

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

*División de Estudios de Postgrado*



Desarrollo de la Actividad Aspartatoamoniaco-liasa en  
Células de Microorganismos para la Síntesis del  
Aminoácido L-Aspartico

## TESIS

Presentada como Requisito Parcial para  
Obtener el Grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
En la Especialidad de.

BIOLOGIA CELULAR Y GENÉTICA

Presenta:

YOLANDA GARZA GARCIA

San Nicolás de los Garza, N. L.

Junio del 2000

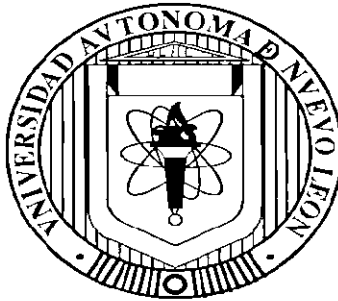
**TD**  
**QR92**  
**.A6**  
**G3**  
**2000**  
**c.1**



1080124493

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



DESARROLLO DE LA ACTIVIDAD ASPARTATOAMONIACOLIASA  
EN CELULAS DE MICROORGANISMOS PARA LA SINTESIS DEL  
AMINOACIDO L-ASPARTICO

TESIS

Que como requisito parcial  
para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
CON ESPECIALIDAD EN  
BIOLOGIA CELULAR Y GENÉTICA

Presenta

YOLANDA GARZA GARCIA

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N.L.

JUNIO 2000

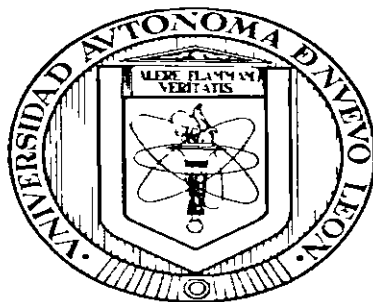
TD

2

6



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**DESARROLLO DE LA ACTIVIDAD ASPARTATOAMONIACOLIASA  
EN CÉLULAS DE MICROORGANISMOS PARA LA SÍNTESIS DEL  
AMINOÁCIDO L-ASPÁRTICO**

**TESIS**

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE**

**DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
CON ESPECIALIDAD EN  
BIOLOGÍA CELULAR Y GENÉTICA**

**PRESENTA**

**YOLANDA GARZA GARCÍA**

**COMITÉ DE TESIS**

**DR. CARLOS E. HERNÁNDEZ LUNA  
PRESIDENTE (DIRECTOR INTERNO)**

**DR. JOSÉ SANTOS GARCÍA ALVARADO  
SECRETARIO**

**DRA. MARÍA JULIA VERDE STAR  
VOCAL**

**DR. BENITO PEREYRA ALFÉREZ  
VOCAL**

**DR. JESÚS RODRÍGUEZ MARTÍNEZ  
VOCAL (DIRECTOR EXTERNO)**

**SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, N.L.**

**JUNIO 2000**

**DESARROLLO DE LA ACTIVIDAD ASPARTATOAMONÍACOLIASA EN  
CÉLULAS DE MICROORGANISMOS PARA LA SÍNTESIS DEL AMINOÁCIDO  
L-ASPÁRTICO**

El presente trabajo de investigación, fue realizado como parte integral de la formación académica del Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas, con especialidad en Biología Celular y Genética, de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Mediante una colaboración conjunta con el Departamento de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila, este trabajo de tesis doctoral, fue desarrollado en el Laboratorio de Microbiología y Biosíntesis de dicho Departamento, bajo la dirección de los Dres: Jesús Rodríguez Martínez y Carlos Eduardo Hernández Luna como directores externo e interno respectivamente.

# ÍNDICE

	PÁGINA
RESUMEN .....	1
INTRODUCCIÓN	
□ Antecedentes .....	3
□ Objetivos .....	9
□ Hipótesis .....	10
□ Justificación Científica .....	11
REVISIÓN DE LITERATURA	
CAPÍTULO I	
1.1 Métodos de síntesis de aminoácidos .....	12
1.1.1 Extracción de aminoácidos a partir de hidrolizados proteicos .....	13
1.1.2 Síntesis química de aminoácidos .....	14
1.1.3 Síntesis microbiológica o fermentación .....	17
1.1.4 Síntesis enzimática .....	24
CAPÍTULO II	
2.1 Aplicaciones y métodos de síntesis del aminoácido L-aspartico .....	32
2.1.1 Aplicaciones .....	32
2.1.2 Métodos de síntesis .....	33
2.2 Características de la aspartatoamoníacoliase .....	35
2.3 Producción industrial de ácido L-aspartico por método enzimático .....	37
CAPÍTULO III	
□ Los microorganismos como catalizadores .....	40
3.1 Regulación del metabolismo en la célula microbiana .....	46
3.1.1 Regulación de la actividad de las enzimas .....	50
3.1.1.1 Regulación de enzimas alostéricas .....	51
3.1.1.1.1 Regulación del tipo feedback .....	52
3.1.2 Regulación de la síntesis de enzimas .....	53
3.1.2.1 Represión por producto final .....	57
3.1.2.2 Inducción de la síntesis de enzimas .....	59
3.1.2.3 Represión catabólica .....	61
PARTE EXPERIMENTAL	
CAPÍTULO IV	
4.1 Etapas del trabajo de investigación .....	65
4.2 Obtención de cultivos puros e identificación .....	66



4.3 Comprobación del desarrollo de actividad enzimática aspartatoamoníacoliase en células de <i>B. cereus</i> y <i>E. cloacae</i> .....	69
4.3.1 Preparación de los biocatalizadores .....	69
4.3.2 Preparación del sustrato .....	70
4.3.3. Determinación de la concentración de proteína .....	71
4.3.4 Determinación de la actividad enzimática .....	74
4.3.5 Metodología para la identificación del producto de la reacción aspartasa .....	75
4.4 Selección de medios de cultivo líquido para la propagación de los microorganismos con actividad aspartatoamoníacoliase .....	76
4.5 Determinación del tiempo óptimo de incubación .....	78
4.6 Estudio sobre la influencia de cada uno de los componentes del medio de cultivo líquido seleccionado, sobre la expresión de la actividad aspartasa de <i>B. cereus</i> .....	80
4.7 Influencia de la concentración de tolueno como plasmolizador sobre la velocidad de la reacción aspartasa .....	81
4.8 Empleo de cloranfenicol para comprobar el estado de anabiosis de las células de <i>B. cereus</i> durante el proceso de biotransformación .....	83

