una concentración menor de catecol; de esta manera, podíamos estar seguros de que no tendríamos efectos de inhibición por sustrato o problemas de oxidación del catecol que resultaran en mediciones poco confiables de los valores de velocidad inicial y actividad enzimática al estudiar temperatura.

#### **Estudio de la Influencia del pH Sobre la Reacción de Síntesis de L-DOPA Catalizada por Células Libres de *C. freundii* con Actividad TFL.**

Otro de los factores importantes en los estudios cinéticos es el pH. En general, las enzimas son activas sólo en un rango limitado de pH y en la mayoría de los casos se observa un pH óptimo. Este óptimo puede deberse a un verdadero efecto reversible sobre la velocidad en sí misma, a un efecto del pH sobre la afinidad, o a un efecto del pH sobre la estabilidad de la enzima, la cual puede ser destruida irreversiblemente con valores a ambos lados del óptimo. Estos efectos pueden incluso ocurrir en combinación<sup>23</sup>.

Para este estudio se varió el pH de la reacción a fin de determinar el óptimo para la síntesis de L-DOPA. Los pH probados fueron: 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0 y 9.5, cubriendo así los rangos de pH encontrados en la literatura para esta reacción de síntesis de L-DOPA. El resto de las condiciones de reacción se mantuvo constante y fueron como se especificó en el punto anterior, a 30°C.

### **Estudio de la Influencia de la Concentración de Catecol, Piruvato de Sodio y Acetato de Amonio Sobre la Reacción de Síntesis de L-DOPA Catalizada por Células Libres de *C. freundii* con Actividad TFL.**

#### **a) Catecol.**

La concentración de sustrato es uno de los factores más importantes que determinan la velocidad de una reacción enzimática. En la mayoría de los casos, cuando la velocidad inicial es graficada contra la concentración de sustrato se obtiene una sección de una hipérbola rectangular, lo cual señala un incremento en la velocidad al aumentar la concentración del sustrato, por lo menos hasta alcanzar un máximo<sup>23</sup>. Sin embargo, en ciertos casos la velocidad puede disminuir a concentraciones altas de sustrato debido a efectos de inhibición causados por el mismo sustrato<sup>23</sup>.

La gran mayoría de las reacciones catalizadas por enzimas involucran más de un sustrato, pero es posible considerarlas como si se tratase de un sólo sustrato si sólo uno de ellos se deja como limitante, estando el resto a concentraciones relativamente altas de tal forma que la enzima esté saturada con ellos todo el tiempo<sup>23</sup>.



De acuerdo con lo anterior, en este trabajo se estudió el efecto de la concentración de cada uno de los tres sustratos de la reacción: catecol, piruvato de sodio, y acetato de amonio.

Para este estudio se variaron las concentraciones de catecol a fin de determinar el óptimo para la síntesis de L-DOPA. Las concentraciones probadas fueron (M): 0.03, 0.05, 0.075, 0.10, 0.125, 0.150, 0.175. Estas concentraciones fueron escogidas ya que abarcan el rango de concentraciones encontradas en la literatura para la síntesis de L-DOPA. El resto de las condiciones de reacción se mantuvo constante y fueron las siguientes: temperatura: 30°C; pH: 7.5; acetato de amonio: 0.45 M, piruvato de sodio: 0.12 M (estos dos últimos valores de acuerdo con Cortés<sup>18</sup> y Rangel<sup>79</sup> para la síntesis de L-tirosina); sulfito de sodio: 0.2% y EDTA: 0.1%. Las concentraciones de acetato de amonio y de piruvato de sodio se mantuvieron altas a fin de convertir al catecol en sustrato limitante.

#### b) Piruvato de Sodio.

Se realizó la misma metodología que para el caso anterior. Las concentraciones probadas fueron (M): 0.05, 0.08, 0.09, 0.12, 0.15, 0.18. El resto de las condiciones de reacción se mantuvieron constantes como en el punto anterior y la concentración de catecol usada fue de 0.075 M.

#### c) Acetato de Amonio.

Las concentraciones probadas para este sustrato fueron (M): 0.40, 0.45, 0.50, 0.60, 0.70, 0.80. El resto de las condiciones fueron similares a como se

reportó anteriormente. El catecol se utilizó a una concentración de 0.075 M y el piruvato de sodio a 0.15 M.

### **Estudio de la Influencia de la Cantidad de Catalizador Sobre la Reacción de Síntesis de L-DOPA Catalizada por Células Libres de *C. freundii* con Actividad TFL.**

Bajo condiciones dadas, dos moléculas de enzima actuando independientemente en solución transformarán una cantidad doble de sustrato que una sola molécula; la velocidad de reacción debe por lo tanto ser proporcional a la concentración del catalizador<sup>23</sup>. Sin embargo, la proporción directa se pierde cuando la concentración de sustrato presente en la solución no es mucho mayor que la cantidad de enzima, de tal manera que en algún momento el aumento de catalizador no genera un incremento significativo de la velocidad de reacción. Por ello, este es otro de los factores que deben considerarse en todo estudio cinético.

Para este estudio se variaron las cantidades de catalizador añadido a la mezcla reaccionante a fin de determinar la óptima para la síntesis de L-DOPA. Las cantidades probadas fueron (mL): 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, correspondientes a 1.2, 1.6, 2.2, 2.7 y 3.2 miligramos de proteína por mililitro de mezcla reaccionante, respectivamente. El resto de las condiciones de reacción se mantuvieron constantes.

La Figura 5 muestra la metodología general a seguir.

## **DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.**

La actividad enzimática (AE; en mmoles/mgxh) se valoró de acuerdo a la siguiente relación:

$$AE = \frac{v_0}{[Prot]}$$

donde  $V_0$  , la velocidad inicial de la reacción (en mmoles/mLxh), es la tangente de la pendiente en la gráfica de formación de producto en función del tiempo; y [Prot] (en mg/mL) es la concentración de proteína celular por mililitro de mezcla reaccionante (determinada por el método de Peterson modificado)<sup>41</sup>.

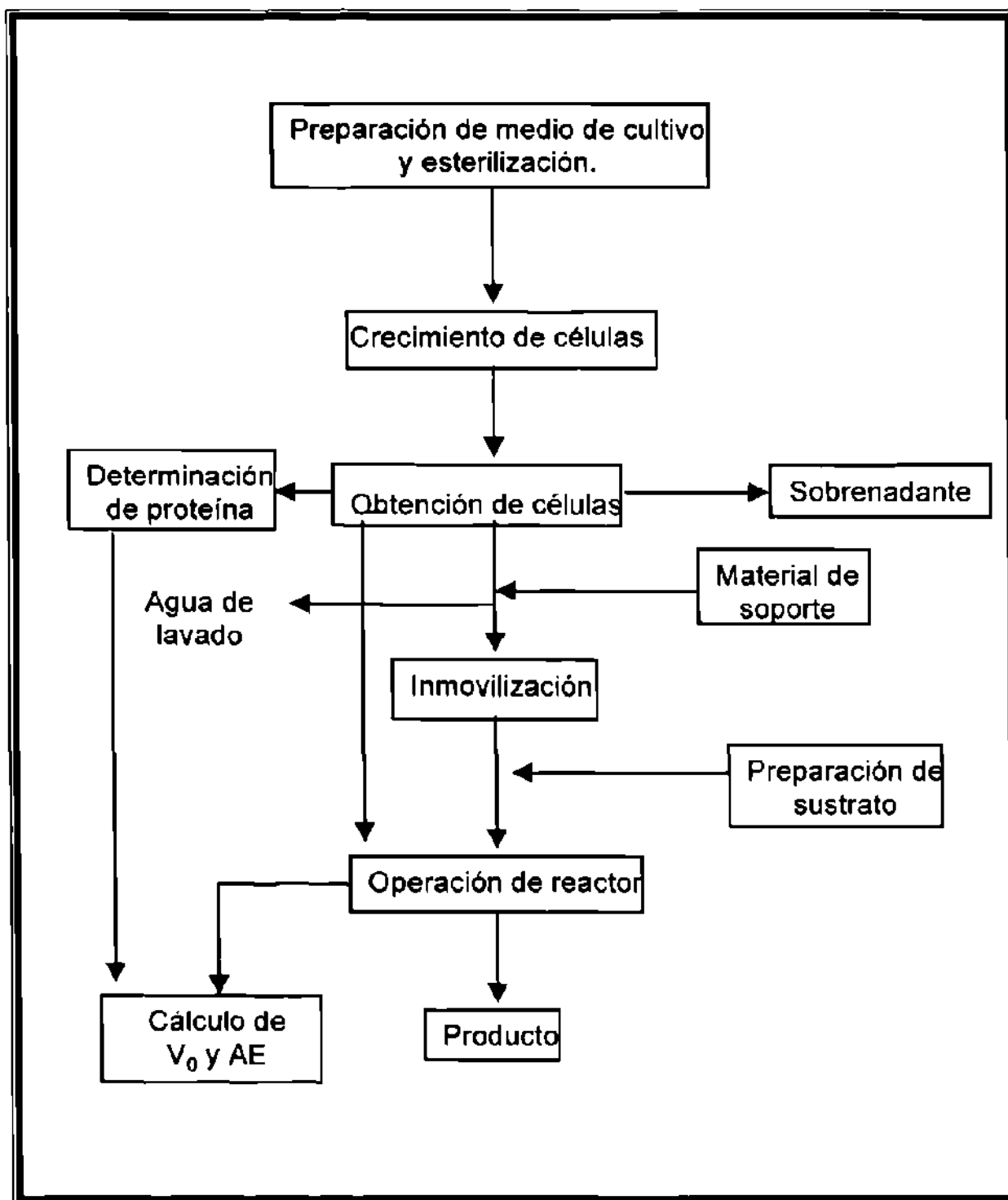


Figura 5. Representación generalizada de la secuencia a seguir para en el estudio cinético de la reacción de síntesis de L-DOPA utilizando como catalizadores células de *Citrobacter freundii* con actividad tirosinfenoliasa.

## **INMOVILIZACIÓN DE LAS CÉLULAS DE *C. freundii* CON ACTIVIDAD TFL EN GEL DE $\kappa$ -CARRAGENINA Y EN GEL DE ALCOHOL POLIVINÍLICO (PVA).**

A fin de determinar la posibilidad de utilizar células de *C. freundii* inmovilizadas en calidad de catalizador para la síntesis de L-DOPA, se probaron dos soportes para inmovilizar al microorganismo por atrapamiento: gel de  $\kappa$ -carragenina y gel de alcohol polivinílico (PVA).

La técnica de inmovilización en carragenina es una de las técnicas más ampliamente utilizadas debido a que es económica, simple y reproducible con una gran variedad de condiciones durante la inmovilización<sup>46</sup>. Las principales ventajas de este método son la alta densidad celular, las condiciones suaves de inmovilización y el bajo riesgo de pérdida celular del soporte. La concentración de carragenina empleada depende del tipo de carragenina utilizada, pero debe ser suficiente para producir un gel firme. Para su aplicación, el gel de carragenina puede usarse en diferentes formas: cubos, láminas o membranas<sup>46</sup>.

No obstante sus ventajas, el gel de carragenina es térmicamente reversible y a menudo se suaviza o desintegra a temperaturas elevadas, consecuentemente no es útil en aplicaciones que involucran temperaturas altas de reacción, como aquellas que emplean microorganismos termofílicos<sup>15,42</sup>.

El alcohol polivinílico (PVA) es un gel no tóxico que puede ser utilizado de manera económica para aplicaciones a escala industrial<sup>54</sup>. El uso de PVA para inmovilización de células ha atraído recientemente mucha atención, ya que

es un soporte termoestable<sup>3</sup>. La inmovilización en PVA puede realizarse por atrapamiento mediante el congelamiento y descongelamiento del gel (crioinmovilización), o bien mediante un entrecruzamiento utilizando ácido bórico. Una de las desventajas del segundo método es que el entrecruzamiento logrado en la estructura resulta en una pobre permeabilidad para gases del gel de PVA, lo cual puede causar acumulación de gases dentro de los gránulos haciéndolos flotar hacia la superficie de la solución dentro del reactor<sup>54</sup>. En este estudio se probó el método de crioinmovilización.

Las metodologías utilizadas para la inmovilización en cada uno de los soportes se describen a continuación.

#### **Inmovilización de las Células de *C. freundii* en Gel de $\kappa$ -carragenina.**

Se probaron 5 diferentes concentraciones de carragenina para la inmovilización<sup>55</sup>: 2%, 3%, 4%, 5%, 6%. La metodología empleada para la inmovilización fue la siguiente:

- Se colocó carragenina al porcentajes deseado en un vaso de precipitado de 50 mL y se agregaron 7 mL de una solución de cloruro de sodio 0.9%, dejando reposar por 10 minutos.
- Para la formación del gel se colocó la muestra en un baño de agua caliente (80°C) hasta la disolución completa de la carragenina. Se dejó enfriar a 45°C y se agregaron 3 mL de suspensión de células (aproximadamente 1.6 mg de

proteína por mL) de *C. freundii*; se homogeneizó y se colocó el vaso durante 20 minutos en una placa de hielo.

- El gel se pasó entonces a un vaso de precipitado de 250 mL que contenía 100 mL de una solución de cloruro de potasio 0.03 M y se dejó en refrigeración a 4°C durante 12 horas<sup>85</sup>.
- La pastilla de gel se pasó entonces a través de un tamiz con diferente malla para la obtención de gránulos<sup>85</sup>.

Una vez obtenidos, los gránulos se lavaron en 50 mL de agua destilada. A esta agua de lavado se le determinó la concentración de proteína a fin de conocer la cantidad atrapada dentro del soporte. Este dato fue utilizado para conocer el porcentaje de inmovilización de acuerdo a la siguiente relación:

$$\%inmv. = \frac{[Proteína \text{ atrapada}]}{[Proteína \text{ Total}]}$$

#### **Inmovilización de las Células de *C. freundii* en Gel de Alcohol Polivinílico.**

Se probaron 4 concentraciones diferentes de solución de PVA (porcentaje de hidrolización 98-99%, peso molecular promedio 124,000-186,000) para la inmovilización: 8%, 9%, 10%, 11%. La metodología empleada para la inmovilización de describe a continuación:

- Se preparó una solución de PVA al porcentaje deseado y se calentó hasta disolverla. Posteriormente se dejó enfriar.
- Las células de *C. freundii* fueron añadidas al alcanzar la solución una temperatura de entre 30 y 40°C y se agitó vigorosamente para homogeneizar la mezcla.
- El gel fue congelado a una temperatura de -20°C durante 24 horas.
- Los gránulos fueron colocados en un desecador y descongelados lentamente a temperatura de refrigeración (4°C) durante 6 horas.
- Una vez pasado el tiempo, el gel fue cortado en gránulos de aproximadamente 1 mm por lado.

Los gránulos se lavaron en 50 mL de agua destilada. A esta agua de lavado también se le determinó la concentración de proteína. Este dato fue utilizado para conocer el porcentaje de inmovilización de acuerdo a la siguiente relación:

$$\%inmv. = \frac{[Proteína \text{ atrapada}]}{[Proteína \text{ Total}]}$$



## **Estudio Sobre la Capacidad de Retención de las Células por Parte de los Diferentes Soportes Empleados para la Inmovilización.**

Dado que la reacción de síntesis de L-DOPA es relativamente larga (por lo menos 12 horas utilizando células libres bajo condiciones óptimas en reactores tipo batch), es importante que el soporte utilizado para la inmovilización tenga la capacidad de retener en su interior a las células durante el tiempo de reacción. Debido a ello las células inmovilizadas en cada uno de los soportes para cada una de las concentraciones probadas fueron colocadas en 30 mL de agua destilada y sometidas a las condiciones de agitación en reactores batch (250 rpm) durante el tiempo de reacción, determinando la concentración de proteína (utilizando el método de Peterson modificado<sup>41</sup>) en el medio acuoso a las 0, 2, 4, 8 y 24 horas.

## **Influencia de la Concentración de Carragenina Sobre la Actividad Enzimática de las Células de *C. freundii* con Actividad TFL en la Reacción de Síntesis de L-DOPA.**

Una concentración excesiva del soporte puede ocasionar la compactación del tamaño del poro y, por lo tanto, dificultar los procesos de difusión hacia el interior o exterior del soporte; así mismo, una concentración baja ocasionaría que el tamaño del poro fuera grande, lo que favorecería la pérdida de las células.

Para este estudio se procedió a colocar gránulos de aproximadamente 1 mm<sup>3</sup> de células inmovilizadas en 30 mL de mezcla reaccionante (catecol, 0.075 M; piruvato de sodio, 0.15 M; acetato de amonio, 0.6 M, pH, 7.5; temperatura, 30°C; sulfito de sodio, 0.2%; EDTA, 0.1%) en reactores batch a 250 rpm, tomando alícuotas y monitoreando la presencia de L-DOPA como se especificó anteriormente. Las concentraciones de carragenina probadas fueron 0% (células libres), 3%, 4%, 5% y 6%. La actividad enzimática fue estimada de acuerdo a lo previamente señalado

### **Influencia del Tamaño de Gránulo Sobre la Actividad Enzimática de las Células de *C. freundii* con Actividad TFL en la Reacción de Síntesis de L-DOPA.**

Otro de los factores que tienen influencia sobre los procesos de biocatálisis empleando células inmovilizadas es el tamaño del gránulo de soporte. Esto es debido a la superficie de exposición al sustrato que se presenta con los diferentes tamaños de gránulo que pueden emplearse en el medio reaccionante. En este estudio se probaron 3 tamaños de gránulo, de acuerdo al estudio realizado por Ruelas<sup>85</sup>: 1 mm<sup>3</sup>, 2 mm<sup>3</sup> y 3 mm<sup>3</sup>.

El gel de carragenina conteniendo la células inmovilizadas fue pasado a través de tamices con diferente tamaño de malla para generar los diferentes tamaños de gránulo. Una vez obtenido, los gránulos fueron colocados en 30 mL de mezcla reaccionante en reactores batch a 250 rpm, tomando alícuotas y

monitoreando la presencia de L-DOPA como se especificó anteriormente. La actividad enzimática fue estimada de acuerdo a lo señalado previamente.

### **ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA, EL pH Y LA CONCENTRACIÓN DE LOS SUSTRATOS SOBRE LA REACCIÓN DE SÍNTESIS DE L-DOPA UTILIZANDO CÉLULAS DE *C. freundii* CON ACTIVIDAD TFL INMOVILIZADAS EN GEL DE $\kappa$ -CARRAGENINA.**

Los estudios realizados con células libres de *C. freundii* con actividad TFL para la síntesis de L-DOPA fueron repetidos utilizando las células inmovilizadas en carragenina.

Los parámetros estudiados con sus respectivos niveles fueron:

- Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ): 20, 25, 30 y 35
- pH: 6.5, 7.0, 7.5 y 8.0.
- Concentración de catecol (M): 0.05, 0.075, 0.10, 0.125, 0.150.
- Concentración de piruvato de sodio (M): 0.09, 0.12, 0.15, 0.18.
- Concentración de acetato de sodio (M): 0.45, 0.50, 0.60, 0.70

El resto de las condiciones empleadas fueron las mismas que para el estudio cinético utilizando células libres. Considerando lo anterior, el seguimiento de la reacción y la determinación de formación de L-DOPA fue realizado de acuerdo con lo antes señalado. La actividad enzimática fue

estimada de acuerdo a lo especificado anteriormente, salvo que la concentración de proteínas correspondió a aquella inmovilizada dentro del gel.