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### CAPÍTULO V

5.1 Obtención de cultivos puros e identificación de las cepas seleccionadas .....	85
5.1.1 Identificación de los microorganismos .....	86
5.2 Comprobación del desarrollo de la actividad enzimática aspartatoamoníacoliase en células de <i>B. cereus</i> y <i>E. cloacae</i> .....	89
5.2.1 Estrategia bioquímica para la sobreproducción de la enzima aspartatoamoníacoliase en células de microorganismos .....	92
5.2.2 Identificación del producto de reacción .....	93
5.3 Selección de medios de cultivo para la propagación de los microorganismos con actividad aspartatoamoníacoliase .....	96
5.4 Determinación del tiempo óptimo de incubación de células de <i>B. cereus</i> y <i>E. cloacae</i> donde presentan una máxima expresión de la actividad aspartatoamoníacoliase .....	99
5.5 Estudio sobre la influencia de cada uno de los componentes del medio de cultivo líquido seleccionado, sobre la expresión de la actividad enzimática aspartasa, de células de <i>B. cereus</i> .....	107
5.6 Influencia de la concentración de tolueno como plasmolizador sobre la velocidad inicial de la reacción aspartatoamoníacoliase catalizada por células de <i>B. cereus</i> y <i>E. cloacae</i> .....	117

5.7 Comprobación del estado de anabiosis de las células de <i>B. cereus</i> durante la biotransformación del ácido fumárico en ácido L-aspartico .....	124
5.8 Comparación entre los estudios cinéticos de consumo de sustrato en la reacción aspartasa catalizada por células de <i>B. cereus</i> y <i>E. cloacae</i> cultivadas bajo las condiciones iniciales y bajo condiciones óptimas establecidas en este trabajo .....	129
CONCLUSIONES .....	133
PERSPECTIVAS DE LA INVESTIGACIÓN .....	136
BIBLIOGRAFÍA .....	138

## **RESUMEN**

### **DESARROLLO DE LA ACTIVIDAD ASPARTATOAMONÍACOLIASA EN CÉLULAS DE MICROORGANISMOS PARA LA SÍNTESIS DEL AMINOÁCIDO L-ASPÁRTICO**

El presente trabajo constituye una contribución básica al desarrollo de biocatalizadores fundamentados en células de microorganismos en reposo, para la obtención de aminoácidos. Para ello, se realizó el aislamiento, selección e identificación de cepas microbianas en las cuáles se indujo por métodos fisiológicos, la sobreproducción de la enzima intracelular aspartatoamoníacoliase o aspartasa, la cuál cataliza la formación del ácido L-aspartico a partir de ácido fumárico e hidróxido de amonio. Se establecieron las condiciones óptimas de cultivo bajo las cuáles, los biocatalizadores obtenidos presentaron los valores más altos de actividad enzimática aspartasa. Se estudiaron diferentes medios para la propagación de las células microbianas, se investigó el efecto de cada uno de los componentes del medio líquido sobre la expresión de la actividad enzimática aspartasa estudiando cada componente a diferentes concentraciones. Se logró definir el tiempo de incubación bajo el cuál, los biocatalizadores expresan en forma máxima la actividad enzimática de interés; asimismo, se estableció la concentración óptima de plasmolizador (tolueno), el cuál es utilizado en esta reacción para aumentar la permeabilidad de la membrana y facilitar el transporte de los sustratos y productos de la reacción sin que haya una lisis total de las células microbianas. Además, se determinó la actividad metabólica de las células microbianas utilizando un antibiótico, el cloramfenicol, tanto durante el crecimiento celular como en el proceso de biotransformación

en sí. Todos los experimentos se realizaron en reactores tipo batch; el curso de la reacción en el tiempo, fue monitoreado por el cambio en la concentración del sustrato mediante espectrofotometría.

La realización de esta investigación, nos permitió obtener dos cepas bacterianas con alta actividad enzimática aspartatoamoníacoliasa: *Bacillus cereus* (510 U) y *Enterobacter cloacae* (600 U) con tiempos óptimos de incubación de 6 h y 12 h respectivamente,

Es importante mencionar que algunos resultados del presente trabajo de investigación fueron evaluados y expuestos en el VII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y II Simposio Internacional de Ingeniería de Bioprocesos. Además se aceptó para su publicación el artículo "Optimization of aspartate ammonia lyase production by *Bacillus cereus*" en el *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology (USA)*.

# INTRODUCCIÓN

## ANTECEDENTES.

Los descubrimientos científicos de los últimos veinte años, han permitido al hombre tener un entendimiento mas profundo y creciente de la materia viva, lo cuál ha originado la oportunidad de imaginar y generar nuevos usos de estos conocimientos para mejorar la calidad de vida, aumentar la salud pública y contribuir al crecimiento económico.

Es un hecho indiscutible que en los tiempos modernos, la contaminación del medio ambiente originada principalmente por las metodologías tradicionales de obtención de diversos productos, el alto costo de estos y el agotamiento de los recursos naturales, han obligado al hombre a buscar en la propia naturaleza los cambios y mecanismos que rigen las transformaciones biológicas. En relación con esto, ha enfocado su interés en procesos en los cuáles se utiliza la actividad vital de los organismos, principalmente los microorganismos, encontrando nuevas estrategias de sobreproducción mediante la regulación y control de rutas metabólicas microbianas, usando las herramientas que proporcionan la biología celular y molecular modernas y desarrollando procesos biocatalíticos y biotransformaciones microbianas mas que procesos relacionados con la catálisis química convencional. Indudablemente, esta es una área muy actual que se espera tenga un gran impacto sobre el desarrollo tecnológico para la obtención de diferentes productos<sup>16</sup>.

La biocatálisis comprende las transformaciones efectuadas por las enzimas estereo- y sustrato específicas, que desde un punto de vista catalítico, son muy superiores a los catalizadores químicos ordinarios. Actualmente, las enzimas son obtenidas principalmente de células microbianas de las que pueden ser aisladas y purificadas o permanecer en su interior, de tal manera que la célula completa puede ser utilizada como un sistema

biocatalítico<sup>16.81.156.160</sup>(Ruban et.al.1968). Estos biocatalizadores pueden emplearse ya sea en forma nativa o inmovilizada en soportes o matrices de diferente naturaleza<sup>1</sup>. Lo anterior ha impulsado el desarrollo de la ingeniería enzimática que es un pilar fundamental del conocimiento de la biotecnología en general, la cuál se ha consolidado con el desarrollo de nuevos tipos de catalizadores que se distinguen por su alta actividad, especificidad y estabilidad. Esto ha traído consigo el fortalecimiento de la catálisis heterogénea, así como también a los procesos de flujo continuo que facilitan la separación del producto terminado.