Para todos los casos se utilizó un diseño experimental completamente al azar, determinando las diferencias entre tratamientos mediante la prueba de rangos de Scheffé.

## RESULTADOS

### ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA SOBRE LA REACCIÓN DE SÍNTESIS DE L-DOPA CATALIZADA POR CÉLULAS LIBRES DE *C. freundii* CON ACTIVIDAD TFL.

La Figura 6 muestra la influencia de la temperatura sobre la velocidad inicial de la reacción de síntesis de L-DOPA catalizada por células libres de *C. freundii* con actividad TFL; estas velocidades fueron calculadas en base a las cinéticas de producción de L-DOPA mostradas en la Figura 7. Los valores de velocidad inicial y actividad enzimática en función de la temperatura se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Influencia de la temperatura sobre la reacción de síntesis de L-DOPA catalizada por células de *C. freundii* con actividad TFL.

Temperatura (°C)	Velocidad Inicial x 10 <sup>1</sup> ± SD x 10 <sup>2</sup> (mmoles/mLxh) <sup>a</sup>	Actividad Enzimática x 10 <sup>4</sup> ±SD x 10 <sup>5</sup> (mmoles/mgxh) <sup>a,b</sup>
15	0.3217±0.19	5.6343±0.37 a
20	0.5678±0.23	9.9445±0.36 b
25	1.0190±2.76	17.846±5.11 c
30	1.2999±1.28	22.766±2.38 c

<sup>a</sup> Media ± Desviación estándar, n=5

<sup>b</sup> Valores de actividad enzimática seguidos por letras distintas indican diferencias significativas (p<0.05) de acuerdo a la prueba de rango de Scheffé.

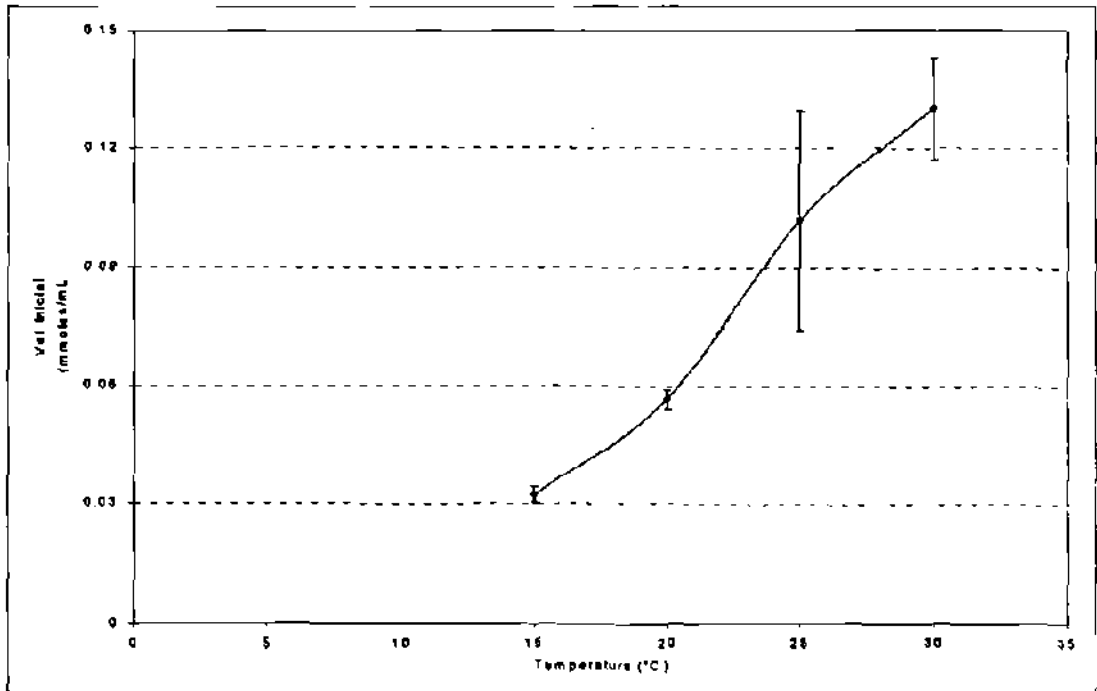


Figura 6. Influencia de la temperatura sobre la velocidad inicial en la reacción de síntesis de L-DOPA catalizada por células libres de *C. freundii* con actividad TFL.

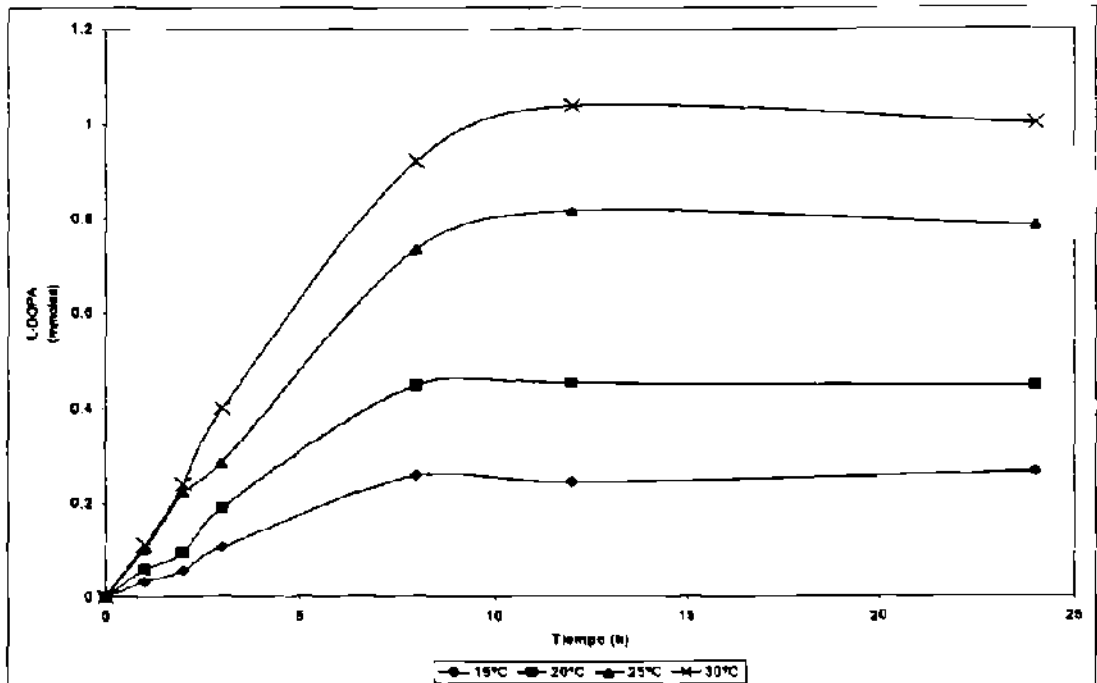


Figura 7. Cinética de formación de L-DOPA en la reacción de síntesis catalizada por células libres de *C. freundii* con actividad TFL bajo diferentes condiciones de temperatura.

El análisis de varianza para la influencia de la temperatura sobre la actividad enzimática mostró diferencias significativas entre los tratamientos.

### **ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL pH SOBRE LA REACCIÓN DE SÍNTESIS DE L-DOPA CATALIZADA POR CÉLULAS LIBRES DE *C. freundii* CON ACTIVIDAD TFL.**

La Figura 8 muestra la influencia del pH sobre la velocidad inicial, de la reacción de síntesis de L-DOPA catalizada por células libres de *C. freundii* con actividad TFL, velocidades calculadas a partir de las cinéticas de producción de L-DOPA graficadas en la Figura 9. Los valores de velocidad inicial y actividad enzimática en función del pH se muestran en la Tabla 7.

Se observa que tanto la velocidad inicial como la actividad enzimática se incrementan conforme se incrementa el valor de pH, hasta alcanzar un máximo muy notorio a pH de 7.5. A pH de 9.0 aparece un ligero incremento, el cual puede ser explicado por la coloración que la mezcla reaccionante adquiere por efecto, probablemente, de la oxidación del catecol. A partir de este valor los resultados no son confiables ya que el sustrato ha experimentado modificación y la reacción seguramente ya no se lleva a cabo de manera óptima.

El análisis de varianza realizado para determinar la influencia del pH sobre la actividad enzimática mostró diferencias entre los tratamientos.

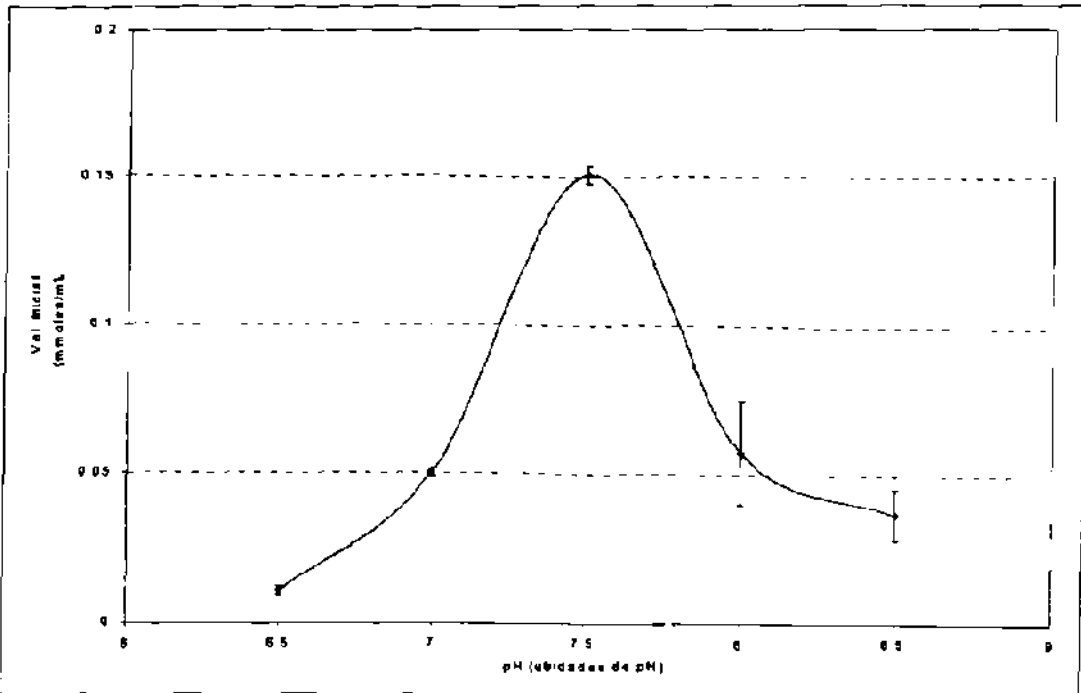


Figura 8. Influencia del pH sobre la velocidad inicial en la reacción de síntesis de L-DOPA catalizada por células libres de *C. freundii* con actividad TFL.

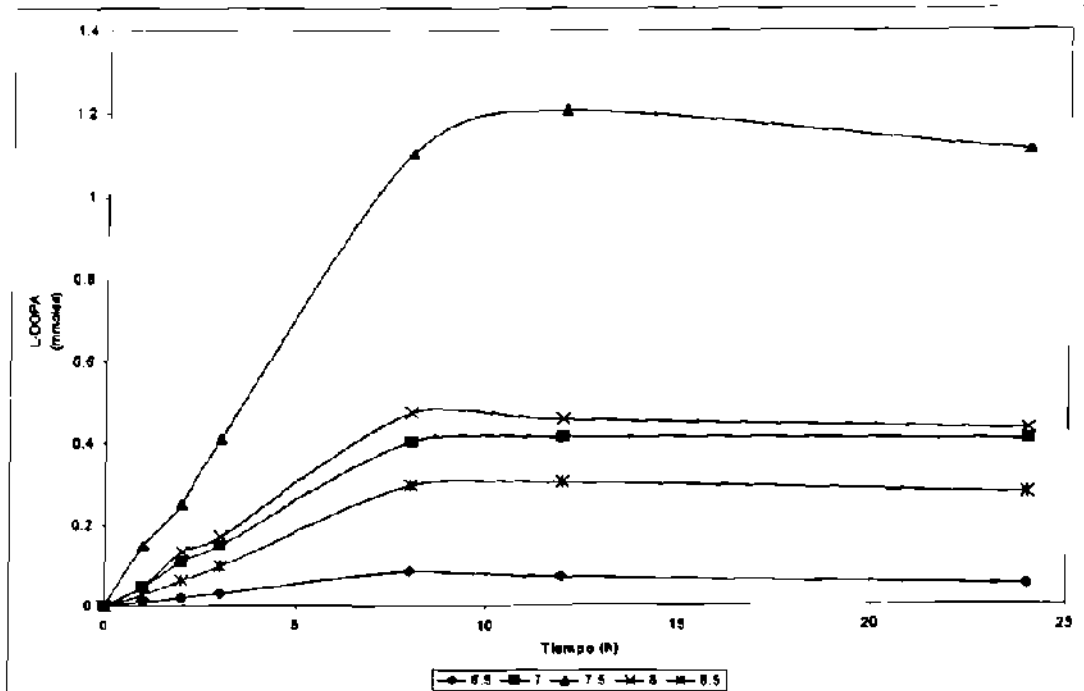


Figura 9. Cinética de formación de L-DOPA en la reacción de síntesis catalizada por células libres de *C. freundii* con actividad TFL bajo diferentes condiciones de pH.



Tabla 7. Influencia del pH sobre la reacción de síntesis de L-DOPA catalizada por células de *C. freundii* con actividad TFL.

pH (unidades de pH)	Velocidad Inicial x 10 <sup>1</sup> ±SD x 10 <sup>2</sup> (mmoles/mLxh) <sup>a</sup>	Actividad Enzimática x 10 <sup>4</sup> ±SD x 10 <sup>4</sup> (mmoles/mg <sup>x</sup> h) <sup>a,b</sup>
6.5	0.1065±0.15	2.8950±0.30 a
7.0	0.5039±0.16	13.697±0.76 b
7.5	1.5066±0.29	40.955±0.94 c
8.0	0.5744±1.79	15.614±4.36 b
8.5	0.3704±0.85	10.068±2.77 d

<sup>a</sup> Media ± Desviación estándar; n=5

<sup>b</sup> Valores de actividad enzimática seguidos por letras distintas indican diferencias significativas (p<0.05) de acuerdo a la prueba de rango de Scheffé.

## ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE CATECOL, PIRUVATO DE SODIO Y ACETATO DE AMONIO SOBRE LA REACCIÓN DE SÍNTESIS DE L-DOPA CATALIZADA POR CÉLULAS LIBRES DE *C. freundii* CON ACTIVIDAD TFL.

### a) Catecol.

La actividad tirosinofenolasa para la síntesis de L-DOPA fue medida a diferentes concentraciones de catecol, como ya se mencionó. Los resultados de este estudio se muestran en Tabla 8; la Figura 10 muestra la influencia de este factor sobre la velocidad inicial de la reacción; estas velocidades fueron calculadas a partir de las cinéticas de formación del producto mostradas en la Figura 11. La actividad fue máxima a una concentración de 0.075 M de catecol.

El análisis de varianza para la influencia de la concentración de catecol sobre la actividad enzimática mostró diferencias entre los tratamientos.

La primera parte de la curva de la Figura 10 sigue una cinética de Michaelis-Menten; para este rango de concentraciones se calculó una constante de Michaelis aparente ( $K_m$  app) de 0.023 M (Figura 12). La segunda parte de la curva de esta figura muestra una cinética de inhibición por sustrato.

Tabla 8. Influencia de la concentración de catecol sobre la reacción de síntesis de L-DOPA catalizada por células de *C. freundii* con actividad TFL.

[Catecol] (M)	Velocidad Inicial ±SD (mmoles/mLxh) <sup>a</sup>	Actividad Enzimática x 10 <sup>4</sup> ±SD x 10 <sup>4</sup> (mmoles/mgxh) <sup>a, b</sup>
0.03	0.2066±0.0307	40.826±9.78 a
0.05	0.3546±0.0216	70.061±4.21 b
0.075	0.4221±0.0261	83.396±4.65 c
0.10	0.3333±0.0470	65.852±9.06 d
0.125	0.2694±0.0303	53.227±5.44 e
0.150	0.2056±0.0199	40.621±2.66 a
0.175	0.1644±0.0366	32.481±7.20 f

<sup>a</sup> Media ± Desviación estándar; n=5

<sup>b</sup> Valores de actividad enzimática seguidos por letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) de acuerdo a la prueba de rango de Scheffé

#### b) Piruvato de Sodio.

Los resultados de este estudio se resumen en la Tabla 9 y en las Figuras 13 y 14. Se observa que los valores máximos para velocidad inicial y actividad enzimática fueron alcanzados a una concentración de 0.15 M.

El análisis de varianza para el efecto de la concentración de piruvato de sodio mostró diferencias significativas entre los tratamientos.

Como se observa en la Figura 13, la primera parte de la gráfica sigue una cinética de Michaelis-Menten. A partir de esto se calculó una  $K_m$  aparente de 0.063 M (Figura 15).

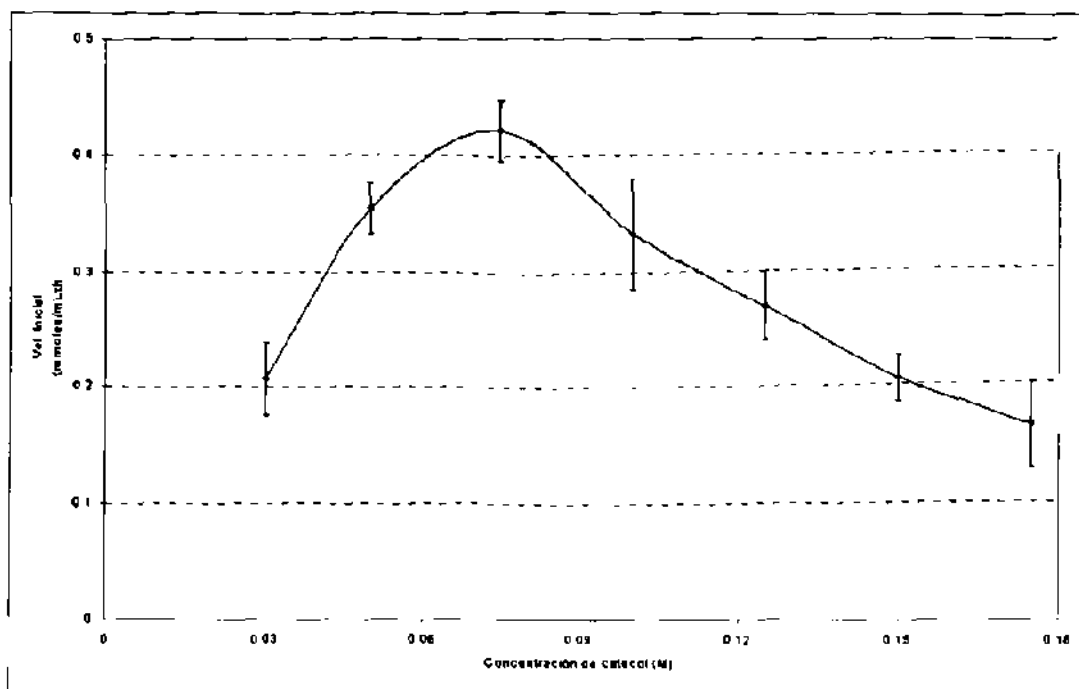


Figura 10. Influencia de la concentración de Catecol sobre la velocidad inicial en la reacción de síntesis de L-DOPA catalizada por células libres de *C. freundii* con actividad TFL.