La utilización de los microorganismos en calidad de sistemas multienzimáticos activos, capaces de traducir sustancias orgánicas exógenas en una diversidad de productos útiles y en sustancias fisiológicamente activas. esta fundamentada en que estos pueden realizar, en una sola etapa, transformaciones importantes que normalmente requieren durante la síntesis, de veinte etapas químicas. Además, se logran realizar fácilmente reacciones que son difíciles o que por el momento no se efectúan por los métodos de síntesis química. En los últimos quince años, se han demostrado claramente las ventajas del método de transformación microbiológica frente a las reacciones químicas, la posibilidad de cambios finos de moléculas complejas, la comodidad y economía de los procesos tecnológicos, etc.

En relación con esto, se ha despertado un gran interés por utilizar células completas de microorganismos como biocatalizadores en los procesos biotecnológicos para la obtención de productos destinados a la industria alimentaria, farmacéutica, agrícola, etc<sup>11.22.30.37.75.83.84.108.130.146.156.164</sup>. La razón de tal interés está basada en la facilidad con que se logra aumentar la cantidad de enzima sintetizada por el microorganismo, como respuesta a la presencia en el medio de cultivo de diferentes sustancias químicas que pueden utilizar como nutrientes; y además, de expresar una nueva actividad enzimática o de reforzar alguna que ya existía en dichas células. De esta manera, ha sido posible aumentar hasta 1000 veces el nivel

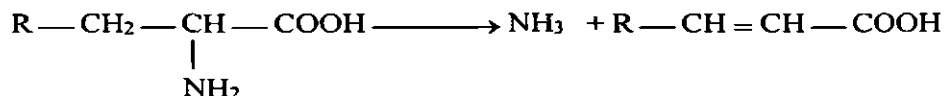
de enzimas que participan en rutas catabólicas y en varios cientos, el nivel de enzimas anabólicas. Todo esto, está relacionado con cambios en los mecanismos reguladores del metabolismo microbiano que comprenden la formación inducida de enzimas o el reforzamiento de alguna enzima de interés ya existente en un microorganismos dado; lo que también puede ser logrado por manipulaciones genéticas. Uno de los elementos claves para utilizar células de microorganismos como catalizadores, es el cambio selectivo de la permeabilidad de la pared celular y de la membrana citoplasmática para los sustratos y productos de la reacción que catalizan. Por otra parte, el empleo de células completas como catalizadores de los procesos enzimáticos, excluye el proceso laborioso y caro de la extracción y purificación de la enzima; además de que se eleva en gran medida la estabilidad del biocatalizador ya que la enzima se encuentra en su microambiente y puede también ser utilizada en forma múltiple. Otro aspecto importante. es la economía relativa del cultivo de microorganismos a nivel industrial utilizando medios de cultivo con un valor no muy elevado y además, la velocidad de crecimiento tan alta que tienen los microorganismos.

Una de las aplicaciones con expectativas favorables en esta área, es la biosíntesis de aminoácidos, principalmente de forma L. En la actualidad se han obtenido ya preparados bastante estables de catalizadores bioorgánicos para la obtención de una serie de L-aminoácidos: tirosina, triptofano, ácido aspártico, citrulina, lisina, dihidroxifenilalanina, etc <sup>76.78.84.144.146.164.165</sup>.

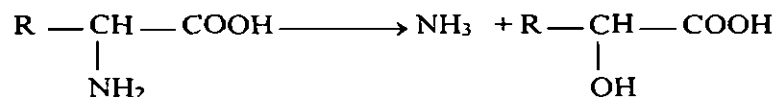
El catabolismo al que son sometidos la mayoría de los aminoácidos, se inicia con la disociación del grupo amino  $\alpha$ -. ya sea por transaminación o por oxidación. En las reacciones de transaminación. participan los aminoácidos: alanina, arginina, aspártico, valina, isoleucina, lisina, tirosina, triptofano, fenilalanina, cisteína; asimismo, los siguientes cetoácidos: pirúvico,  $\alpha$ -cetoglutárico o el oxalacético. En este caso, el grupo amino  $\alpha$  se transfiere al átomo de

carbono  $\alpha$  de uno de los cetoácidos mencionados. Como resultado, el grupo amino cambia de lugar con el cetogruppo.

En las reacciones de desaminación, el amoníaco se separa del aminoácido correspondiente en forma directa, hidrolítica u oxidativa. Como resultado de la desaminación directa, se forman sustancias insaturadas:

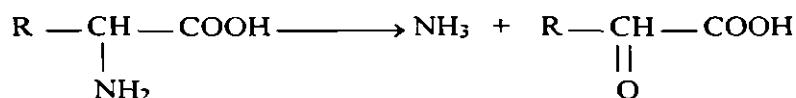


En el caso de desaminación hidrolítica, se forma amoníaco y oxiácidos:



En algunos microorganismos, este tipo de desaminación ocurre al mismo tiempo con la descarboxilación del mismo aminoácido.

La desaminación oxidativa que esta más difundida es la que ocurre con formación de cetoácidos:



Además de estas reacciones catabólicas, los aminoácidos pueden ser sometidos también a descarboxilación formando  $\text{CO}_2$  y aminas biogénicas.

Cualquier transformación de los aminoácidos por las reacciones indicadas arriba, concluye en que su esqueleto carbonado, va a entrar en la composición del ácido pirúvico o de la Acetil CoA. introduciéndose también en el metabolismo de carbohidratos y de lípidos.

Los aminoácidos han encontrado en los últimos años una amplia aplicación en distintas



áreas de la economía y medicina. Tienen un valor fundamental en la composición de los alimentos balanceados; son empleados como aditivos tanto en la industria alimentaria como en la alimentación para ganado. Como aditivos en alimentos, con más frecuencia se utilizan lisina y metionina. El glutamato de sodio y la glicina se utilizan como sustancias aromáticas para reforzar y mejorar el sabor de los alimentos; la glicina proporciona un sabor dulce. Se utiliza para la preparación de bebidas dulces y presenta también un efecto bactericida. La cisteína evita que se quemen los alimentos, mejora el sabor en la elaboración de pan y se emplea para dar sabor y aroma a los alimentos preparados a base de carne.

En los últimos años, la cantidad de aminoácidos que es agregada a los materiales alimenticios para los animales, ha aumentado hasta 20 veces. Cerca del 60% de la cantidad total de aminoácidos obtenidos en la industria, es utilizada en ganadería, 30% en la industria alimentaria y 10% en medicina, cosméticos y en investigación.

La arginina en combinación con aspartato o glutamato, se utiliza para tratar enfermedades del hígado; permite además que aumente la actividad del sistema inmunológico después de una operación. El aspartato de Na-K disminuye la fatiga cardíaca; es recomendado también para tratar enfermedades del hígado y en la diabetes. La cisteína protege de la oxidación a las enzimas-SH en el hígado y en otros tejidos y tiene una acción desintoxicante; expresa también un efecto defensivo contra los daños ocasionados por radiación. El triptofano es un agente antidepresor utilizándose también en el tratamiento del alcoholismo.

La dihidroxifenilalanina (DOPA) y la fenilalanina, son utilizados en el tratamiento del mal de Parkinson; su análogo, 5-hidroxil-L-triptofano, se emplea como un medicamento psicoterapéutico. A partir de los poliaminoácidos, se obtiene un excelente material para cirugía, el cuál es también utilizado como sustituto de piel humana en el tratamiento de las quemaduras. A partir de aminoácidos, se preparan también edulcorantes, por ejemplo, el éter

metílico de L-aspartil-L-fenilalanina o aspartame<sup>141,142</sup>, el cuál es 150 veces mas dulce que la glucosa. Con el aspartame, se logra disminuir hasta 95% las calorías de una serie de productos alimenticios sin alterar su sabor. Los aminoácidos se utilizan también en la preparación de cosméticos; para mantener la función normal de la piel. La cisteína se utiliza también en la elaboración de shampoo<sup>160</sup>.

De esta manera, la aplicación de los aminoácidos en las distintas áreas de la economía, es bastante variada; sin embargo está limitada por su nivel de producción. Actualmente, el nivel mundial de la producción de aminoácidos alcanza varios millones de toneladas al año y la mayor producción está dirigida a: ácido glutámico, L-lisina, DL-metionina, ácido L-aspartico y glicina<sup>5.22.97.121.153</sup>.

## OBJETIVOS

1. Aislar e identificar microorganismos que puedan ser inducidos a sobreproducir la enzima intracelular aspartatoamoníacoliase para la síntesis del aminoácido L- aspártico.
2. Establecer un medio de cultivo con condiciones bien definidas y reproducibles para el desarrollo máximo de la actividad enzimática aspartasa en las células microbianas obtenidas.
3. Establecer el tiempo óptimo de incubación en un cultivo periódico, en el cuál, los biocatalizadores (células microbianas) desarrollados expresen la máxima actividad enzimática aspartatoamoníacoliase.
4. Optimizar la concentración de un solvente de naturaleza orgánica que se utilizará como plasmolizador (tolueno), para aumentar la permeabilidad de la pared celular y membrana citoplasmática, lo que permitirá minimizar los problemas de difusión que normalmente se presentan al utilizar células de microorganismos completas como catalizadores en diferentes procesos biotecnológicos.
5. Demostrar que cuando las células microbianas son utilizadas en procesos de biotransformación como el presente, tienen un metabolismo alterado por no encontrarse en condiciones fisiológicas adecuadas para su desarrollo, crecimiento y reproducción.

## HIPÓTESIS

Existe la opinión de que, a partir de las células microbianas, se pueden obtener cualquiera de las enzimas conocidas y de que es posible reforzar su capacidad hacia la síntesis de enzimas mediante procesos de selección, obteniendo formas mutantes altamente productoras. La cantidad y composición de las enzimas sintetizadas por la célula depende de las propiedades hereditarias de dicho organismo; aunque independientemente del determinante papel del factor genético en la biosíntesis de enzimas, la eficiencia de los procesos tecnológicos esenciales para cada enzima depende, y no en último lugar, de la composición del medio nutritivo, teniendo en cuenta la presencia en este, no solamente de las fuentes de carbono, nitrógeno, fósforo y otros elementos sino también, de sustancias que juegan el papel de inductores o de represores de la biosíntesis de una enzima dada o de su grupo. En este sentido, en el desarrollo del presente trabajo de investigación. para dirigir el metabolismo de microorganismos aislados, hacia la sobreproducción de la enzima aspartatoamoníacoliase, además de los nutrientes necesarios para el crecimiento y multiplicación celular, se utilizará el ácido L-aspartico como inductor para aumentar la producción de esta enzima que cataliza la aminación reversible del ácido fumárico con amoníaco para formar ácido L-aspartico.

Considerando además, que los metabolitos primarios (enzimas) son formados durante la trofofase, se utilizará un inhibidor de la síntesis de proteína para comprobar esta hipótesis y el hecho de que las células en reposo que se utilizan como catalizadores en las biotransformaciones microbianas, son células que conservan la mayor parte de las actividades enzimáticas pero que no toman el sustrato a transformar como fuente de carbono o energía.

## **JUSTIFICACIÓN CIENTÍFICA**

El desarrollo del presente trabajo de tesis, constituye la base de un proyecto de investigación que tiene como objetivo general, la síntesis de L-aminoácidos: ácido L-aspártico, L-tirosina y L-3,4 dihidroxifenilalanina mediante células de microorganismos con actividad aspartatoamoníacoliase y tirosinfenoliasa respectivamente. Este proyecto pretende establecer las bases científicas y tecnológicas de producción de estos aminoácidos por primera vez en nuestro país y crear modelos que expliquen el uso de células de microorganismos como catalizadores en los procesos biotecnológicos, lo que implica la comprensión del mecanismo de acción de las enzimas y de sus características reguladoras en el proceso de actividad vital de dichas células microbianas.

## REVISIÓN DE LITERATURA

### CAPÍTULO I

#### I.1 MÉTODOS DE SÍNTESIS DE AMINOÁCIDOS

Muchas áreas de la economía nacional como la industria alimentaria, farmacéutica, la agricultura, el área de salud y la síntesis orgánica fina, tienen requerimientos cada vez mas elevados de los preparados de aminoácidos en la forma L-<sup>11</sup>. La producción de aminoácidos en el mundo, aumenta constantemente y en la actualidad es de aproximadamente 500,000 ton. anuales<sup>2</sup>. Los aminoácidos, al igual que muchas otras sustancias biológicamente activas, pueden ser obtenidos por métodos químicos o biológicos y la selección de una ruta concreta para su obtención, es determinada generalmente por la efectividad económica comparativa entre los métodos de producción químicos y biológicos<sup>22</sup>; aunque en muchos casos, en la práctica, se utiliza tecnología que comprende la combinación de los dos tipos de producción.