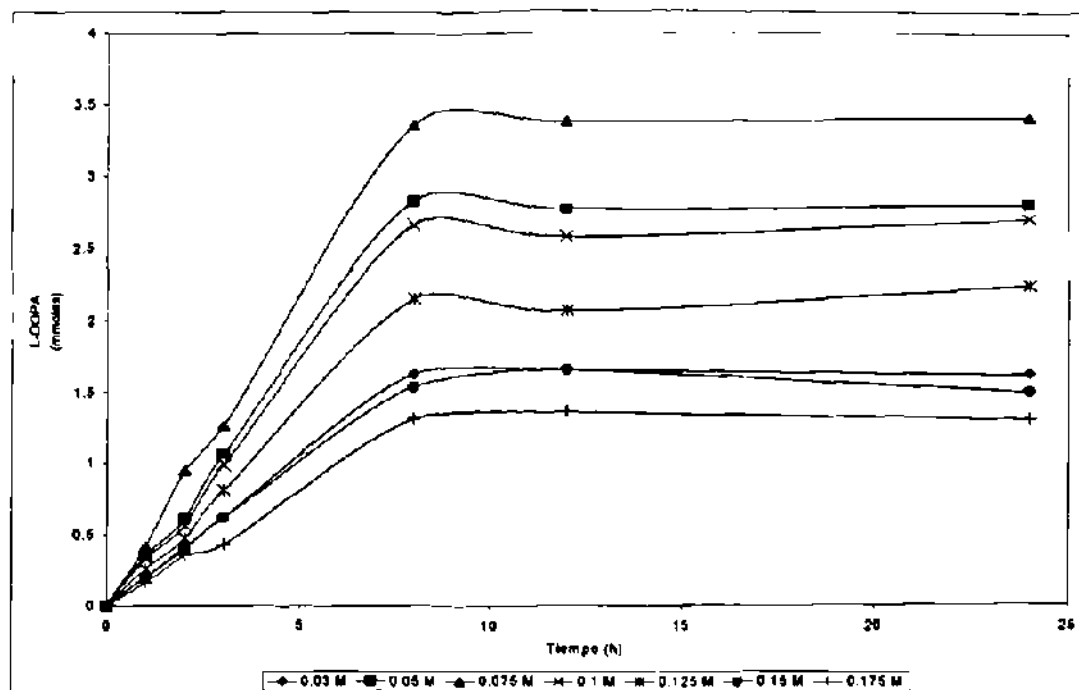


Figura 11. Cinética de formación de L-DOPA en la reacción de síntesis catalizada por células libres de *C. freundii* con actividad TFL a diferentes concentraciones de catecol.

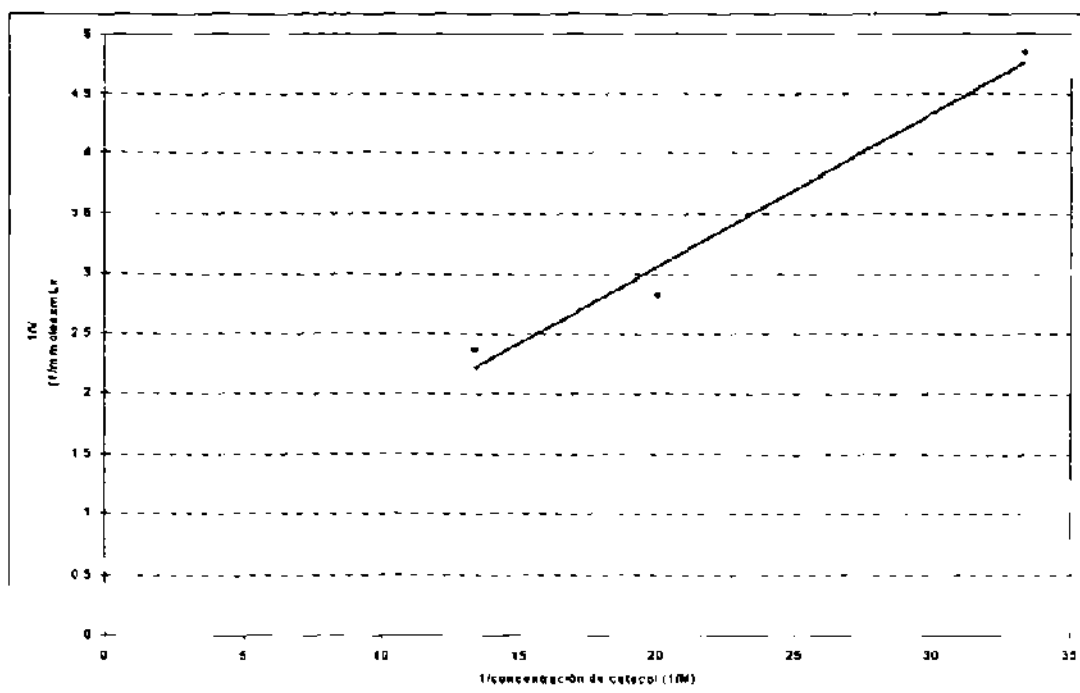


Figura 12 Gráfica de Lineweaver-Burk para la determinación de  $K_m$  y  $V_{max}$  para catecol;  $K_m = 0.023$  M,  $V_{max} = 0.5363$  mmoles/mLxh

Tabla 9. Influencia de la concentración de piruvato de sodio sobre la reacción de síntesis de L-DOPA catalizada por células de *C. freundii* con actividad TFL.

[Piruvato de sodio] (M)	Velocidad Inicial $\pm$ SD (mmoles/mLxh) <sup>a</sup>	Actividad Enzimática $\times 10^4 \pm$ SD $\times 10^3$ (mmoles/mgxh) <sup>a,b</sup>
0.05	0.4839 $\pm$ 0.0359	78.593 $\pm$ 0.64 a
0.08	0.6864 $\pm$ 0.0482	111.48 $\pm$ 0.86 b
0.09	0.7667 $\pm$ 0.0169	124.52 $\pm$ 0.30 c
0.12	0.8873 $\pm$ 0.0540	144.11 $\pm$ 0.93 d
0.15	1.0561 $\pm$ 0.1716	171.52 $\pm$ 2.90 e
0.18	0.6019 $\pm$ 0.0815	97.750 $\pm$ 0.94 f

<sup>a</sup> Media  $\pm$  Desviación estándar; n=5

<sup>b</sup> Valores de actividad enzimática seguidos por letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) de acuerdo a la prueba de rango de Scheffé

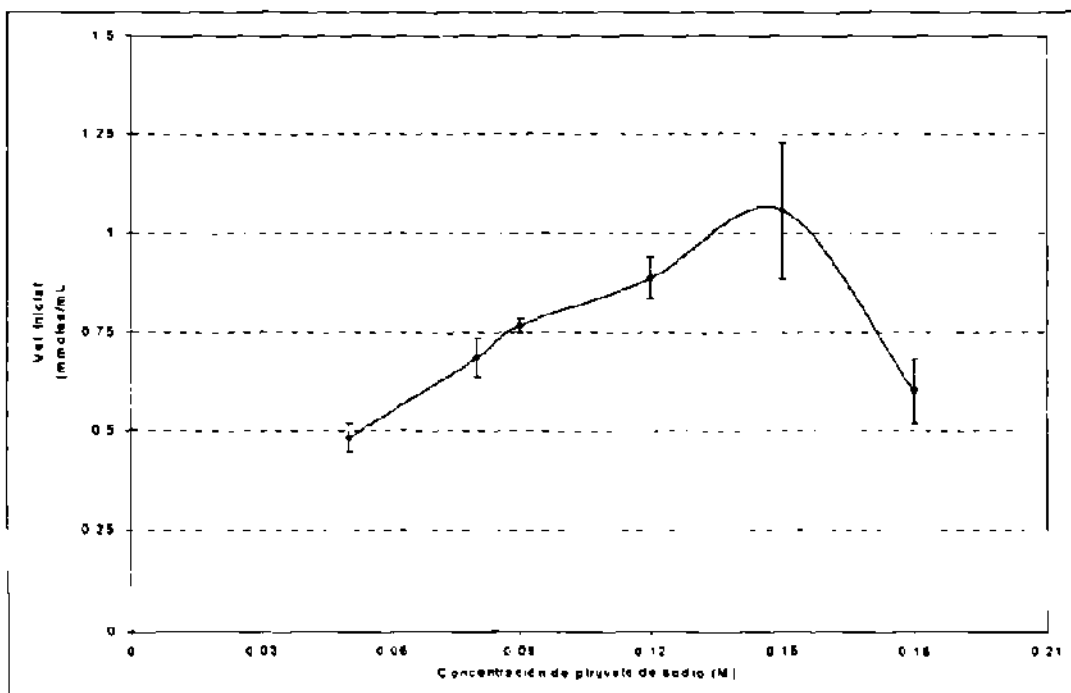


Figura 13 Influencia de la concentración de piruvato de sodio sobre la velocidad inicial en la reacción de síntesis de L-DOPA catalizada por células libres de *C. freundii* con actividad TFL.

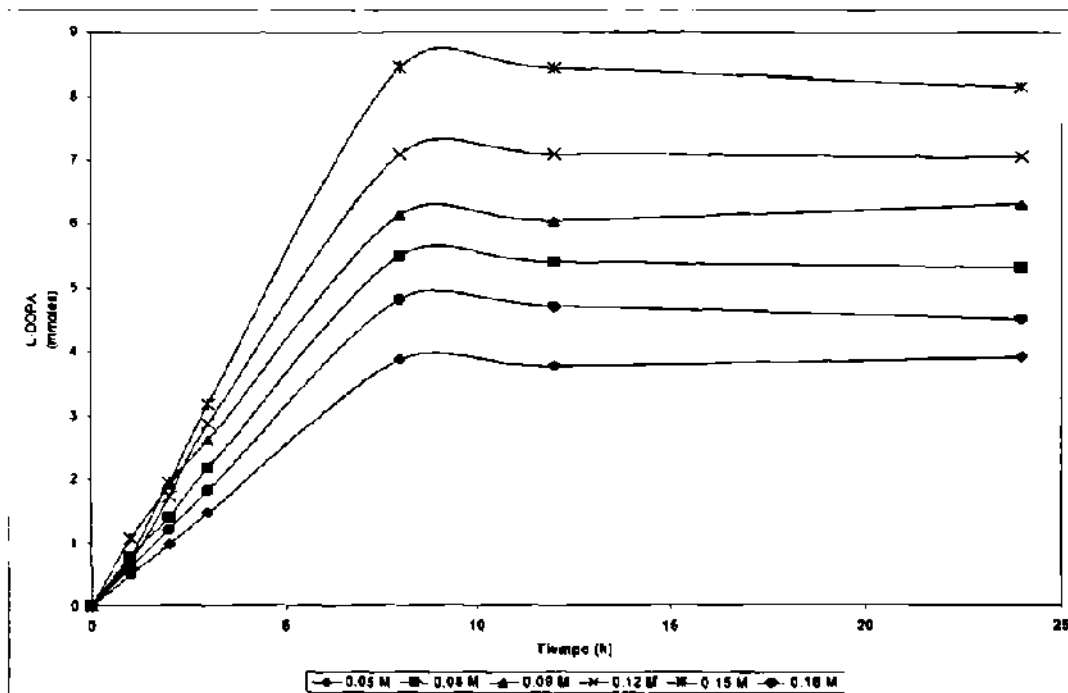


Figura 14 Cinética de formación de L-DOPA en la reacción de síntesis catalizada por células libres de *C. freundii* con actividad TFL a diferentes concentraciones de piruvato de sodio.

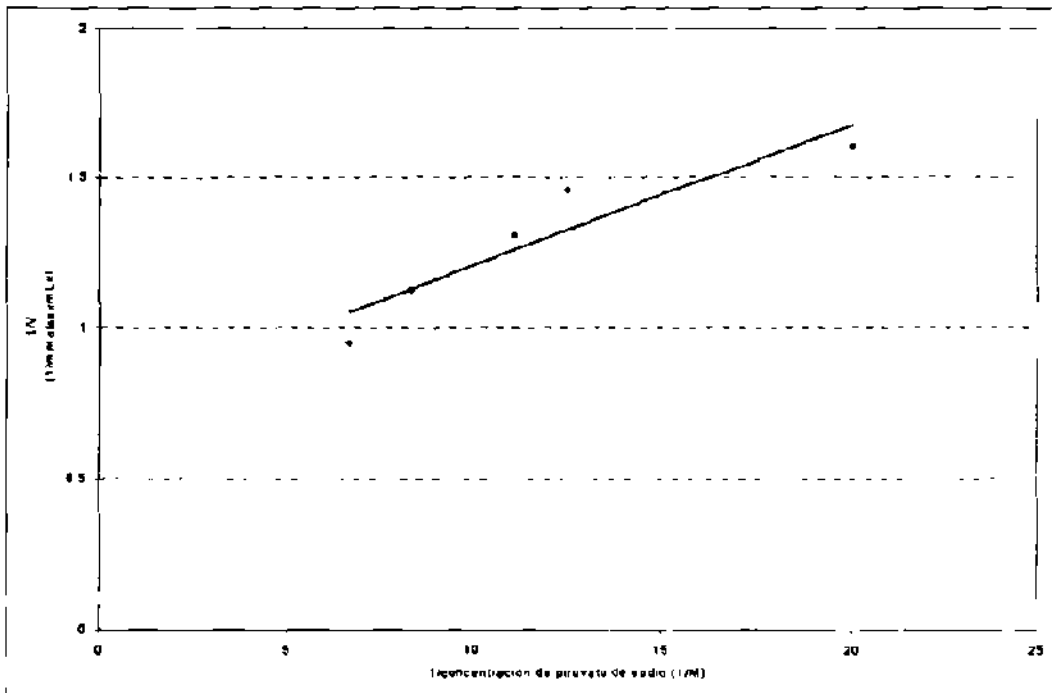


Figura 15 Gráfico de Lineweaver-Burk para la determinación de  $K_m$  y  $V_{max}$  para piruvato de sodio;  $K_m = 0.063 \text{ M}$ ,  $V_{max} = 1.355 \text{ mmoles/mLh}$

### c) Acetato de Amonio.

Los resultados de este estudio se observan en la Tabla 10 y en las Figuras 16 y 17. Como puede observarse los valores de velocidad inicial se incrementaron siguiendo una cinética de Michaelis-Menten hasta alcanzar un máximo a una concentración de acetato de amonio de 0.6 M. A partir de esto se calculó una  $K_m$  aparente de 0.30 M (Figura18). Un efecto similar se observó para la actividad enzimática; a las concentraciones mayores probadas en este estudio, no se observaron cambios significativos en los valores de ambos parámetros.

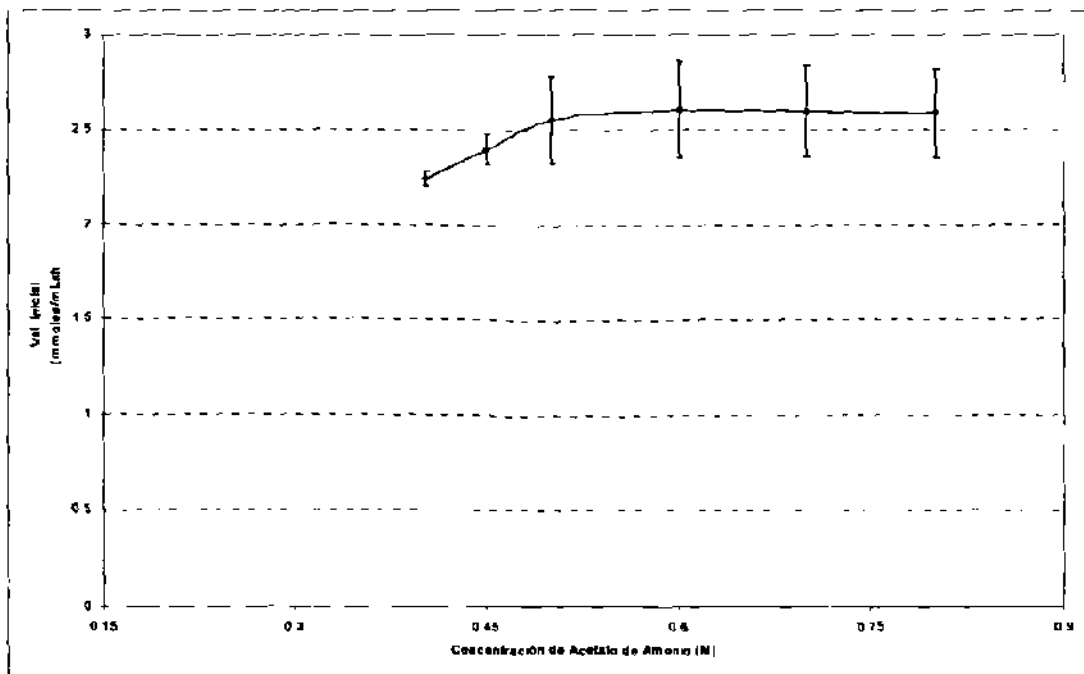


Figura 16. Influencia de la concentración de acetato de amonio sobre la velocidad inicial en la reacción de síntesis de L-DOPA catalizada por células libres de *C. freundii* con actividad TFL.

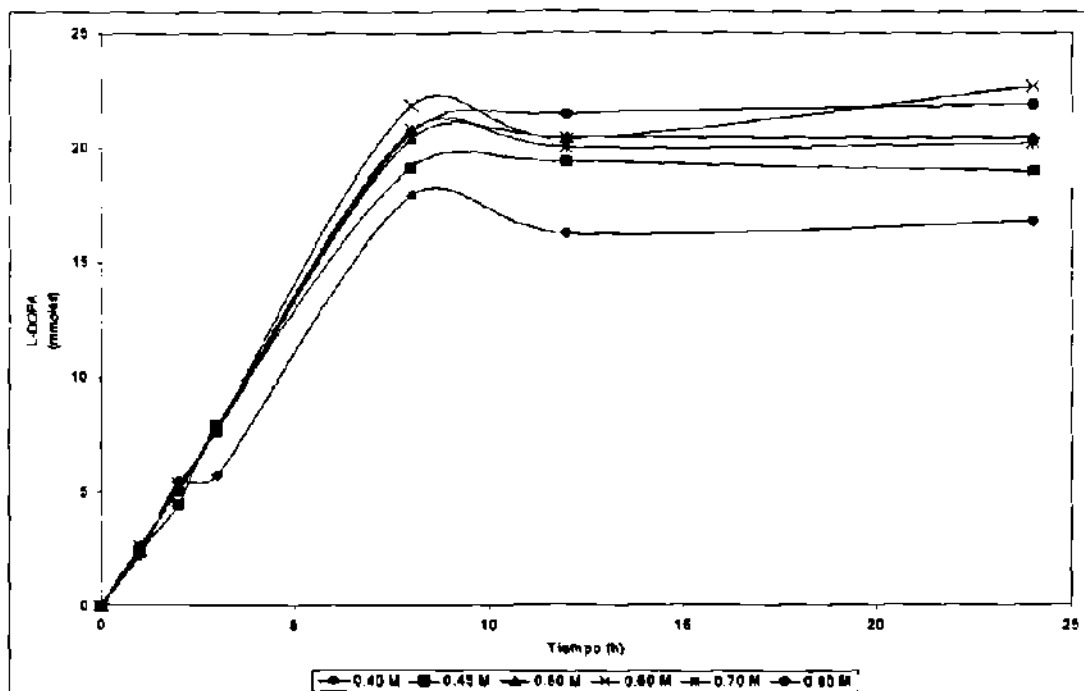


Figura 17. Cinética de formación de L-DOPA en la reacción de síntesis catalizada por células libres de *C. freundii* con actividad TFL a diferentes concentraciones de acetato de amonio.

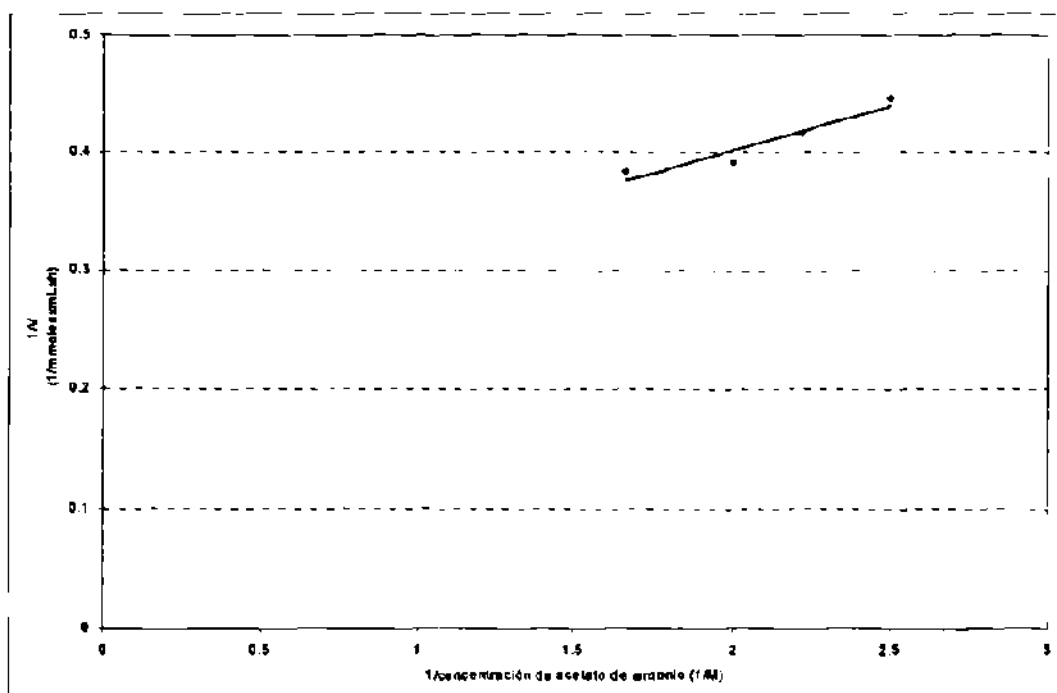


Figura 18. Gráfico de Lineweaver-Burk para la determinación de  $K_m$  y  $V_{max}$  para acetato de amonio.  
 $K_m = 0.30 \text{ M}$ ,  $V_{max} = 3.99 \text{ mmoles/mL.h}$

El análisis de varianza para la influencia de la concentración de acetato de amonio sobre la actividad enzimática mostró diferencias significativas entre los tratamientos.

### ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE BIOCATALIZADOR SOBRE LA REACCIÓN DE SÍNTESIS DE L-DOPA CATALIZADA POR CÉLULAS LIBRES DE *C. freundii* CON ACTIVIDAD TFL.

Los resultados de este apartado se muestran en la Tabla 11 y en las Figuras 19 y 20. El análisis de varianza de la influencia de la concentración



de biocatalizador sobre la actividad enzimática mostró diferencias significativas entre los tratamientos.

Tabla 10. Influencia de la concentración de acetato de amonio sobre la reacción de síntesis de L-DOPA catalizada por células de *C. freundii* con actividad TFL.

[Acetato de amonio] (M)	Velocidad Inicial $\pm$ SD (mmoles/mLxh) <sup>a</sup>	Actividad Enzimática $\times 10^4 \pm$ SD $\times 10^3$ (mmoles/mgxh) <sup>a,b</sup>
0.40	2.2400 $\pm$ 0.0370	433.01 $\pm$ 0.69 a
0.45	2.3963 $\pm$ 0.0816	463.21 $\pm$ 1.91 b
0.50	2.5526 $\pm$ 0.2256	493.44 $\pm$ 4.21 c
0.60	2.6047 $\pm$ 0.2514	511.69 $\pm$ 4.69 d
0.70	2.5973 $\pm$ 0.2412	509.08 $\pm$ 4.50 d
0.80	2.5836 $\pm$ 0.2382	509.25 $\pm$ 4.47 d

<sup>a</sup> Media  $\pm$  Desviación estándar; n=5

<sup>b</sup> Valores de actividad enzimática seguidos por letras distintas indican diferencias significativas (p<0.05) de acuerdo a la prueba de rango de Scheffé

Tabla 11. Influencia de la concentración de biocatalizador sobre la reacción de síntesis de L-DOPA catalizada por células de *C. freundii* con actividad TFL.

Vol. De biomasa (mL/30 mL MR)	[Biomasa] (mg/mL MR)	Velocidad Inicial $\pm$ SD (mmoles/mLxh) <sup>a</sup>	Actividad Enzimática $\times 10^4 \pm$ SD $\times 10^3$ (mmoles/mgxh) <sup>a,b</sup>
2.0	1.2077	1.4031 $\pm$ 0.1422	348.53 $\pm$ 3.53 a
3.0	1.6364	2.5468 $\pm$ 0.2064	466.90 $\pm$ 2.85 b
4.0	2.2360	3.2417 $\pm$ 0.2466	494.93 $\pm$ 2.41 b
5.0	2.7563	3.4687 $\pm$ 0.2202	499.53 $\pm$ 3.42 b
6.0	3.2714	3.7988 $\pm$ 0.3114	503.65 $\pm$ 3.10 b

<sup>a</sup> Media  $\pm$  Desviación estándar; n=5

<sup>b</sup> Valores de actividad enzimática seguidos por letras distintas indican diferencias significativas (p<0.05) de acuerdo a la prueba de rango de Scheffé

De nuestro estudio, se desprende que 3 mL de suspensión celular, correspondiente aproximadamente a 1.6 mg de proteína celular por mL de mezcla reaccionante, es suficiente para obtener una máxima actividad enzimática. A este respecto, la prueba de Scheffé de comparación de medias

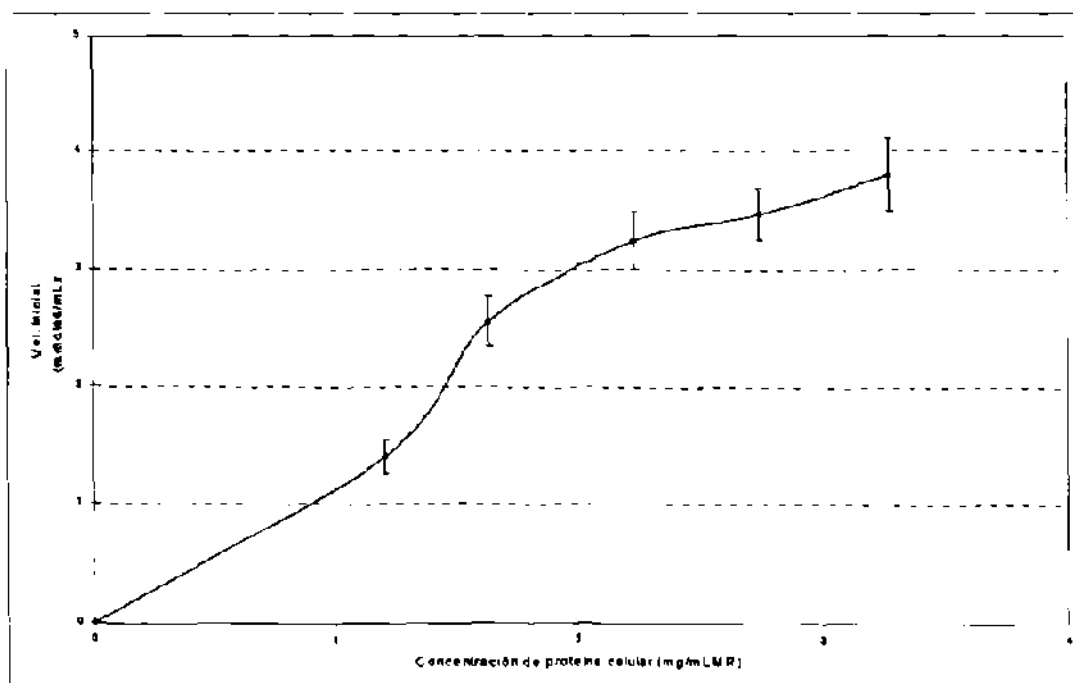


Figura 19. Influencia de la concentración de biocatalizador sobre la velocidad inicial en la reacción de síntesis de L-DOPA catalizada por células libres de *C. freundii* con actividad TFL.

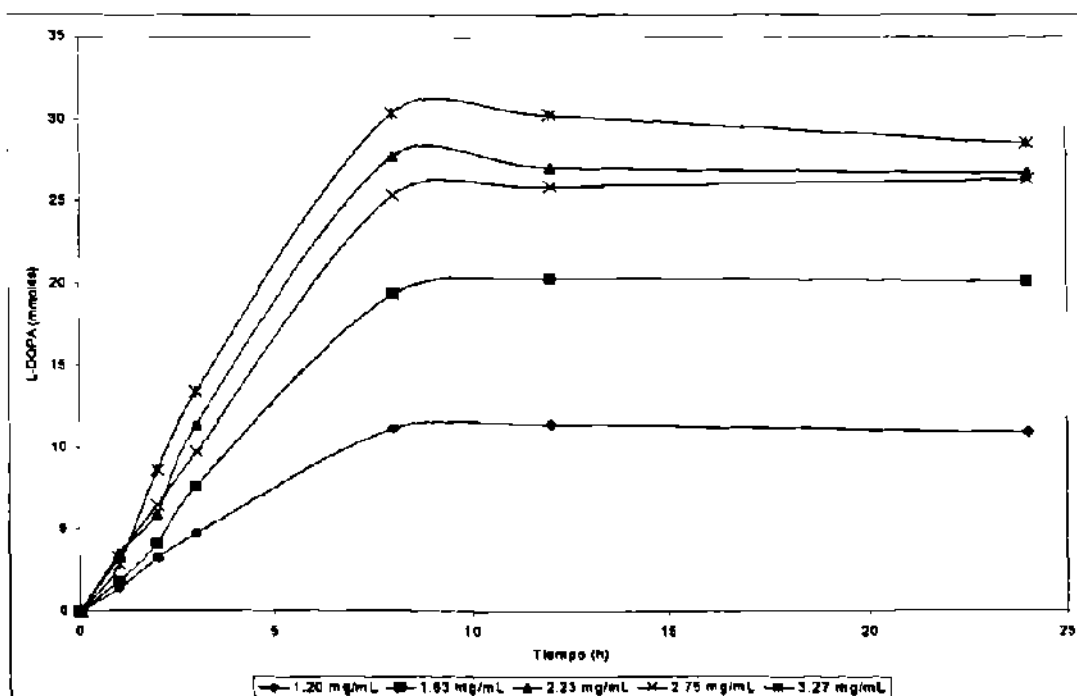


Figura 20. Cinética de formación de L-DOPA en la reacción de síntesis catalizada por células libres de *C. freundii* con actividad TFL a diferentes concentraciones biocatalizador.

muestra que no existe diferencias significativas entre el uso de 3 y 4, 5 ó 6 mL de suspensión celular.

### INMOVILIZACIÓN DE LAS CÉLULAS DE *C. freundii* CON ACTIVIDAD TFL EN GEL DE $\kappa$ -CARRAGENINA Y EN GEL DE ALCOHOL POLIVINÍLICO (PVA).

Las células de *C. freundii* fueron inmovilizadas utilizando gel de  $\kappa$ -carragenina (Aldrich) o de PVA (Sigma; porcentaje de hidrolización 98-99%, peso molecular promedio 124,000-186,000) a fin de determinar cual de los dos soportes era el más adecuado para este fin. Las Figuras 21 y 22, así como las Tablas 12 y 13, muestran los resultados obtenidos en el estudio realizado para determinar la capacidad de retención de células por parte de cada uno de los soportes utilizados para la inmovilización al mantener los gránulos en agitación en medio acuoso durante el tiempo de reacción.

Tabla 12. Porcentaje de inmovilización de las células de *C. freundii* con respecto al tiempo para cada concentración de carragenina probada<sup>a</sup>.

Tiempo de agitación (h)	Concentración de Carragenina (%)			
	3	4	5	6
0	98.57±1.3243	98.63±1.5503	99.00±1.5500	99.34±0.5973
2	93.17±2.1153	94.17±1.1994	96.46±1.5516	97.53±2.2771
4	78.27±1.7129	89.56±1.8494	90.76±2.6967	93.86±0.9853
8	61.12±1.9238	78.93±4.1218	82.12±1.9600	86.05±1.4337
24	41.21±4.5972	67.60±2.2121	74.37±2.6002	77.23±1.8545

<sup>a</sup>Media±Desviación estándar, n=3

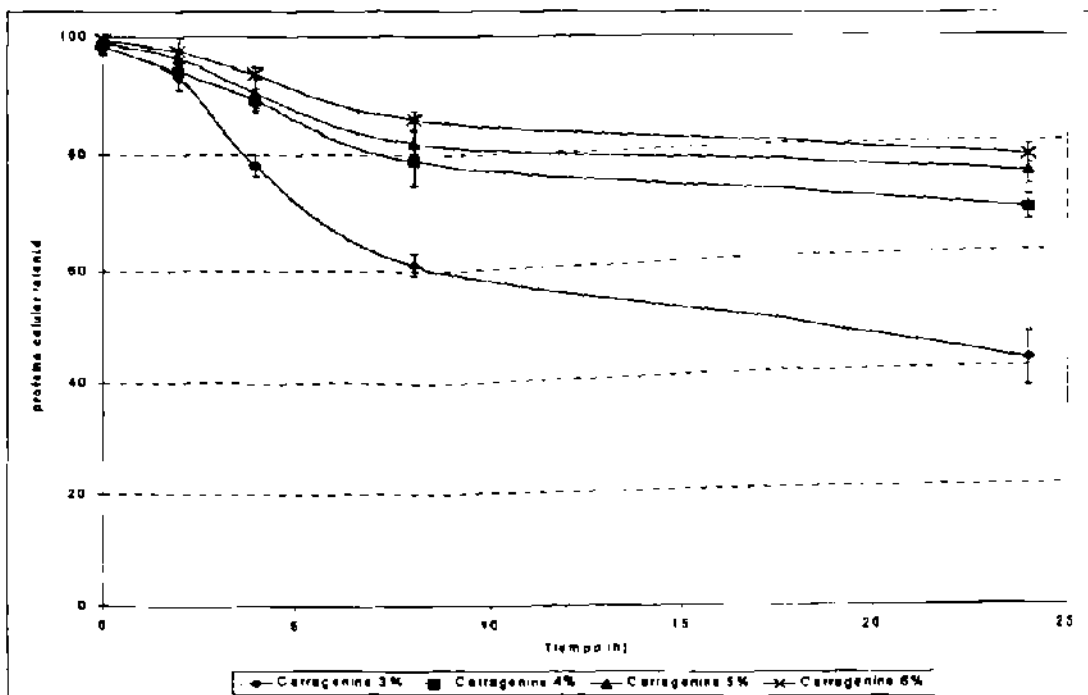


Figura 21. Porcentaje de proteína celular retenida a diferentes concentraciones de carragenina utilizada como soporte para la inmovilización, en función del tiempo

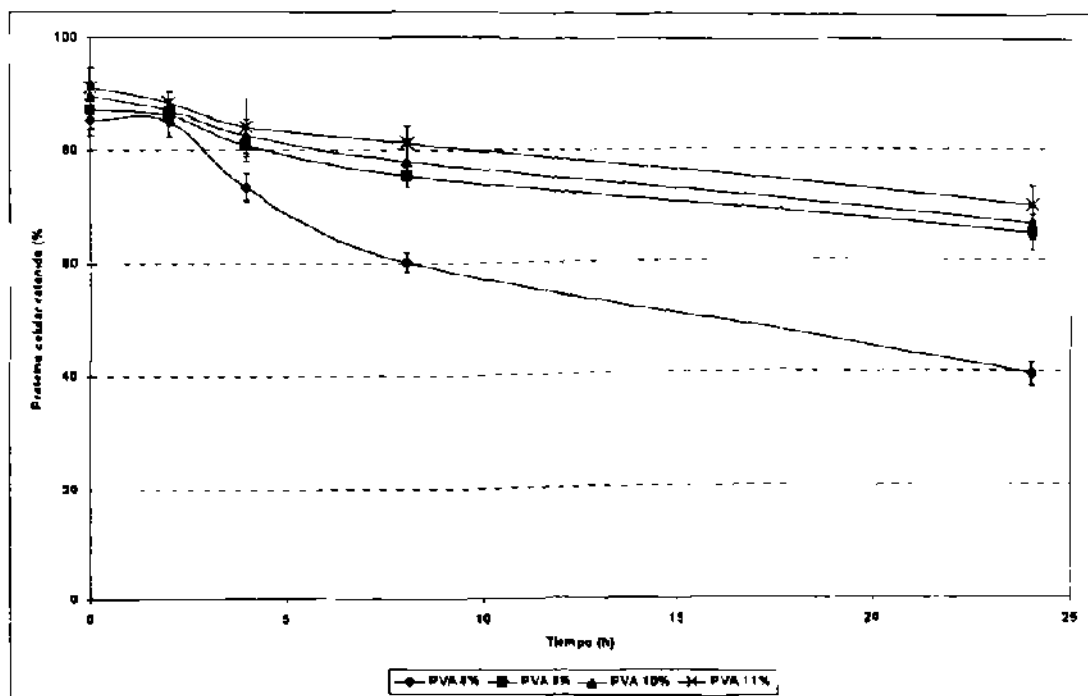


Figura 22. Porcentaje de proteína celular retenida a diferentes concentraciones de PVA utilizada como soporte para la inmovilización, en función del tiempo.