Los métodos fundamentales de obtención de aminoácidos son los siguientes<sup>5</sup>:

- a) Extracción a partir de hidrolizados protéicos de materiales vegetales o animales.
- b) Síntesis química.
- c) Síntesis microbiológica por células en crecimiento o fermentación.
- d) Síntesis enzimática, utilizando enzimas purificadas o células de microorganismos.

## **I.1.1. EXTRACCIÓN DE AMINOÁCIDOS A PARTIR DE HIDROLIZADOS**

### **PROTÉICOS DE MATERIALES VEGETALES O ANIMALES.**

Esta metodología es una de las más simples para la obtención de aminoácidos<sup>105</sup> y es posible aplicarla solamente cuando estos tienen propiedades bastante diferentes entre sí; por ejemplo, cisteína y tirosina debido a su baja solubilidad en su punto isoeléctrico, se separan fácilmente de los aminoácidos que son solubles en agua.

Las proteínas de origen vegetal o animal que constituyen la materia prima, son sometidas a hidrólisis ácida, básica o enzimática con tripsina. La materia prima que es utilizada para este objetivo la constituyen, además de material vegetal, residuos queratínicos de la industria de la carne, pescado, industria ligera (lana, plumas, pezuñas, cuernos, etc.) los cuáles contienen hasta un 90% de proteína.

La hidrólisis ácida resulta ser la más efectiva en comparación con la hidrólisis básica o enzimática; la disociación completa de las proteínas ocurre en un tiempo muy corto y no existe la racemización de los aminoácidos; sin embargo, la hidrólisis ácida tiene una desventaja, la destrucción del triptofano. La separación total de los aminoácidos se realiza solamente después de una eliminación completa de las sustancias minerales. El rendimiento llega a ser de un 60-65% y la pureza, no menos del 99%<sup>62</sup>.

En los países del sureste de Asia, por ejemplo, se obtiene monoglutamato de sodio a partir de la harina de soya sin grasa; en Estados Unidos, fue descrito un método de obtención de aminoácidos a partir de la cascarilla de trigo y del gluten del maíz residual después del lavado del almidón.

La desventaja fundamental del método de extracción, es la limitación y no-estandarización de las materias primas, el empleo irracional de estas (las cuáles puede tener una utilización mejor como producto alimenticio en ganadería, particularmente cuando se

trata de materia prima vegetal); las múltiples etapas del tratamiento químico relacionadas con la separación y purificación de los aminoácidos, etc. Debido a estas consideraciones, la extracción de aminoácidos por este procedimiento, no es económicamente favorable<sup>22</sup>.

### **I.1.2. SÍNTESIS QUÍMICA DE AMINOÁCIDOS.**

En la actualidad, se ha realizado la producción industrial de muchos aminoácidos por síntesis orgánica, ya que mediante este método es posible obtener sustancias con cualquier estructura química y organizar una producción continua altamente automatizada<sup>124</sup>. De esta manera, se produce D,L-metionina, ácido glutámico, lisina, triptofano, treonina, glicina y algunos otros aminoácidos con un alto rendimiento y un alto grado de pureza química. Sin embargo, este método tiene una serie de desventajas esenciales, siendo la más importante la formación de racematos (mezclas equivalentes de formas L- y D- de aminoácidos), los cuales requieren de una purificación posterior muy costosa y compleja que dificulta la producción de varias toneladas. La producción de aminoácidos destinados a la alimentación, está basada únicamente en la forma L- biológicamente activa de los aminoácidos y por lo tanto, la presencia de formas D siempre es indeseable no solo porque es un remanente que no es asimilado por el organismo humano ni animal, sino también porque en algunos aminoácidos tiene propiedades tóxicas. La excepción la constituyen la glicina y metionina; para el primero, no existe el isómero ópticamente activo y para el segundo, las formas D- y L- son asimiladas de igual manera por el organismo.

- Ejemplos de producción de aminoácidos por síntesis química:

- 1) Obtención de D,L-metionina a partir de acroleína. Es un proceso bastante complejo y de múltiples etapas. Para la producción de una tonelada de D,L-metionina se consumen, aproximadamente 0.6 ton. de acroleína y la separación del racemato no está considerada.



- 2) Obtención de D,L-triptofano a partir del indol y éter nitroacético.
- 3) Obtención de L-glutamato de sodio a partir de acronitrilo. El racemato que se forma es más soluble que cada uno de los isómeros por separado; así que para la separación de la forma L- de una solución saturada, se añaden cristales de glutamato de sodio.
- 4) Obtención de L-lisina a partir de ciclohexanona. La separación del racemato que se forma, está basada en la diferente solubilidad de las sales que son obtenidas al reaccionar este con el ácido pirúvico. Después de la separación de los isómeros D- y L- de la lisina, las sales se destruyen, la forma L- se libera del ácido L-pirúvico con ayuda de columnas de intercambio iónico.
- 5) Síntesis química de DOPA a partir del ácido 3-metoxi-4-oxiacetilcorísmico, iniciando la reacción con éter nitroacético.

Los ejemplos mencionados de producción de aminoácidos por el método de síntesis orgánica sugieren una gran cantidad de operaciones tecnológicas y la realización de cada una de ellas requiere de equipo especializado y básico para el control del proceso. La tecnología de dicha producción, en la mayoría de los casos, está orientada a la utilización de sustancias bastante tóxicas, de reactivos con un alto grado de pureza y la subsecuente separación de los racematos formados. Para superar todas estas desventajas del método químico para la producción de aminoácidos, constantemente se buscan nuevas rutas de obtención y se perfeccionan los métodos de separación de los componentes de la mezcla racémica<sup>99</sup> y los métodos de transformación de la forma D- en L-.

Entre los métodos fisicoquímicos de separación de los racematos de aminoácidos se utilizan la cristalización selectiva y cromatografía estereoselectiva<sup>10,36,146</sup>. El método de cromatografía estereoselectiva permite separar completamente los racematos en un tiempo comparable al que se lleva el análisis de aminoácidos en cromatografía líquido gaseosa, pero a

diferencia de ésta no requiere una modificación química previa de los aminoácidos. Las desventajas de la cromatografía estereoespecífica son la especificidad limitada y las soluciones bastante diluídas en la salida de la columna<sup>5,129</sup>. El D-aminoácido obtenido, se racemiza en el correspondiente L-isómero al calentarlo en presencia de bases o de ácidos. La mayoría de los aminoácidos se racemizan en presencia de un exceso de anhídrido acético en solución de ácido acético a temperatura ambiente.