Tabla 13. Porcentaje de inmovilización de las células de *C. freundii* con respecto al tiempo para cada concentración de PVA probada<sup>a</sup>.

Tiempo de agitación (h)	Concentración de PVA (%)			
	8	9	10	11
0	85.17±1.6517	87.22±4.7212	89.49±1.8136	91.17±3.3716
2	84.92±2.6382	86.11±1.0643	87.03±1.7991	88.45±1.7988
4	73.41±2.2867	80.92±3.0560	82.48±2.9364	84.03±5.2308
8	60.16±1.7250	75.45±1.8826	77.94±2.9231	81.17±2.9707
24	39.48±2.0100	64.93±3.3273	66.71±2.8995	69.84±3.4271

<sup>a</sup>Media±Desviación estándar, n=3

### INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE $\kappa$ -CARRAGENINA SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LAS CÉLULAS DE *C. freundii* CON ACTIVIDAD TFL EN LA REACCIÓN DE SÍNTESIS DE L-DOPA.

La Tabla 14 y la Figura 23 muestran la influencia de la concentración de carragenina sobre la actividad TFL en la síntesis de L-DOPA. Como puede observarse, la actividad se conserva hasta en un 85% utilizando una concentración de carragenina del 3%.

Tabla 14 Influencia de la concentración de carragenina sobre la actividad enzimática TFL en la síntesis de L-DOPA.

Concentración de carragenina (%)	Velocidad Inicial x 10 <sup>1</sup> ± SD x 10 <sup>4</sup> (mmoles/mLxh) <sup>a</sup>	Actividad Enzimática x 10 <sup>4</sup> ± SD x 10 <sup>4</sup> (mmoles/mgxh) <sup>a</sup>	% de Actividad Enzimática
0 (Células libres)	1.2726±0.76	31.815±0.85	100.00
3	1.0840±1.97	27.100±1.94	85.18
4	1.0344±0.87	25.861±0.99	81.28
5	0.8615±1.17	21.539±1.43	67.70
6	0.8545±2.23	21.364±2.34	67.15

<sup>a</sup>Media±Desviación estándar, n=3

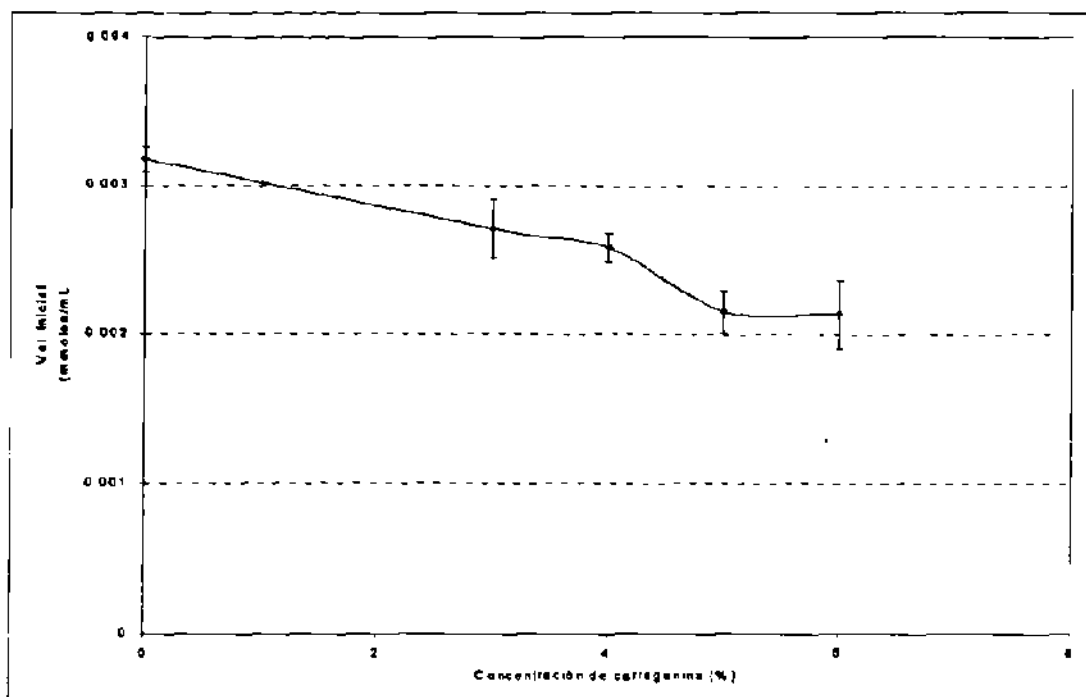


Figura 23. Influencia de la concentración de carragenina empleada para la inmovilización sobre la velocidad inicial en la síntesis de L-DOPA catalizada por células inmovilizadas de *C. freundii*.

### **INFLUENCIA DEL TAMAÑO DE GRÁNULO SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LAS CÉLULAS DE *C. freundii* CON ACTIVIDAD TFL EN LA REACCIÓN DE SÍNTESIS DE L-DOPA.**

La Tabla 15 y la Figura 24 muestran la influencia del tamaño de gránulo sobre la actividad enzimática de las células de *C. freundii* en la síntesis de L-DOPA. Como puede observarse, la actividad es mejor al utilizar un gránulo de aproximadamente 1 mm por lado. Por cuestiones de geometría, cuando el gránulo tiene un tamaño mayor se aumenta la superficie de contacto con el sustrato, sin embargo, las células dentro del gel pueden ser más fácilmente accesibles en gránulos pequeños ya que los problemas de difusión son

menores al haber más células cercanas a la superficie de contacto del gel con el sustrato.

Tabla 15. Influencia del tamaño de gránulo sobre la actividad enzimática TFL en la síntesis de L-DOPA

Tamaño aproximado del gránulo (mm <sup>3</sup> )	Velocidad Inicial x 10 <sup>1</sup> ± SD x 10 <sup>4</sup> (mmoles/mLxh) <sup>a</sup>	Actividad Enzimática x 10 <sup>4</sup> ±SD x 10 <sup>4</sup> (mmoles/mg <sup>x</sup> h) <sup>a</sup>
1	1.4093±0.97	35.234±0.96
2	1.0204±0.29	25.512±0.37
3	0.8061±1.94	20.154±1.71

<sup>a</sup>Media±Desviación estándar, n=3

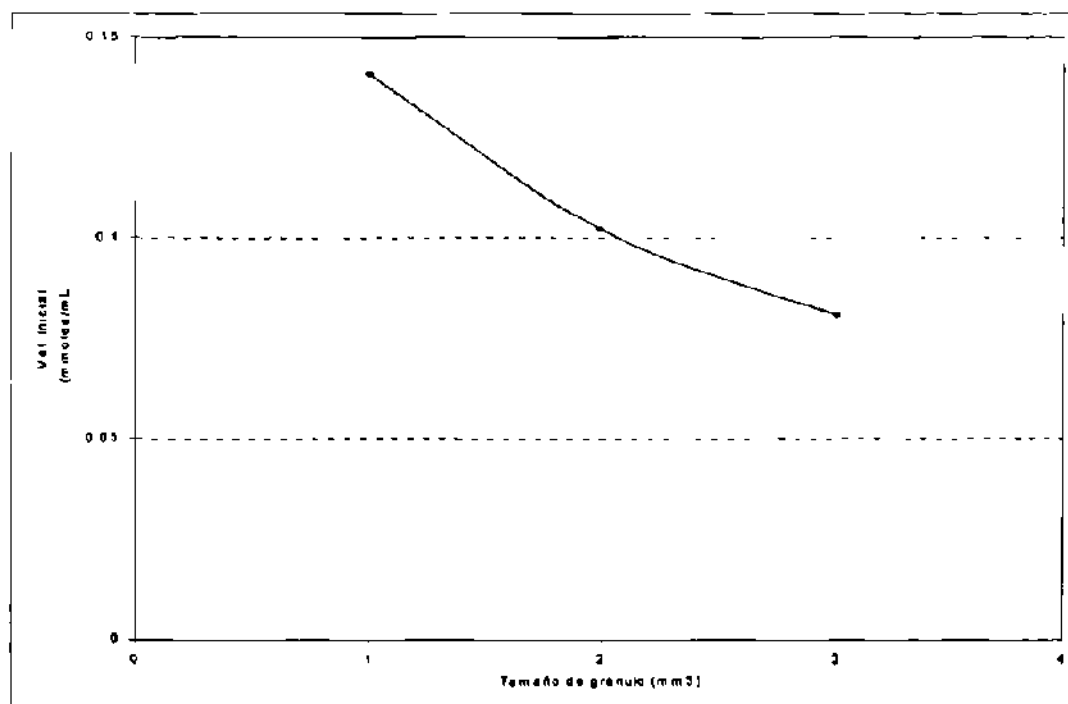


Figura 24. Influencia del tamaño de gránulo sobre la velocidad inicial en la síntesis de L-DOPA catalizada por células de *C. freundii* inmovilizadas en carragenina.

**ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA, EL pH Y LA CONCENTRACIÓN DE SUSTRATOS SOBRE LA REACCIÓN DE SÍNTESIS DE L-DOPA CATALIZADA POR CÉLULAS DE *C. freundii* CON ACTIVIDAD TFL INMOVILIZADAS EN GEL DE  $\kappa$ -CARRAGENINA.**

El estudio realizado utilizando las células libres de *C. freundii* fue repetido utilizando como biocatalizador las células inmovilizadas en gel de  $\kappa$ -carragenina.

Los resultados obtenidos para la influencia de la temperatura, el pH, y la concentración de cada uno de los tres sustratos, sobre la síntesis de L-DOPA, se muestran en las Tablas 16, 17, 18, 19 y 20, así como en las Figuras 25, 26, 27, 28 y 29.

Tabla 16. Influencia de la temperatura sobre la reacción de síntesis de L-DOPA catalizada por células de *C. freundii* con actividad TFL inmovilizadas en  $\kappa$ -carragenina.

Temperatura ( $^{\circ}$ C)	Velocidad Inicial $\times 10^2$ $\pm$ SD $\times 10^3$ (mmoles/mLxh) <sup>a</sup>	Actividad Enzimática $\times 10^4$ $\pm$ SD $\times 10^5$ (mmoles/mg $\times$ h) <sup>a,b</sup>
20	4.3344 $\pm$ 2.44	7.3522 $\pm$ 3.71 a
25	7.8480 $\pm$ 3.59	13.312 $\pm$ 6.65 b
30	10.658 $\pm$ 1.10	10.079 $\pm$ 1.93 b
35	-----	-----

<sup>a</sup> Media  $\pm$  Desviación estándar; n=5

<sup>b</sup>Valores de actividad enzimática seguidos por letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) de acuerdo a la prueba de rango de Scheffé

Como puede verse, la tendencia en la variación de las velocidades iniciales y las actividades enzimáticas debida a cada uno de los factores estudiados es similar a la obtenida con células libres (Tablas 6, 7, 8, 9 y 10),



aunque hay una disminución en los valores calculados; no obstante, para ninguno de los parámetros estudiados la disminución es mayor al 20%. Esto puede deberse a un incremento de los problemas de difusión hacia el interior y hacia el exterior del soporte y, por ende, del biocatalizador.

Tabla 17. Influencia del pH sobre la reacción de síntesis de L-DOPA catalizada por células de *C. freundii* con actividad TFL inmovilizadas en  $\kappa$ -carragenina.

pH (Unidades de pH)	Velocidad Inicial $\times 10^2$ $\pm$ SD $\times 10^3$ (mmoles/mLxh) <sup>a</sup>	Actividad Enzimática $\times 10^4$ $\pm$ SD $\times 10^4$ (mmoles/mgxh) <sup>a,b</sup>
6.5	0.7650 $\pm$ 0.19	2.1787 $\pm$ 0.03 a
7.0	3.8046 $\pm$ 0.75	10.943 $\pm$ 3.50 b
7.5	11.142 $\pm$ 3.05	31.704 $\pm$ 4.24 c
8.0	5.5182 $\pm$ 1.59	15.701 $\pm$ 3.86 d

<sup>a</sup> Media  $\pm$  Desviación estándar; n=5

<sup>b</sup>Valores de actividad enzimática seguidos por letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) de acuerdo a la prueba de rango de Scheffé

Tabla 18. Influencia de la concentración de catecol sobre la reacción de síntesis de L-DOPA catalizada por células de *C. freundii* con actividad TFL inmovilizadas en  $\kappa$ -carragenina.

Catecol (M)	Velocidad Inicial $\pm$ SD $\times 10^2$ (mmoles/mLxh) <sup>a</sup>	Actividad Enzimática $\times 10^4$ $\pm$ SD $\times 10^4$ (mmoles/mgxh) <sup>a,b</sup>
0.05	0.3013 $\pm$ 0.25	34.117 $\pm$ 0.49 a
0.075	0.3587 $\pm$ 1.74	62.058 $\pm$ 3.10 b
0.10	0.2833 $\pm$ 0.16	32.577 $\pm$ 0.32 a
0.125	0.2288 $\pm$ 0.28	25.311 $\pm$ 0.50 c
0.15	0.1746 $\pm$ 0.41	23.754 $\pm$ 0.56 c

<sup>a</sup> Media  $\pm$  Desviación estándar; n=5

<sup>b</sup>Valores de actividad enzimática seguidos por letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) de acuerdo a la prueba de rango de Scheffé

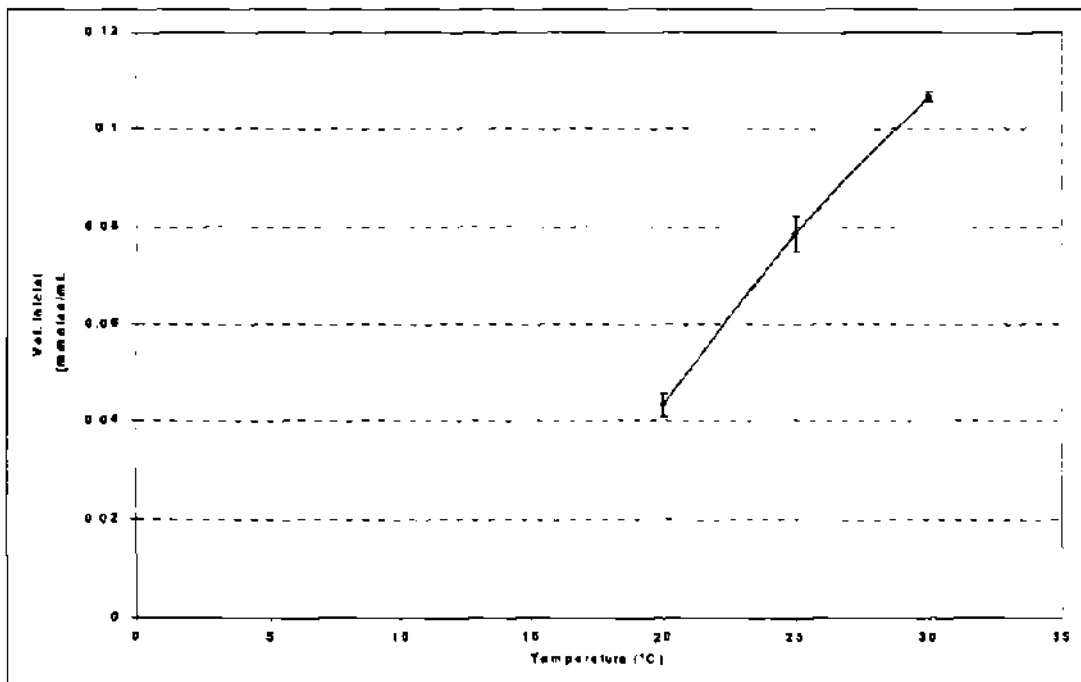


Figura 25. Influencia de la temperatura sobre la velocidad inicial en la reacción de síntesis de L-DOPA catalizada por células de *C. freundii* con actividad TFL inmovilizadas en carragenina.

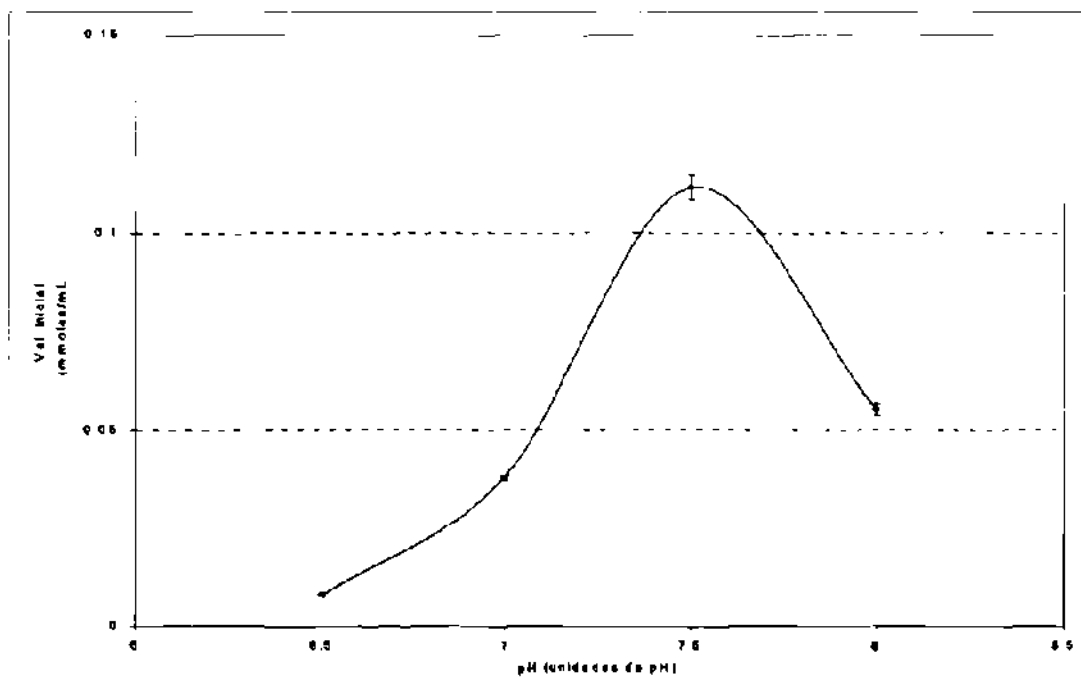


Figura 26. Influencia del pH sobre la velocidad inicial en la reacción de síntesis de L-DOPA catalizada por células de *C. freundii* con actividad TFL inmovilizadas en carragenina.

Tabla 19. Influencia de la concentración de piruvato de sodio sobre la reacción de síntesis de L-DOPA catalizada por células de *C. freundii* con actividad TFL inmovilizadas en  $\kappa$ -carragenina.

Piruvato de sodio (M)	Velocidad Inicial $\pm$ SD $\times 10^2$ (mmoles/mLxh) <sup>a</sup>	Actividad Enzimática $\times 10^4$ $\pm$ SD $\times 10^4$ (mmoles/mgxh) <sup>a,b</sup>
0.09	0.5206 $\pm$ 1.90	80.713 $\pm$ 3.42 a
0.12	0.6032 $\pm$ 2.83	93.519 $\pm$ 4.90 b
0.15	0.7181 $\pm$ 3.00	111.33 $\pm$ 5.08 c
0.18	0.4093 $\pm$ 2.12	63.457 $\pm$ 2.46 d

<sup>a</sup> Media  $\pm$  Desviación estándar; n=5

<sup>b</sup> Valores de actividad enzimática seguidos por letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) de acuerdo a la prueba de rango de Scheffé

Tabla 20. Influencia de la concentración de acetato de amonio sobre la reacción de síntesis de L-DOPA catalizada por células de *C. freundii* con actividad TFL inmovilizadas en  $\kappa$ -carragenina.

Acetato de amonio (M)	Velocidad Inicial $\pm$ SD $\times 10^2$ (mmoles/mLxh) <sup>a</sup>	Actividad Enzimática $\times 10^4$ $\pm$ SD $\times 10^3$ (mmoles/mgxh) <sup>a,b</sup>
0.45	2.0367 $\pm$ 4.24	408.63 $\pm$ 0.99 a
0.50	2.1696 $\pm$ 0.94	428.91 $\pm$ 0.17 b
0.60	2.2139 $\pm$ 5.04	437.67 $\pm$ 0.94 c
0.70	2.1736 $\pm$ 6.48	429.70 $\pm$ 1.20 c

<sup>a</sup> Media  $\pm$  Desviación estándar; n=5

<sup>b</sup> Valores de actividad enzimática seguidos por letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) de acuerdo a la prueba de rango de Scheffé

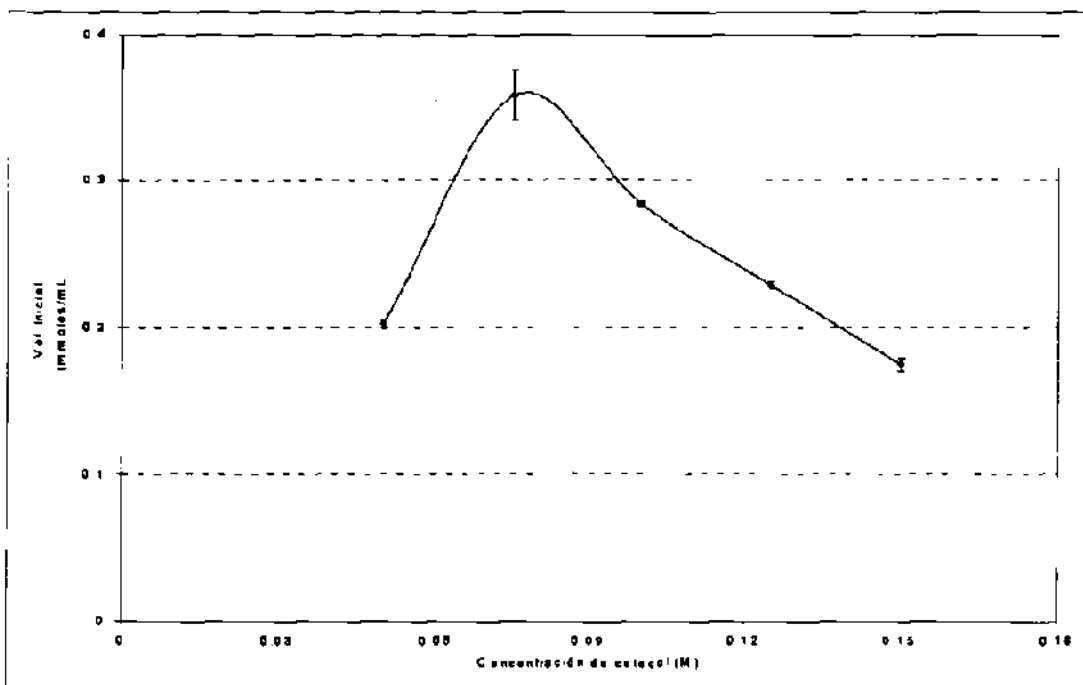


Figura 27. Influencia de la concentración de catecol sobre la velocidad inicial en la reacción de síntesis de L-DOPA catalizada por células de *C. freundii* con actividad TFL inmovilizadas en carragenina

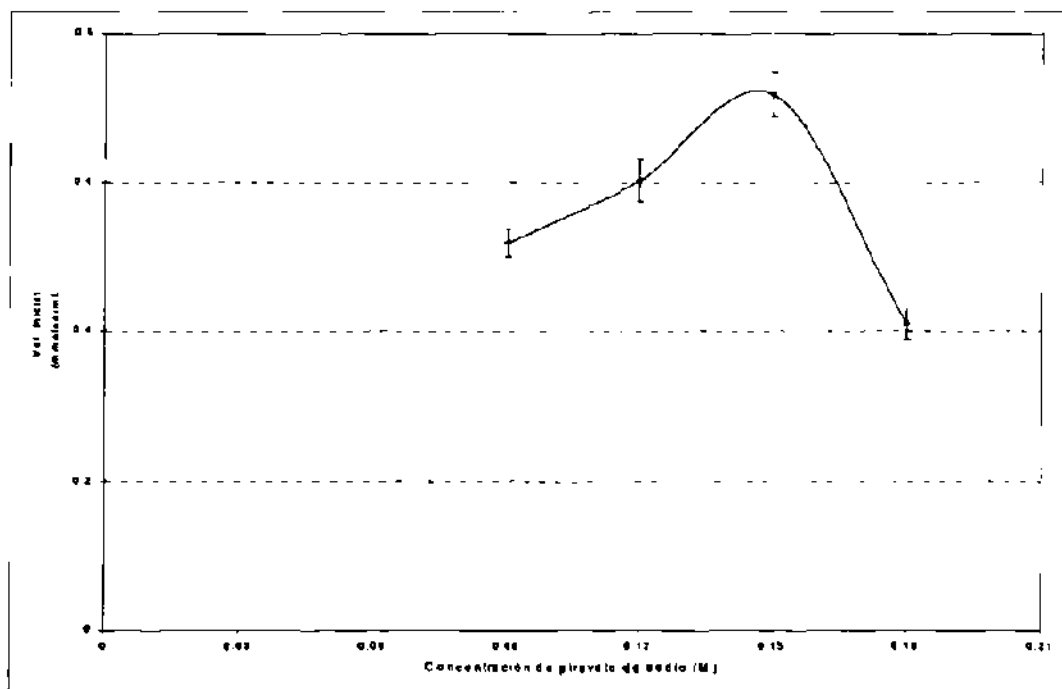


Figura 28. Influencia de la concentración de piruvato de sodio sobre la velocidad inicial en la reacción de síntesis de L-DOPA catalizada por células de *C. freundii* con actividad TFL inmovilizadas en carragenina.

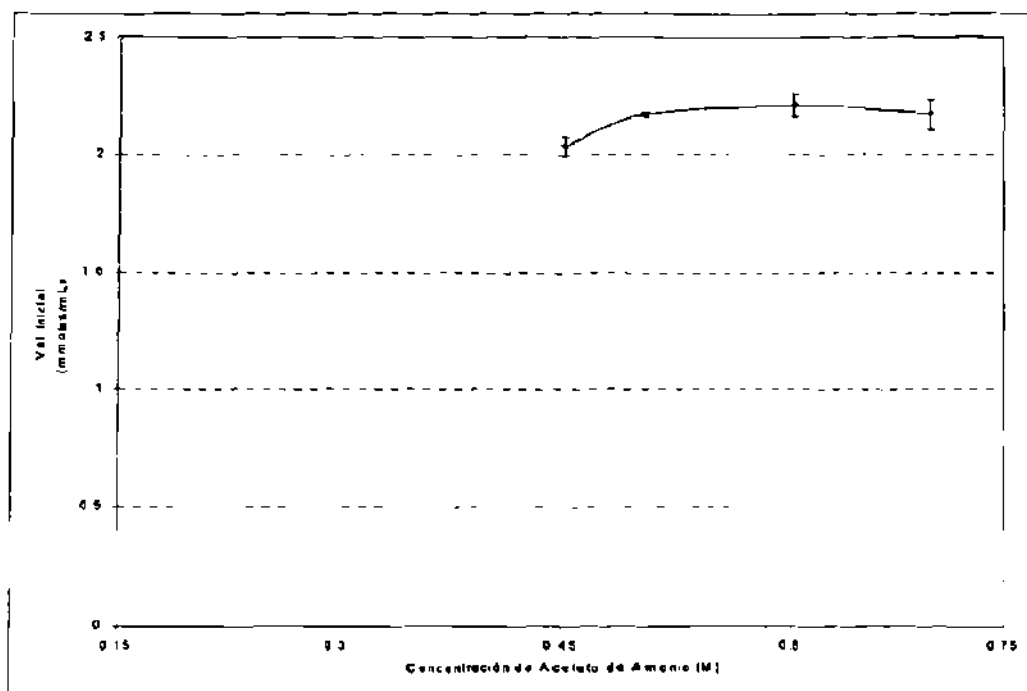


Figura 29. Influencia de la concentración de acetato de amonio sobre la velocidad inicial en la reacción de síntesis de L-DOPA catalizada por células de *C. freundii* con actividad TFL inmovilizadas en carragenina

## DISCUSIÓN

### ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA SOBRE LA REACCIÓN DE SÍNTESIS DE L-DOPA CATALIZADA POR CÉLULAS LIBRES DE *C. freundii* CON ACTIVIDAD TFL.

Como puede apreciarse en Tabla 6, la velocidad inicial aumenta conforme se incrementa la temperatura, hasta alcanzar un máximo a los 30°C para luego decrecer. Cabe mencionar, sin embargo, que a partir de 35°C los valores no son confiables ya que en este punto comenzó a notarse un oscurecimiento de la mezcla reaccionante que iba desde un color verde cieno (a 35°C) hasta un negro (a 45°C); de acuerdo con esto consideramos que en estos puntos nuestro sustrato ha sido modificado, por lo que a temperaturas de 35°C en adelante tal vez ya no se realiza una síntesis del aminoácido. En la Figura 6 se observa que la velocidad inicial máxima se alcanza a los 30°C, aunque la prueba de comparación de medias no mostró diferencia entre los 25 y 30°C, por lo que consideramos que una temperatura entre estos dos valores es adecuada para la reacción.

A este respecto, Lloyd-George y Chang<sup>58</sup> reportaron una temperatura óptima de 27°C para la síntesis de L-DOPA utilizando tanto células libres como inmovilizadas de *Erwinia herbicola*, aunque no señalaron si se presentaron

problemas a temperaturas mayores. Sin embargo, ellos encontraron que cuando la reacción se llevaba a cabo en condiciones de oscuridad la producción del aminoácido era menor que bajo condiciones de luminosidad. Esto último lo explican suponiendo que bajo condiciones de luz, parte del sustrato (catecol) se oxida y ello disminuye el efecto inhibitorio del mismo.

Por su parte, Foor *et al.*<sup>35</sup> realizaron la síntesis de L-DOPA utilizando células de *Escherichia coli* en las cuales se ha clonado el gen para tirosinfenoliasa de *E. herbicola*. Estos investigadores obtuvieron buenos resultados trabajando a 24<sup>o</sup>C. Enei y Yamada<sup>29</sup>, sin embargo, señalaron que la temperatura óptima para la síntesis de L-DOPA utilizando células de *E. herbicola* estaba dentro del rango de 15-25<sup>o</sup>C. Para y Baratti<sup>72</sup>, por su parte, utilizaron células de *Escherichia intermedia* y llevaron a cabo la reacción a una temperatura de 27<sup>o</sup>C y de 37<sup>o</sup>C, sin mencionar que pueda existir algún problema, aunque su mejor producción fue reportada a 27<sup>o</sup>C.

#### **ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL pH SOBRE LA REACCIÓN DE SÍNTESIS DE L-DOPA CATALIZADA POR CÉLULAS LIBRES DE *C. freundii* CON ACTIVIDAD TFL.**

En la Tabla 7 y en la Figura 8 se observa que tanto la velocidad inicial como la actividad enzimática se incrementaron conforme se incrementó el valor de pH, hasta alcanzar un máximo muy notorio a pH de 7.5. A pH de 9.0 apareció un ligero incremento, el cual puede ser explicado por la coloración que la mezcla reaccionante adquirió por efecto, probablemente, de la oxidación del

catecol. A partir de este valor los resultados no son confiables ya que el sustrato ha experimentado modificación y la reacción seguramente ya no se llevó a cabo de manera óptima.

Lloyd-George y Chang<sup>58</sup> llevaron a cabo sus experimentos de síntesis de L-DOPA con *Erwinia herbicola* a un pH de 8.0; Para y Baratti<sup>72</sup> lo llevaron a cabo con células de *Escherichia intermedia* a un pH de 8.5; para Enei y Yamada<sup>29</sup> el pH óptimo fue de alrededor de 8.0 (también con *E. herbicola*); mientras que para Foor *et al.*<sup>35</sup> la mejor síntesis se llevó a cabo a pH de 8.5 utilizando células de *E. coli* con el gen clonado de *E. herbicola*.

El efecto del pH sobre una enzima es debido a cambios en el estado de ionización de los componentes del sistema conforme el pH cambia; tanto la enzima libre como el sustrato y el complejo enzima-sustrato pueden experimentar dichos cambios<sup>23</sup>. Puesto que las enzimas son proteínas que contienen muchos grupos ionizables, existen en un serie de diferentes estados de ionización, y la distribución de la enzima total entre las diversas formas iónicas depende del pH y de las constantes de ionización de los diversos grupos. Sin embargo, como la actividad catalítica está usualmente confinada a un rango relativamente pequeño de pH, es probable que sólo una de las formas iónicas de la enzima (o más bien de su sitio activo) sea catalíticamente activo. De hecho, existe evidencia de que la ionización de los grupos en sitios de la proteína alejados del sitio activo tienen un efecto pequeño o nulo, mientras que el estado iónico de los grupos cercanos al sitio activo tiene un efecto grande<sup>23</sup>.

Además, Faleev *et al.*<sup>34</sup> señalaron que el patrón de dependencia del pH de los principales parámetros cinéticos de las reacciones catalizadas por la TFL



de *Erwinia herbicola* dependían de la naturaleza del sustituyente del anillo aromático. Estos autores señalaron que la reacción de la TFL con DOPA difiere de las reacciones con otros análogos estructurales de la tirosina porque requiere de la formación de una base adicional, lo cual se reflejó en los perfiles de pH.

#### **ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE CATECOL, PIRUVATO DE SODIO Y ACETATO DE AMONIO SOBRE LA REACCIÓN DE SÍNTESIS DE L-DOPA CATALIZADA POR CÉLULAS LIBRES DE *C. freundii* CON ACTIVIDAD TFL.**

##### **a) Catecol.**

La primera parte de la curva de la Figura 10 sigue una cinética de Michaelis-Menten; para este rango de concentraciones se calculó una constante de Michaelis aparente ( $K_m$  app) de 0.023 M (Figura 12). La segunda parte de la curva de esta figura muestra una cinética de inhibición por sustrato. A este respecto, Para y Baratti<sup>72</sup> señalaron una actividad máxima a una concentración de catecol de 0.065 y encuentran que el proceso de síntesis se inhibe a una concentración cercana a 0.1 M; la  $K_m$  aparente calculada por estos investigadores fue de 0.040 M trabajando con células de *Escherichia intermedia*. Por su parte, Voivodov et al.<sup>104</sup> mencionaron que la actividad tirosinofenolasa de las células de *Citrobacter freundii* utilizadas en la síntesis de L-DOPA se inhibe a concentraciones de catecol mayores a 0.1 M. Asimismo,

Enei y Yamada<sup>29</sup> mencionaron que concentraciones altas de catecol desnaturalizan la enzima tirosinfenoliasa, por lo que es recomendable añadir poco a poco este sustrato; sin embargo, es interesante mencionar que, de acuerdo con su conceptualización, para estos autores el proceso no es de inhibición, sino de inactivación. Para Lloyd-George y Chang<sup>56</sup>, las concentraciones bajas de catecol son deseables en la producción de L-DOPA ya que, si la concentración es alta (>0.1 M), podría haber suficiente sustrato para inhibir la reacción.

En este estudio el valor de  $K_m$  obtenido (0.023 M) refleja una mayor afinidad de la enzima por el sustrato, sin embargo, las condiciones de reacción probadas fueron diferentes respecto a otros estudios realizados por diversos autores.

#### b) Piruvato de Sodio.

Como se observa en la Figura 13, la primera parte de la gráfica, como ocurre con el estudio de la influencia de la concentración de catecol, sigue una cinética de Michaelis-Menten. A partir de esto se calculó una  $K_m$  aparente de 0.063 M (Figura 15); Para y Baratti<sup>72</sup>, bajo diferentes condiciones de reacción, encuentran un valor de  $K_m$  aparente de 0.11 M utilizando células de *E. Intermedia*. La gráfica de la Figura 13 muestra que a concentraciones de piruvato de sodio mayores de 0.15 M, los valores de actividad enzimática disminuyen drásticamente. A este respecto, Para y Baratti<sup>72</sup> observan un fenómeno similar, aunque su mejor concentración es de 0.27 M, una

concentración que es 80% mayor que la máxima que toleró nuestro proceso sin afectar negativamente a la reacción; para estos autores este efecto fue una inhibición por sustrato. Por su parte, Lloyd-George y Chang<sup>58</sup> mencionaron, en concordancia con Enei *et al.*<sup>28</sup> que efectos de este tipo se deben a que la L-DOPA y el piruvato pueden reaccionar para formar compuestos adicionales, por lo que la producción neta del aminoácido puede verse afectada si la concentración de piruvato es alta y, por lo tanto, la presencia de remanente del mismo es significativa.

Dada la concentración tan alta, respecto a la utilizada por nosotros, a la cual Para y Baratti<sup>72</sup> encontraron su efecto inhibitorio, suponemos que en nuestro caso no podemos hablar de inhibición. Nuestros resultados se acercan más a lo señalado por Lloyd-George y Chang<sup>58</sup>, además, no debe de olvidarse que el piruvato es un metabolito activo porque es sustrato de otras reacciones enzimáticas de la célula, así como también participa en reacciones no enzimáticas. Desde esta perspectiva y a pesar de que nuestras células en el medio reaccionante se encuentran en un estado de baja actividad metabólica, pudiera ocurrir que parte del piruvato se desviara hacia alguna actividad metabólica de mantenimiento celular o reaccionará secundariamente para formar compuestos adicionales.

### c) Acetato de Amonio.

En la Figura 16 se observa el efecto de la concentración de acetato de amonio sobre la actividad enzimática de la reacción de síntesis de L-DOPA. Los

valores de velocidad inicial y actividad enzimática se dan en la Tabla 10. Como puede observarse los valores de velocidad inicial se incrementaron siguiendo una cinética de Michaelis-Menten hasta alcanzar un máximo a una concentración de acetato de amonio de 0.6 M.