En los últimos años, se ha logrado avanzar en el área de síntesis asimétrica de aminoácidos que permite desplazar la separación óptica de los aminoácidos racémicos<sup>5</sup>. Un nuevo enfoque a este problema llegó a ser posible gracias al descubrimiento de la hidratación catalítica homogénea de olefinas con ayuda de complejos de rodio con ligandos fosfínicos y la elaboración de rutas de síntesis de fosfinas quirales. La aplicación de complejos de rodio con fosfinas quirales en calidad de catalizadores homogéneos para la hidratación de ácidos N-acilaminoacrílicos, permitió realizar la síntesis asimétrica de  $\alpha$ -aminoácidos con un alto grado de estereoespecificidad y un alto rendimiento.

La utilización de aminoácidos obtenidos por síntesis química en la industria alimentaria en general y en medicina, tiene aún un problema técnico esencial; la liberación completa del producto terminado de posibles derivados tóxicos.

En los últimos años, se han conjugado los métodos de síntesis química y microbiológica para dar lugar a una metodología que utiliza materia prima o sustancias iniciales que son producto de procesos químicos y la etapa final es realizada por la actividad de sistemas enzimáticos de las cepas microbianas respectivas<sup>5</sup>. Como ejemplo de este tipo de procesos, podemos mencionar la separación de las mezclas racémicas de aminoácidos mediante la enzima aminoacilasa inmovilizada<sup>35</sup>, la cuál se utiliza en Japón desde 1969 para producir, a nivel industrial, valina, metionina fenilalanina y algunos otros; además de la racemización de

los D-aminoácidos con racemasas de origen microbiano. La racemasa que más se ha encontrado en bacterias y otros aminoácidos y la mas estudiada es la racemasa de D-alanina<sup>69.117.146</sup>. Se conoce también la racemasa de treonina, metionina, leucina, prolina<sup>122</sup>, de fenilalanina<sup>158</sup>.

### **I.1.3. SINTESIS MICROBIOLÓGICA O FERMENTACIÓN.**

El método microbiológico de síntesis de aminoácidos está fundamentado en que los microorganismos sintetizan estas sustancias en forma natural como productos primarios del anabolismo para la elaboración de sus propias proteínas y como sustratos para la formación de otros compuestos; esto lo efectúan mediante una fermentación directa a partir de la fuente principal de carbono, la cual puede ser glucosa, hidrolizados de almidón, melaza, etc<sup>5.22.95.124.146</sup>; sin embargo, su producción está sujeta a un estricto control metabólico. lo que significa que para objetivos industriales, la selección de cepas hiperproductoras tiene un significado muy importante.

Los microorganismos que generalmente se utilizan para la producción de aminoácidos, se subdividen en cuatro grupos: a) cepas silvestres, b) mutantes auxótrofos, c) mutantes reguladores y d) cepas mejoradas por ingeniería genética<sup>37.38.42.161</sup>.

Entre las cepas silvestres que en forma normal excretan aminoácidos están: *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium lactofermentum* y *Brevibacterium flavum*; la primera de ellas puede formar mas de 30 g/l de ácido glutámico y segregarlo al medio<sup>169</sup>. Estas cepas requieren biotina y tienen una actividad muy debilitada del complejo  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa que es el responsable de la transformación del ácido  $\alpha$ -cetoglutarico en ácido succínico. La sobreproducción del ácido glutámico está relacionada entonces. con la ausencia o defecto del complejo  $\alpha$ -cetoglutaratodeshidrogenasa, con una alta

actividad de la enzima glutamatodeshidrogenasa que es dependiente de la nicotinamida dinucleótido fosfato reducida (NADPH), con un cambio en la permeabilidad de la membrana celular que permite su salida y que evita que actúe como un retroinhibidor.

La alteración de la permeabilidad de la membrana está relacionada con la participación de la biotina en la síntesis de ácidos grasos que entran como componentes de los fosfolípidos de la membrana. Si las células son cultivadas bajo concentraciones subóptimas de biotina, se destruye la interrelación de los ácidos grasos saturados e insaturados y se sintetiza una membrana defectuosa que permite la salida de las moléculas de ácido glutámico. El aumento en la permeabilidad de la membrana ocurre solo en una dirección; es decir, hacia el exterior de la célula.

Algunas cepas de *C. glutamicum* forman también L-glutamina, L-prolina, L-alanina y L-valina. En un medio ligeramente ácido y en un exceso de iones de zinc, se forma L-glutamina. Bajo un exceso de biotina y de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , se forman hasta 40 g/l de L-prolina en 100 h. de incubación. Algunas cepas de *Brevibacterium* y *Bacillus*, excretan hasta 8 g/l de L-valina.

La mutación auxótrofa para la producción de aminoácidos, solo puede ser realizada en microorganismos que tengan rutas de biosíntesis ramificadas al menos de dos aminoácidos que se formen de un mismo antecesor. Se obtiene utilizando medios selectivos después de que el cultivo bacteriano ha sido sometido a la acción de factores mutagénicos físicos (radiación ultravioleta o rayos X) o químicos (etileniminas, dietilsulfato, nitrosoetilurea, etc). Como resultado de esta acción, pueden ser dañados algunos sistemas enzimáticos de las vías posteriores a la ramificación por lo que el microorganismo no producirá el metabolito final de esta ruta y se convertirá en auxótrofo a ése metabolito. La consecuencia de ello, es que el flujo de materia prima se canalizará solamente a las ramificaciones libres, sobreproduciendo el producto final de esta ruta. Normalmente, los productos finales de una vía ramificada regulan

su propia síntesis modulando la actividad de la primera enzima de dicha vía. Esto implica que en una cepa auxótrofa en que no se produce uno de los reguladores, esta regulación no se dará o se será en menor grado, aumentando así la síntesis del otro producto final<sup>3</sup>. En los mutantes reguladores, el fenómeno de regulación a nivel de sustrato, esta dado a partir de la interacción física del producto final que se desea modular con la primera enzima de la ruta en el sitio alostérico de esta. En este caso, se ha perdido o está muy debilitado el mecanismo de control de enlace inverso o feed back ya que son resistentes al análogo del aminoácido completo. Estos mutantes llegan a ser casi o totalmente insensibles a la inhibición o represión por el producto final<sup>168</sup>.