Para y Baratti<sup>72</sup> realizaron también un estudio sobre la influencia de la concentración de acetato de amonio sobre la reacción de síntesis de L-DOPA, aunque ellos trabajaron con células de *Escherichia intermedia*. Para estos autores la concentración óptima fue de 0.55 M, y además ellos no reportaron tampoco que a concentraciones mayores se presentaran fenómenos de inhibición. La  $K_m$  aparente calculada por estos investigadores fue de 0.250 M, mientras que a partir de nuestros datos calculamos un valor de  $K_m$  aparente de 0.30 M (Figura 18), trabajando a condiciones de reacción diferente. Por su parte, Lloyd-George y Chang<sup>58</sup> utilizaron cloruro de amonio a una concentración de 0.80 M en su proceso de síntesis de L-DOPA, mientras que Foor *et al.*<sup>35</sup> utilizaron una mezcla de 0.012 M de acetato de amonio y 0.33 M de cloruro de amonio. Finalmente, Enei y Yamada<sup>29</sup> realizaron sus estudios utilizando una concentración de acetato de amonio de 0.64 M como óptimo.

#### **ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE BIOCATALIZADOR SOBRE LA REACCIÓN DE SÍNTESIS DE L-DOPA CATALIZADA POR CÉLULAS LIBRES DE *C. freundii* CON ACTIVIDAD TFL.**

En la Figura 19 se observa que no existe una relación lineal entre la cantidad de biocatalizador empleado y la actividad enzimática, es decir que a un

aumento del doble de proteína total no correspondió un incremento proporcional de la actividad enzimática (ni de la velocidad inicial). Esto puede deberse a que al aumentar la cantidad de enzima presente en el medio reaccionante se presentó una disminución de la probabilidad de que los sitios activos sean completamente ocupados al permanecer constante la cantidad de sustrato. A este respecto, Kupletskaya<sup>70</sup> señaló que el aumento en la cantidad de células en la mezcla reaccionante de 5.0 a 7.5 mg/mL no incrementó de forma significativa la tasa de síntesis de L-tirosina utilizando células de *C. freundii* 62 como biocatalizador.

De nuestro estudio, se desprende que 3 mL de suspensión celular, correspondiente aproximadamente a 1.6 mg de proteína celular por mililitro de mezcla reaccionante, fue suficiente para obtener una máxima actividad enzimática. A este respecto, la prueba de Scheffé de comparación de medias mostró que no existían diferencias significativas entre el uso de 3 y 4, 5 ó 6 mL de suspensión celular.

#### **INMOVILIZACIÓN DE LAS CÉLULAS DE *C. freundii* CON ACTIVIDAD TFL EN GEL DE $\kappa$ -CARRAGENINA Y EN GEL DE ALCOHOL POLIVINÍLICO (PVA).**

Las células de *C. freundii* fueron inmovilizadas utilizando gel de  $\kappa$ -carragenina (Aldrich) o gel de PVA (Sigma; porcentaje de hidrolización 98-99%, peso molecular promedio 124,000-186,000) a fin de determinar cual de los dos

soportes era el más adecuado para este fin. En las Figuras 21 y 22, se observa que con ambos soportes se alcanzó de manera inicial un buen porcentaje de inmovilización, siendo ligeramente mayor para la carragenina. No obstante, se observó que conforme transcurre el tiempo, el gel de carragenina conservó un buen porcentaje de inmovilización en tres de las concentraciones probadas, mientras que el gel de PVA retuvo de manera deficiente a las células en todas las concentraciones probadas. Cabe mencionar que también se probó una concentración de 2% para el caso de carragenina, pero en este caso los gránulos se deshicieron al poco tiempo de estar en agitación, por lo que no se consideró la determinación de la concentración de proteína en solución.

De acuerdo con estos resultados, se decidió continuar esta investigación utilizando como soporte de inmovilización al gel de  $\kappa$ -carragenina.

#### **INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE $\kappa$ -CARRAGENINA SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LAS CÉLULAS DE *C. freundii* CON ACTIVIDAD TFL EN LA REACCIÓN DE SÍNTESIS DE L-DOPA.**

Analizando los resultados mostrados en la Tabla 14 y la Figura 23, de acuerdo con los resultados mostrados en la Figura 21, detectamos que gran parte de las células salieron del soporte al avanzar el tiempo de reacción, por lo que es mejor utilizar una concentración de carragenina de 4%, aunque la actividad sólo se conservó en un 81%, ya que a esta concentración existe una

buena retención de las células dentro del soporte durante el tiempo de reacción (Figura 21).

Las concentraciones de 5% y 6% mostraron menor retención de la actividad enzimática, siendo probable que esto se deba a una mayor compactación del tamaño de poro y, por lo tanto, un aumento en los problemas de difusión del sustrato hacia el interior del soporte y/o del producto hacia el exterior. A este respecto, Tysychnaya *et al.*<sup>102</sup> realizaron estudios reológicos del gel de  $\kappa$ -carragenina y estudios sobre su empleo para la inmovilización de células de *C. freundii* 62, encontrando que una concentración de 3.5% era la más recomendable para la inmovilización ya que al aumentar la concentración se incrementaban también los problemas de difusión.

Ruelas<sup>85,86</sup> realizó un estudio sobre la inmovilización de las células de *C. freundii* en gel de  $\kappa$ -carragenina para su uso en la síntesis de L-tirosina, encontrando que a concentraciones de 4% y 5% había buena retención de las células dentro del soporte y que la actividad enzimática TFL era mayor en el gel al utilizar células inmovilizadas a una concentración de 5% de carragenina. Sin embargo, el incremento en la actividad enzimática con 5% de carragenina fue de sólo 1.3%, por lo que no creemos que este aumento justifique el empleo de una mayor cantidad de carragenina en el proceso de inmovilización.

## INFLUENCIA DEL TAMAÑO DE GRÁNULO SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LAS CÉLULAS DE *C. freundii* CON ACTIVIDAD TFL EN LA REACCIÓN DE SÍNTESIS DE L-DOPA.

La Tabla 15 y la Figura 24 muestran la influencia del tamaño de gránulo sobre la actividad enzimática de las células de *C. freundii* en la síntesis de L-DOPA.

Tyschnaya et al.<sup>102</sup> realizaron su estudio sobre la inmovilización de *C. freundii* 62 utilizando un tamaño de gránulo de 1 mm<sup>3</sup>. Ruelas<sup>85,86</sup>, por su parte, realizó un estudio sobre la influencia del tamaño de gránulo en la síntesis de L-tirosina utilizando células de *C. freundii* inmovilizadas en carragenina. Estos autores encontraron que la actividad enzimática era ligeramente mayor con un gránulo de 3 mm por lado, por lo que concluyeron que este es el tamaño más recomendable de utilizar. Sin embargo, sus resultados mostraron que a ese tamaño de gránulo se aumentó el tiempo de difusión del sustrato hacia el interior de la célula, por lo que consideramos que deberían ser tomado con cautela en el caso de una reacción relativamente más larga como lo es el caso de la síntesis de L-DOPA.

Iborra et al.<sup>46</sup>, por su parte, mencionaron la obtención de buenos resultados al inmovilizar células de *Rhodococcus fascians* en carragenina al 2% y formando gránulos que tenían en promedio 2 mm de diámetro.



## **ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA, EL pH Y LA CONCENTRACIÓN DE SUSTRATOS SOBRE LA REACCIÓN DE SÍNTESIS DE L-DOPA CATALIZADA POR CÉLULAS DE *C. freundii* CON ACTIVIDAD TFL INMOVILIZADAS EN GEL DE $\kappa$ -CARRAGENINA.**

La tendencia en la variación de las velocidades iniciales y las actividades enzimáticas debida a cada uno de los factores estudiados al utilizar como biocatalizadores las células de *C. freundii* inmovilizadas en carragenina, fue similar a la obtenida con células libres, aunque hubo una disminución en los valores calculados; no obstante, para ninguno de los parámetros estudiados la disminución fue mayor al 20%. Esto pudo deberse a un incremento de los problemas de difusión hacia el interior y hacia el exterior del soporte y, por ende, del biocatalizador.

Para *et al.*<sup>71,72</sup> realizaron estudios sobre síntesis de L-tirosina utilizando células de *E. coli* con actividad TFL inmovilizadas en gel de poliacrilamida. Estos autores encontraron que el efecto de la temperatura, del pH, y de la concentración de sustratos (fenol, piruvato y amonio) era casi idéntico para las células inmovilizadas que para las libres, manteniéndose un 60% de la actividad enzimática. En el estudio realizado por estos investigadores no se detectó aumento en los problemas de difusión.

Ruelas<sup>85,86</sup> realizó un estudio sobre la inmovilización de células de *C. freundii* con actividad TFL en gel de  $\kappa$ -carragenina, encontrando que la actividad enzimática se conservaba hasta en un 68%.

Lloyd-George y Chang<sup>58</sup>, caracterizaron la conversión de fenol, piruvato y amonio a L-tirosina, así como la conversión de catecol, piruvato y amonio a L-DOPA, utilizando como catalizador células de *Erwinia herbicola* con actividad TFL libres o inmovilizadas en microcápsulas de alginato-polilisina-alginato. Estos autores encontraron que el efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática en la síntesis de L-tirosina era idéntico tanto para células libres como inmovilizadas, alcanzándose al final casi la misma productividad en la conversión. Al comparar el porcentaje de conversión tanto para la reacción de síntesis de L-tirosina como para la de L-DOPA, estos investigadores encontraron que no había diferencia significativa entre la utilización de células libres o la utilización de células inmovilizadas.

Voivodov *et al.*<sup>104</sup>, por su parte, encontraron que la actividad enzimática TFL de células de *Citrobacter freundii* inmovilizadas en carragenina y utilizadas para la síntesis de L-DOPA era mucho mayor y más estable en las células inmovilizadas que en las libres. Esto probablemente era debido a que el soporte jugaba un papel de amortiguamiento del efecto de inhibición que el catecol tiene sobre la tirosinfenolasa.

Pialis *et al.*<sup>74</sup> investigaron la producción de L-DOPA por tirosinasa inmovilizada sobre nylon 6,6 modificado químicamente. Sus estudios demostraron que esta enzima puede ser inmovilizada de manera efectiva en nylon 6,6, siendo la producción de L-DOPA óptima cuando el tamaño de poro es de 0.20  $\mu\text{m}$  y las membranas de nylon eran previamente activadas con 3-5% de glutaraldehído. Un aspecto importante encontrado por estos autores relativo

a la estabilidad del biocatalizador, fue la reducción en un 20% de su actividad después de 14 días de ser utilizado bajo condiciones de síntesis del aminoácido.

Los resultados obtenidos en este estudio permitieron establecer que la carragenina constituye un soporte adecuado para la inmovilización de las células de *C. freundii* con miras a su utilización como biocatalizadores en la síntesis de L-DOPA, ya que el porcentaje de inmovilización alcanzado, así como la retención de la actividad enzimática, mostraron ser adecuados.

## CONCLUSIONES

1. La máxima actividad tirosinfenolasa en la síntesis de L-DOPA utilizando células libres de *Citrobacter freundii* como biocatalizador se obtuvo bajo las siguientes condiciones de reacción: temperatura de 30°C; pH de 7.5; concentración de catecol 0.075 M; concentración de piruvato de sodio 0.15 M; concentración de acetato de amonio 0.60 M; cantidad de biocatalizador 1.63 mg/mL de mezcla reaccionante. Bajo estas condiciones se obtuvo una velocidad inicial máxima de 2.6047 mmoles/mLxh y una actividad enzimática máxima de  $511.69 \times 10^{-4}$  mmoles/mgxxh.
2. Se calcularon valores de  $K_m$  aparentes de 0.023 M, 0.063 M y 0.30 M para catecol, piruvato de sodio y acetato de amonio, respectivamente. Las velocidades máximas calculadas para cada uno de los tres sustratos fueron 0.5363 mmoles/mLxh, 1.3549 mmoles/mLxh y 3.9926 mmoles/mLxh, respectivamente.
3. Se observó que, bajo las condiciones estudiadas, el gel de carragenina tiene una mayor capacidad de retención de las células respecto al tiempo (hasta un 86% a la mayor concentración probada al cabo de 24 horas).

4. Las mejores condiciones de inmovilización de las células de *C. freundii* en gel de carragenina se alcanzaron utilizando una concentración del soporte de 4%, con un tamaño de gránulo de 1 mm<sup>3</sup>.
  
5. Las condiciones de reacción de síntesis de L-DOPA utilizando como biocatalizador células de *C. freundii* inmovilizadas en carragenina se alcanzaron bajo las siguientes condiciones: temperatura 30°C; pH 7.5; concentración de catecol 0.075; concentración de piruvato de sodio 0.15 M; concentración de acetato de amonio 0.60 M. Estas condiciones son las mismas que para el empleo de células libres, sin embargo, el tiempo de reacción se incrementó en 2 horas. Bajo estas condiciones se alcanzó una velocidad inicial máxima de 2.2139 mmoles/mLxh y una actividad enzimática máxima de  $437.67 \times 10^{-4}$  mmoles/mg<sub>x</sub>h.

## REFERENCIAS

1. Alvarez de la Cuadra, J.J. y M. de la Garza A. 1992. Aminoácidos producidos por microorganismos y empleados en la industria. En: Biotecnología Hoy. Jaime Alvarez de la Cuadra, Coordinador. Primera Edición. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. México, D.F. p.p. 41-54. 172 p.
2. Aminoff, M.J. 1998. Enfermedad de Parkinson y Otros trastornos Extrapiramidales. En: Harrison: Principios de Medicina Interna. Fauci, A.S., Braunwald, E., Isselbacher, K.J., Wilson. J.D., Martin, J.B., Kasper, D.L., Hauser, S.L. y Longo, D.L., editores. México, D.F. p.p 2681-2689.
3. Ariga, O., H. Takagi, H. Noshizawa and Y. Sano. 1987. Immobilization of microorganisms with PVA hardened by iterative freezing and thawing. J. Ferment. Technol. 65:651-658.
4. Barbolina, M.V., R.S. Phillips, P.D. Gollnick, N.G. Faleev and T.V. Demidkina. 2000. *Citrobacter freundii* tyrosine phenol-lyase: the role of asparagine 185 in modulating enzyme function through stabilization of a quinonoid intermediate. Protein Eng. 13(3):207-215.
5. Bianchine, J.R. 1986. En: Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. A. Goodman, L. Gilman, T.W. Rall y F. Murad, editores. Séptima Edición. Editorial Médica Panamericana. México, D.F. p.p.456-472.
6. Brock, T.D. y M.T. Madigan. 1993. Microbiología. Prentice Hall Interamericana, S.A. Sexta Edición. México, D.F. 956 p.
7. Brot, N., Z. Smith and H. Weissback. 1965. Conversion of L-tyrosine to phenol by *Clostridium tetanomorphum*. Arch. Biochem. Biophys. 112:1-6.
8. Cárdenas, E. R. A. 1991. Hechos en Biotecnología. Primera edición. A.G.T Editor. México, D.F. 284p.
9. Carman, G.M. and R.E. Levin. 1977. Characteristics of Tyrosine Phenol-Lyase From *Aeromonas phenologenes* ATCC 29063. J. Food Biochem. 1:285-299.

10. Chen, H.Y., T.V. Demidkina and R.S. Phillips. 1995. Site-directed mutagenesis of tyrosine-71 to phenylalanine in *Citrobacter freundii* tyrosine phenol-lyase: evidence for dual roles of tyrosine-71 as a general acid catalyst in the reaction mechanism and in cofactor binding. *Biochem.* 34(38):12276-12283.
11. Chibata, I., T. Tosa and T. Sato. 1972. Preparation and industrial application of immobilized aminoacylases. In: Proc. IV Int. Ferment. Symp. Fermentation Technology Today. Society for Fermentation Technology, Japan. P.p. 383-389.
12. Chibata, I. 1978. Immobilized Enzymes. Research and Development. John Wiley and Sons, Inc. New York. 284 p.
13. Chibata, I., T. Tosa and T. Sato. 1983. Immobilized cells in the preparation of fine chemicals. *Adv. Biotechnol. Proc.* 10:203-222.
14. Chibata, I. and L.B. Wingard Jr. (ed.). 1983. Immobilized microbial cells. *Appl. Biochem. Bioeng.* Vol 4. 1025-1031.
15. Chibata, I., T. Tosa and T. Sato. 1986. Methods of cell immobilization. In: *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology.* Demain, A.L. and N.A. Salomons, eds. American Society for Microbiology. Washington, D.C. p.p. 217-229.
16. Cleland, W.W. 1963. The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products 1. Nomenclature and rate equations. *Biochem. Biophys. Acta.* 67:104-137.
17. Contreras, E.J.C. 1992. Obtención de L-tirosina en un proceso periódico mediante células del microorganismo *Citrobacter intermedius* con actividad tirosinfenoliasa. Tesis Licenciatura, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila. Saltillo, Coahuila. México. 45 p.
18. Cortés, P.C.J. 1992. Obtención de L-tirosina empleando como biocatalizador células de *Citrobacter intermedius* con alta actividad tirosinfenoliasa. Tesis Maestría. Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, Qro., México. 142 p.
19. Cotzias, G.C., P.S. Papavasiliou and R. Gellene. 1969. Modification of Parkinsonism: chronic treatment with L-dopa. *New. Engl. J. Med.* 280:337.
20. Debabov, V.G. y V.A. 1998. Métodos Modernos de Creación de Cepas Microbianas Industriales. Serie Biotecnología 2. Editorial Escuela Superior. Moscú, Rusia. p.p. 668.

21. Demidkina, T.V., J.V. Myagkikh and A.V. Azhhayev. 1987. Transamination catalyzed by tyrosine phenol-lyase from *Citrobacter intermedius*. Eur. J. Biochem. 170:311-316.
22. Demidkina, T.V., I.V. Myagkikh, A.A. Antson and E.H. Harutyunyan. 1988. Crystallization and crystal data on tyrosine phenol-lyase. FEBS Letters. 232(2):381-382.
23. Dixon, M. And E.C. Webb. 1979. Enzymes Longman Group Limited. 3th edition. U.S.A. 1116 p.
24. Douzou, P. 1986. Las biotecnologías. Fondo de Cultura Económica S.A. de C.V. México, D.F. 125p.
25. Egorov, N.S. 1986. Metabolismo Microbiano-Prácticas. Editorial Universidad. Moscú, Rusia. 687p.
26. Enei, H., H. Matsui, K. Yamashita, S. Okumura and H. Yamada. 1972. Distribution of tyrosine phenol lyase in microorganisms. Agric. Biol. Chem. 36(11): 1869-1876.
27. Enei, H., H. Matsui, S. Okumura and H. Yamada. 1972. Elimination replacement and isomerization reactions by cells containing tyrosine phenol lyase. Agric. Biol. Chem. 37: 725-735.
28. Enei, H. H. Matsui, H. Nakasuma, S. Okumura and H. Yamada. 1973. Synthesis of L-tyrosine and 3,4-dihydroxyphenilalanine from piruvic acid, ammonia and phenol or pyrocatecol. Agri. Biol. Chem. 37:725-735.
29. Enei, H. And H. Yamada. 1986. 3,4-dyhydroxyphenilalanine. In: K. Aida, I. Chibata, K. Nakayama, K. Takinami and H. Yamada (eds), Biotechnology of aminoacid production. Elsevier. Japan. p.p. 280-285.
30. Enoui, T., M. Kotani, B. Tamamushi and K. Toyama. 1959. Rikagaku Jiten. Iwanami Shoten, Japan. 962 p.
31. Erokhina, L.I. 1979. Investigaciones Genoselectivas con productores de enzimas. II Reunión Sobre Enzimas Microbianas. U.R.S.S. 239 p.
32. Faleev, N.G., N.S. Sadovnikova, N.S. Martinkova and V.M. Belilov. 1980. Formation of Tirosine from glicine, formaldehyde and phenol under the action of a partial purified preparation of tirosine phenol lyase: the preparation of a different enzyme. Enzyme Microbiol. Technol. 1: 269.