Se conocen un gran número de microorganismos productores de aminoácidos; los mas encontrados, son bacterias grampositivas que no forman esporas que pertenecen a los géneros: *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium* y algunos otros. La mayoría de los microorganismos investigados, independientemente de su ubicación sistemática, acumulan principalmente  $\alpha$ -alanina y ácido glutámico. Algunas cepas producen ácido aspártico, leucina, valina, isoleucina y lisina en pequeñas cantidades. No hay una correlación estricta entre la especie a que pertenece el microorganismo y su capacidad de acumulación de aminoácidos. Investigadores japoneses, aislaron 6 cepas de bacterias de los géneros *Vibrio* y *Pseudomonas* que al cultivarlas en medios con tirosina, acumulaban DOPA<sup>171,172</sup>.

Independientemente de la amplia distribución de los microorganismos que acumulan aminoácidos en el proceso de crecimiento, los productores que aseguran ventajas económicas en el rendimiento de estos productos, son muy pocos. El productor debe acumular principalmente un aminoácido, de tal manera que la presencia, al mismo tiempo, de varios aminoácidos particularmente si son parecidos en sus propiedades fisicoquímicas, dificulta su separación y purificación.

Aunque la organización del proceso de biosíntesis de aminoácidos, particularmente utilizando mutantes auxótrofos, en condiciones de producción no se debe de considerar muy simple, toda la producción microbiológica carece de prácticamente todas las desventajas que tiene la síntesis química. Es evidente que su ventaja esencial es la formación de L-aminoácidos, también son posibles los cambios delicados de moléculas complejas, el proceso se realiza en un número menor de etapas, no es necesario equipo muy complejo, ya que los microorganismos funcionan en medios acuosos no agresivos a temperaturas y presiones comunes. Es importante también, considerar la posibilidad de realizar la biosíntesis de diferentes aminoácidos, utilizando el mismo tipo de aparato de fermentación y de crear esquemas simples y universales para la separación de los aminoácidos de la mezcla, producto de la fermentación. El esquema más común de separación y purificación de aminoácidos, comprende las siguientes etapas: a) separación de la biomasa microbiana., b) eliminación de la turbidez de la solución original, mediante sorción de las sustancias responsables de la turbidez, c) sorción de intercambio iónico de aminoácidos, d) elución, e) evaporación, f) cristalización y recristalización y g) secado del producto terminado. Dependiendo de las propiedades concretas de cada aminoácido, de su nivel de acumulación en el medio, de los componentes iniciales del medio de fermentación y de los requerimientos para el producto final, este esquema puede ser mas o menos simplificado<sup>129</sup>.

Sin embargo, el proceso fermentativo de obtención de aminoácidos, tiene también una serie de desventajas: la periodicidad del proceso, bajos rendimientos del producto terminado, el largo tiempo que se lleva el cultivo de la biomasa y el proceso de acumulación de los aminoácidos, la necesidad de observar condiciones de esterilidad, el empleo de materiales caros para la preparación de los medios, la posible contaminación del producto terminado por metabolitos celulares.

Una de las posiciones científicas más importantes de la síntesis microbiológica de aminoácidos, es la pregunta sobre su origen, ¿los aminoácidos que se encuentran en el medio, son producto de la disociación enzimática de las proteínas como resultado del proceso autolítico o resultan de la síntesis de otras sustancias?. Al utilizar medios sintéticos para el cultivo de los productores, se ha demostrado en forma determinante que los aminoácidos encontrados en el medio son producto de la síntesis "*de novo*". Las reacciones enzimáticas de la síntesis de aminoácidos, ocurren en el interior de las células. Inicialmente, los aminoácidos se acumulan en el interior de las células en forma de aminoácidos libres. En etapas tempranas de crecimiento del cultivo, los aminoácidos son incluidos en el metabolismo constructivo del microorganismo. La acumulación activa de los aminoácidos en el medio, en un cultivo periódico, ocurre generalmente a la mitad de la fase exponencial de crecimiento, alcanzando un máximo al final. En algunos casos, se observa una brecha metabólica entre la actividad celular alta y baja, lo que implica que el estado metabólico de la fase de crecimiento celular y la fase de producción del aminoácido, son muy diferentes y la transición del crecimiento a la producción del aminoácido, debe superar este umbral metabólico. Estas transiciones metabólicas son fenómenos típicos en la producción de metabolitos no acoplada al crecimiento celular.

- Ejemplos de producción de aminoácidos por fermentación.

- 1) Formation of DL-alanine por *Corynebacterium sp.*9366-EMS/270<sup>112</sup>
- 2) Producción de L-fenilalanina por fermentación, utilizando un mutante auxótrofo regulador de *Escherichia coli*<sup>72</sup>.
- 3) Sobreproducción de metionina utilizando un mutante de *Candida utilis*<sup>137</sup>.
- 4) Formación de L-isoleucina a partir de  $\alpha$ -cetobutirato por *Corynebacterium glutamicum*<sup>134</sup>.
- 5) Biosíntesis de aspartasa y producción de ácido L-aspartico mediante células de *Escherichia*

*coli*<sup>135</sup>.

6) Producción fermentativa de treonina utilizando una cepa de *Serratia marscesens*<sup>32</sup>.

7) Producción de L-prolina por fermentación con *S. marscesens*<sup>33</sup>.

8) Producción de ácido glutámico por un mutante con genes combinados de *Corynebacterium* y *Brevibacterium*<sup>151</sup>.

El desarrollo de la biología molecular desde la primera mitad de los años 70's del siglo XX, condujo a una nueva técnica experimental que recibió el nombre de ingeniería genética en algunos países y en otros, "trabajo con moléculas recombinantes de DNA". En la actualidad, se han utilizado estas metodologías de ingeniería genética con propósitos muy diversos; desde el mejoramiento de cepas microbianas que exhiben un fenotipo deseado, hasta la terapia génica para el tratamiento de diferentes enfermedades. En los procesos de obtención de aminoácidos, se han utilizado estas técnicas de biología molecular para aumentar, por ejemplo, el número de genes y por consiguiente, la cantidad de enzimas responsables de la biosíntesis de aminoácidos; se ha utilizado también la técnica de clonación en plásmidos, aunque los resultados no son muy alentadores. También se han obtenido algunos resultados al tratar bacterias grampositivas como *Brevibacterium* o *Corynebacterium*, con técnicas de fusión de protoplastos<sup>139</sup>. En este sentido, la selección de cepas para obtención de aminoácidos utilizando la mutagénesis clásica y el mejoramiento de cepas por métodos no recombinantes, puede presentar una ventaja significativa sobre la ingeniería genética sola, ya que se ha demostrado la gran afinidad de las técnicas clásicas y la genética molecular para crear un efecto sinérgico para el mejoramiento de un proceso<sup>38</sup>. Además, se debe señalar que en las células vivas, existen mecanismos de reparación de "daños" en el DNA, que están relacionados con el funcionamiento de determinados sistemas enzimáticos controlados por los genes correspondientes. La mutación en estos genes, los transforma en genes mutados que