33. Faleev, N.G., S.B. Ruvinov, T.V. Demidkina, I.V. Myagkikh, M.Y. Gololobov, V.I. Bakhmutov and V.M. Belikov. 1988. Tyrosine phenol-lyase from *Citrobacter intermedius*. Factor controlling substrate specificity. *Eur. J. Biochem.* 177:395-401.
34. Faleev, N.G., S.N. Spirina, V.S. Ivoilov, T.V. Demidkina and R.S. Phillips. 1996. The catalytic mechanism of tyrosine phenol-lyase from *Erwinia herbicola*: the effect of substrate structure on pH dependence on kinetics parameters in the reactions with ring-substituted tyrosines. *Z. Naturforsch.* 51(5-6):363-370.
35. Foor, F., N. Morin and K.A. Bostian. 1993. Production of L-3,4-dihydroxyphenylalanine in *Escherichia coli* with a tyrosine phenol-lyase gene cloned from *Erwinia herbicola*. *Appl. Environ. Microbiol.* p.p. 3070-3075.
36. Fukui, S., S.I. Ikeda, M. Fujimura, H. Yamada and Kumagai. 1975a. Comparative studies on the properties of tryptophanase and tyrosine phenol lyase immobilized directly on sepharose or by use of sepharose bound pyridoxal 5'-phosphate. *Eur. J. Biochem.* 51:155-164.
37. Fukui, S., S.I. Ikeda, M. Fujimura, H. Yamada and Kumagai. 1975b. Production of L-tryptophan, L-tyrosine and their analogues by use of immobilized tryptophanase and immobilized  $\beta$ -tyrosinase. *Eur. J. Appl. Microbiol.* 1: 25-39.
38. Funk and Wagnalls. 1998. Enfermedad de Parkinson. *New Encyclopedia.* Funk and Wagnalls Corporación. <http://www.fwkc.com>.
39. Ganong, F. W. 1992. *Fisiología Médica.* 13<sup>a</sup> Edición. El Manual Moderno. México, D.F. 744 p.
40. Glick, B.R. and J.J. Pasterak. 1998. *Molecular Biotechnology. Principles and Applications of Recombinant DNA.* Second edition. American Society for Microbiology Press. Washington, D.C. U.S.A. 683 p.
41. Gorina, I.A. and I.V. Yakovleva. 1980. Rapid Method for Measuring Protein Content in microbial cells. *Appl. Biochem. Microbiol.* 16(6):936-939.
42. Guiseley, K.B. 1989. Chemical and physical properties of algal polysaccharides used for cell immobilization. *Enzyme. Microb. Technol.* 11:706-716.
43. Haneda, K., S. Watanabe and I. Takeda. 1971. Microorganisms with  $\alpha$ -tyrosinase activity. *Appl. Microbiol.* 22:721.

44. Harrison, L. 1987. Immobilized enzymes and their applications. *In: Sidwick, J. And R. Holdhom, (eds), Biotechnology of waste treatments and explotation. England. p.p. 81-120.*
45. Hee-Sung, P., L. Jang-Young and K. Hak-Sung. 1998. Production of L-DOPA (3,4-Dihydroxyphenyl-L-alanine) from Benzene by Using a Hibrid Pathway. *Biotechnol. Bioengin. 58(2-3):339-343.*
46. Iborra, J.L., A. Manjón and M. Cánovas. 1997. Immobilization on Carrageenans. *In: Bickerstaff, G.F. (ed), Immobilization of Enzymes and Cells. Humana Press. Totowa, N.J., U.S.A. p.p. 53-60.*
47. Ichihara, H., H. Yoshimatsu and Y. Sakamoto. 1956. Studies in phenol formation. *J. Biochem. 43:803-810.*
48. Jansonius, J.N. 1998. Structure, evolution and action of vitamin B<sub>6</sub>-dependent enzymes. *Curr. Op. Struc. Biol. 8:759-769.*
49. Kaplan, M. and M. Flavin. 1966. Cystathionine synthetase of *Salmonella*. *J. Biol. Chem. 241:4463-4471.*
50. Karsten, W.E., R.B. Gates and R.E. Viola. 1986. Kinetics studies of L-aspartase from *Escherichia coli*: substrate activation. *Biochem. 25:1299-1303.*
51. Kumagai, H., H. Yamada, H. Matsui, H. Ohkishi and K. Ogata. 1970. Tyrosine phenol-lyase. I. Purification, crystallization, an properties. *J. Biol. Chem. 245:1767-1772.*
52. Kumagai, H., N. Kashima, H. Torrii, H. Yamada, H. Enei and S. Okumura. 1972. Purification, crystallization and propierties of tyrosine phenol lyase from *Erwinia herbicola*. *Agric. Biol. Chem. 36: 472-482.*
53. Kumagai, H., S. Sezima, H. Yamada, T. Hino and S. Okumura. 1976. Synthesis of 3,4,-dihidroxyphenylalanine using the microorganism fixed  $\beta$ -tyrosinase. *Ann. Met. Agr. Chem. Soc. Jpn. Kyoto. p.p. 233-234.*
54. Kuo-Cheng, C. and J.Y. Houng. 1997. Cell Immobilization With Phosphorylated Polyvinyl Alcohol (PVA) gel. *In: Bickerstaff, G.F. (ed), Immobilization of Enzymes and Cells. Humana Press. Totowa, N.J., U.S.A. p.p. 207-216.*
55. 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.*

56. Kuplestkaya, M.B. 1981. Examination of tyrosine and 3,4-DOPA, synthesis by *Citrobacter freundii* 62. URSS Academy Science. Appl. Biochem. Microbiol. 17 (2): 278-283.
57. Lee, K.T. and H. Hsiao. 1986. Synthesis of L-tyrosine by a coupled reaction of serine hydroxymethyltransferase and  $\beta$ -tyrosinase. Enz. Microbiol. 9: 523-526.
58. Lloyd-George, I., T.M.S. Chang. 1995. Characterization of Free and Alginate-Polylysine-Alginate Microencapsulated *Erwinia herbicola* for the Conversion of Ammonia, Pyruvate and Phenol into L-tyrosine. Biotechnol. Bioengin. 48 (3): 706-714.
59. Lozinsky, V.I., A.L. Zubov and E.F. Titova. 1997. Poly(vinyl alcohol) cryogels employed as matrices for cell immobilization. 2. Entrapped cells resemble porous fillers in their effects on the properties of PVA-cryogel carrier. Enz. Microb. Technol. 20:182-190.
60. Masuoka, D.T., H.P. Schott, R.I. Akawie and W.G. Clark. 1956. Role of L-DOPA in nervous system. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 93:5.
61. Mavituna, F. and B. Atkinson. 1989. Biotechnology handbook. Elsevier. USA. 1210 p.
62. Miagkikh, I.V. and T.V. Demidkina. 1985. Effect of monovalent cations on the catalytic and spectral properties of tyrosine-phenol-lyase from *Citrobacter intermedius*. Molekuliarnaia Biologija. 19(3):671-678.
63. Michels, P.C. and J.P.N. Rosazza. 1999. Methods for Biocatalysis and Biotransformations. In: A.R. Demain and J.E. Davies (eds), Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. Second Edition. American Society for Microbiology Press. Washington, D.C. P.p. 165-180.
64. Montañez, C. 1986. Estructura y Replicación del Material Genético. In: Frixione, E., R. López-Revilla y V. Tsutsumi (eds), Temas Selectos de Biología Celular. SEP/COSNET/CINVESTAV. México, D.F. p.p. 291-319.
65. Mosbach, K. (ed.). 1987. Immobilized enzymes and cells. Part B. Methods Enzymol. Vol. 135. P.p. 3125-3138.
66. Myoga, H., H. Asano, Y. Nomura and H. Yoshida. 1991. Effects of immobilization conditions on the nitrification treatability of entrapped cell reactors using the PVA freezing method. Wat. Sci. Tech. 23:1117-1124.
67. Nagasawa, T., T. Utagawa, J. Goto, C.-J. Kim, Y. Tani, H. Kumagai and H. Yamada. 1981. Synthesis of L-Tyrosine-Related Amino Acids by Tyrosine Phenol-lyase of *Citrobacter intermedius*. Eur. J. Biochem. 117:33-40.

68. Newton, W., Y. Morino and E. Snell. 1965. Properties of crystalline tryptophanase. *J. Biol. Chem.* 240:1211-1218.
69. Ogata, K., H. Yamada, H. Enei and S. Okumura. 1974. Biological methods of producing phenolic aminoacids. USA patent 3.791.924.
70. Para, G. and J.C. Baratti. 1984. Effect of culture conditions on the production of tyrosine phenol-lyase by *Erwinia herbicola*. *Appl. Environ. Microbiol.* 48:1256-1258.
71. Para, G., P. Lucciardi, and J. Baratti. 1985. Synthesis of L-tyrosine by immobilized *Escherichia intermedia* cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 21: 273-279.
72. Para, G. and J. Baratti. 1988. Synthesis of L-dopa by *Escherichia intermedia* cells immobilized in a polyacrylamide gel. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28:222-228.
73. Phillips, R.S., K. Ravichandran and R. L. Von Tersch. 1989. Synthesis of L-tyrosine from phenol and S-(o-nitrophenyl)-L-cysteine catalized by tyrosine phenol-lyase. *Enzyme Microb. Technol.* 11:80-83.
74. Pialis, P., M.C. Jiménez-Hamann and B.A. Saville. 1996. L-DOPA production from tyrosinase immobilized on nylon 6,6. *Biotechnol. Bioengin.* 51(2):141-147.
75. Pine, S.H., J.B. Hendrickson, D.J. Cram y G.S. Hammond. 1988. *Química Orgánica. Cuarta edición (Segunda en español).* McGraw-Hill-Interamericana de México, S.A. de C.V. México, D.F. 1088 p.
76. Pletnev, S.V., A.A. Atson, N.I. Sinitsyna, Z. Dauter, M.N. Isupov, E.N. Hurs, N.G. Faleev, K.S. Wilson, G. Dodson, T.V. Demidkina and E.G. Arutyunyan. 1997. Crystallographic study of tyrosine phenolyase form *Erwinia herbicola*. *Crystallo. Rep.* 42:809-819.
77. Quintero; R.R. 1993. Aminoácidos. *In: García G, M., R, Quintero R. y A. López M. (eds), Biotecnología Alimentaria. Primera Edición.* Editorial Limusa. México, D.F. p.p. 401-421.
78. Quioco, F.A. and F.M. Richards. 1964. Intermolecular cross-linking of a protein in the crystalline state: carboxy-peptidase-A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 52:833-839.

79. Rangel, G.M.L. 1995. Influencia de la concentración de los componentes del medio de cultivo líquido sobre la expresión de la actividad tirosinfenoliasa de células de *Citrobacter freundii* en la síntesis del aminoácido L-tirosina. Tesis Maestría, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila. Saltillo, Coahuila, México. 130p.
80. Rodríguez, C. R. 1995. Vademécum Académico de Medicamentos. Segunda edición. Nueva Editorial Interamericana S.A. de C.V. México, D.F. 887 p.
81. Rodríguez, M.J., I.V. Tysychnaya, V.I. Yakovleva and I.V. Berezin. 1986. Some Kinetics Regularities of Tyrosine Synthesis Catalized by Free and Immobilized Bacterial Cells. Effect of Mass Transfer of Reactants on the Kinetics of Tyrosine Phenol-Lyase. URSS Academic of Science. Appl. Biochem. Microbiol. 51:1763-1775.
82. Rodríguez, M.J. y C.J. Cortés P. 1991. Determinación de las condiciones óptimas de la reacción tirosinfenoliasa catalizada por células de *Citrobacter intermedius* en la síntesis del aminoácido L-tirosina. Memorias del IV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. P.p. Fa03.
83. Rodríguez, M.J., J.C. Contreras E., C.J. Cortés P. y Y. Garza G. 1992. Síntesis enzimática de L-tirosina a partir de fenol, acetato de amonio y piruvato de sodio, catalizada por células libres de *Citrobacter intermedius* con actividad tirosinfenoliasa. Memorias del IX Congreso de Ingeniería Bioquímica. R-9.
84. Rodríguez, M.J., L. Rangel G. y Y. Garza G. 1993. Estudio de las condiciones de síntesis de L-tirosina a partir de fenol, acetato de amonio y piruvato de sodio por células de *Citrobacter freundii* nativas e inmovilizadas en k-carragenina. Biotecnología 3(3-4):TE-33.
85. Ruelas, C.X. 1995. Definición de los Parámetros de Inmovilización en Kappa-carragenina de Células de *C. freundii* con Actividad Tirosinfenoliasa. Tesis Maestría. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila. Saltillo, Coahuila, México. 102 p.
86. Ruelas, C. X., Y. Garza G. y J. Rodríguez M. 1995. Estudio sobre la inmovilización de *Citrobacter freundii* con actividad tirosinfenoliasa utilizando gel de k-carragenina como soporte. XXVI Congreso Nacional de Microbiología. Veracruz, Ver. Mex.
87. Sasaki, T. 1921. Synthesis of L-DOPA. Ber. 54:163.
88. Sato, T., T. Mori, T. Tosa and I. Chibata. 1971. Studies on immobilized enzymes. IX. Preparation and properties of aminoacylase covalently attached to halogenacetyl-celluloses. Arch. Biochem. Biophys. 147:788-796.

89. Schejter, A. and A. Bar-Eli. 1970. Preparation and properties of crosslinked water-insoluble catalase. Arch. Biochem. Biophys. 136:325-330.
90. Schmidt, K.F. 1924. Methods for L-3,4-dihydroxyphenylalanine obtention. Ber. 57:704.
91. Segel, I.H. 1975. Enzyme kinetics: behaviour an analysis of rapid equilibrium and steady state enzyne systems. Wiley, N.Y.
92. Sih, C.J., P. Foss, J. Rosazza and M. Lemberger. 1969. Microbiological synthesis of L-3,4-dihydroxyphenylalanine. J. Am. Chem. Soc. 91:6204.
93. Soria Ortiz, A.I. 1996. Definición de parámetros óptimos de la reacción aspartatoamoniocoliase catalizada por células de *Bacillus cereus* nativas e inmovilizadas en gel de  $\kappa$ -carragenina por diferentes métodos para la síntesis del aminoácido L-aspartico. Tesis Maestría. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila. Saltillo, Coahuila, México. 128 p.
94. Sosa Santillán, G.J. 1997. Tratamiento de aguas contaminadas con residuos fenólicos mediante el empleo de células de *Citrobacter freundii* con actividad tirosinfenoliasa. Tesis Maestría, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila. Saltillo, Coahuila, México. 155p.
95. Stansfield, W.D. 1984. Genética. Segunda Edición. McGraw-Hill de México S.A. de C.V. México, D.F. 405 p.
96. Stryer, L. 1993. Bioquímica. Tercera Edición. Editorial Reverté, S.A. Barcelona, España. 1084 p.
97. Sundararaju, B., A.A. Antson, R.S. Phillips, T.V. Demidkina, M.V. Barbolina, P. Gollnick, G.G. Dodson and K.S. Wilson. 1997. The crystal structure of *Citrobacter freundii* tyrosine phenol-lyase complexed with 3-(4'-hydroxyphenyl)propionic acid, together with site-directed mutagenesis and kinetic analysis, demonstrates that arginine 381 is required for substrate specificity. Biochem. 36(21):6502-6510.
98. Sundararaju, B., H. Chen, S. Chilcutt and R.S. Phillips. 2000. The role of glutamic acid-69 in the activation of *Citrobacter freundii* tyrosine phenol-lyase by monovalents cations. Biochem. 39(29):8546-8555.
99. Sysev, V.A., I.V. Tysichnaya, V.I. Yakovleva, M.B. Kupletskaya and I.V. Berezin. 1980. Isolation, purification and some properties of tyrosine phenol lyase from *Citrobacter freundii* cells. URSS Academy. 45: 889-896.

100. Tanaka, A. and T. Kawamoto. 1999. Cell and Enzyme Immobilization. In: A.R. Demain and J.E. Davies (eds), Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. Second Edition. American Society for Microbiology Press. P.p. 94-102.
101. Tosa, T., T. Sato, T. Mori, K. Yamamoto, I. Takata, Y. Nishida and I. Chibata. 1979. Immobilization of enzymes and microbial cells using carrageenan as matrix. Biotechnol. Bioeng. 21:1697-1709.
102. Tysychnaya, I.V., V.I. Yakovleva and A.K. Aren. 1981. Methods of Production of L-Tyrosine and L-3,4-Dihydroxyphenilalanine. Biochem. XVII(5):645-658.
103. Tysychnaya, I.V., J. Rodriguez, V.I. Yakovleva and I.V. Berezin. 1984. Immobilization of *Citrobacter freundii* Cells with Tyrosine Phenol-Lyase Activity by Entrapment in Natural Gels. Appl. Biochem. Microbiol. 20(1):79-87.
104. Voivodov, K.I., I.V. Tysychnaya, L.S. Gubnitskii, V.I. Yakovleva and I.V. Berezin. 1985. Enzymatic synthesis of 3,4-dihydroxyphenil-L-alanine by free and immobilized *Citrobacter freundii* cells. Prikladnaia Biokhimiia i Mikrobiologiya. 21(2):161-166.
105. Voivodov, K.I., N.N. Zueva, V.I. Yakovleva and I.V. Berezin. 1987. Kinetic study of 3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine synthesis in *Citrobacter freundii* cells immobilized in carrageenan. Prikl. Biokhim. Mikrobiol. 23(2):192-198.
106. Voivodov, K.I., N.N. Zueva and V.I. Yakovleva. 1989. Spectrophotometric and Chromatographic Assays of 3,4-Dihydroxyphenil-L-Alanine in Enzymatic Synthesis Using Bacterial Cells. Biochem. and Microbiol. URSS. XXV(2):278-285.
107. Winter, G., A. R. Fersht, A.J. Wilkinson, M. Zoller and M. Smith. 1987. Nature 299:756-758.
108. Wiseman, A. 1985. Manual de Biotecnología de los Enzimas. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España. 444 p.
109. Wu, K.Y.A. and K.D. Wisecarver. 1992. Cell immobilization using PVA cross-linked with boric acid. Biotechnol. Bioeng. 39:447-449.
110. Yamada, H., H. Kumagai, H. Matsui, H. Ohgishi and Ogata. 1972. Synthesis of L-tyrosine from piruvate, ammonia and phenol by cristalline tyrosine phenol lyase . Biochem. Biophys. Res. Commun. 46: 370-374.
111. Yamada, H. And H. Kumagay. 1975. Synthesis of L-tyrosine and related aminoacids by  $\beta$ -tyrosinase. Adv. Appl. Microbiol. 19:249-288.



OMNIPRO