esencialmente aumentan la frecuencia de las mutaciones espontáneas, de tal manera que es conveniente considerar que el funcionamiento normal de los sistemas de reparación, puede enormemente disminuir la efectividad de la mutagénesis deseada<sup>37</sup>. Aunque en general puede decirse que no ha habido problemas graves ocasionados por el uso de productos obtenidos por técnicas recombinantes, quizá con excepción de la producción de triptofano para consumo humano en 1989-1990 por una compañía estadounidense. El triptofano obtenido a partir de una cepa modificada genéticamente, causó la aparición de varios casos clínicos del síndrome de eosinofilia-miálgica (EMS). El problema radicaba en que la cepa producía una pequeñísima cantidad de un derivado químico del triptofano que causaba los trastornos; debido a ello, la venta de este aminoácido para consumo humano fue prohibida en Estados Unidos. Independientemente de este hecho particular, es innegable el enorme potencial que tienen las técnicas de ingeniería genética molecular en todas las áreas de la economía de un país, lo que incluye las estrategias de selección de cepas microbianas que posean algunas propiedades de utilidad.

#### **I.1.4 SÍNTESIS ENZIMÁTICA.**

En los últimos tiempos, principalmente en Japón, se ha desarrollado investigación dedicada a la utilización de enzimas estereo- y sustrato específicas, para la obtención de aminoácidos naturales de forma L. Este método tiene perspectivas muy favorables en comparación con la síntesis química o microbiológica<sup>11, 130</sup> y permite unir los adelantos en química y microbiología para establecer procesos altamente efectivos. La síntesis enzimática de aminoácidos, realizada a nivel industrial, disminuye en gran medida los gastos de operación y gracias a ello, puede ampliarse el área de aplicación de los aminoácidos como aditivos alimenticios, en salud, en la industria química, etc<sup>152</sup>.

En este caso, la síntesis de aminoácidos es estereoespecífica, de una sola etapa y se realiza a partir de sustratos antecesores próximos que son elaborados por la industria química o microbiológica. El producto terminado se diferencia en que tiene un alto grado de pureza, una concentración alta, no es necesario el proceso de separación de los isómeros ópticos y la obtención del producto se efectúa en forma continua<sup>79</sup>.

Hasta hace poco tiempo, las enzimas o preparados enzimáticos, se obtenían de los tejidos de diferentes animales, de plantas y microorganismos. Aunque algunos tejidos animales, por ejemplo, el páncreas y la vesícula, son muy ricos en enzimas, la producción industrial a partir de tejidos animales y vegetales se ha detenido debido a las dificultades que surgen por la limitación de la materia prima.

De esta manera, la fuente de enzimas más accesible y prácticamente ilimitada a escala industrial, son los microorganismos; en ellos están contenidos todos los tipos de enzimas conocidos en la actualidad. Así, en calidad de fuente de enzima se pueden utilizar: suspensión

de células en medio de cultivo, células separadas del medio y suspendidas en soluciones buffer o en solución fisiológica; células parcialmente destruidas, extractos celulares, preparados enzimáticos altamente purificados en estado libre o inmovilizado.

Una propiedad muy importante de muchos microorganismos, es la capacidad de crecer utilizando diferentes sustratos, incluyendo algunos que no tienen un valor alimenticio como la celulosa, hidrocarburos del petróleo, metano, metanol, etc. Algunos sustratos que son utilizados por los microorganismos, son tóxicos para el hombre y los animales. La capacidad de los microorganismos de desarrollarse en condiciones extremas; es decir, a temperaturas bajas o altas, en ausencia de oxígeno molecular, en medios ácidos o básicos, bajo concentraciones altas de sales, etc. está determinada generalmente por el carácter de las enzimas que posee<sup>5</sup>.

Hoy en día, además de los procesos de mutación microbiana para la sobresíntesis de una determinada enzima, es posible aislar el gene que codifica para dicha enzima y clonarlo de un microorganismo "no gras" a otro "gras" (gras = generalmente reconocido como seguro), es posible también, amplificar los genes naturales mediante la inserción de un promotor, logrando la sobreproducción de la enzima, se pueden transformar enzimas intracelulares en formas fácilmente excretables al medio y además, producir enzimas que no existían antes en los microorganismos<sup>12,17,50</sup>.

Considerando entonces a los microorganismos como la fuente más importante de enzimas y debido a que éstas son bastante lábiles e inestables para su conservación y para la acción de diferentes factores como el calor<sup>13</sup>, es posible utilizar las células completas de estos como catalizadores de los procesos enzimáticos. En este caso, se excluye el laborioso proceso

de extracción y purificación de la enzima, aumenta en gran medida la estabilidad del biocatalizador ya que la enzima se encuentra en su microambiente natural y puede emplearse en forma múltiple<sup>118,119</sup>. Sin embargo, el trabajo con células de microorganismos como catalizadores, tiene también algunas desventajas como la dificultad de mantener la integridad y viabilidad de las células, los sistemas multienzimáticos, la disminución de la velocidad del proceso debido a problemas de difusión creados por la pared celular y la membrana citoplasmática. Independientemente de lo anterior, las investigaciones sobre las regularidades cinéticas de la catálisis enzimática en células microbianas, son bastante interesantes desde el punto de vista científico, ya que la determinación inmediata de los parámetros cinéticos de las enzimas en las células, se considera un paso muy importante para la comprensión del mecanismo de acción de las enzimas y de sus características reguladoras en el proceso de actividad vital de los microorganismos.

Ya en los años 60's, Ruban et.al demostró que la actividad enzimática de cultivos celulares en reposo especialmente seleccionados, se puede utilizar exitosamente para la síntesis en una sola etapa de ácido L-aspártico a partir de fumarato de amonio y de L-triptofano a partir de ácido antranílico; es decir, de sustancias producidas por la industria química. La continuación de estos trabajos está relacionada con el desarrollo de la ingeniería enzimática y la biotecnología, con incursión también de la ingeniería genética.

En la síntesis enzimática de aminoácidos, la atención de los investigadores se enfocó en primer lugar al grupo de enzimas de las liasas, las cuáles de acuerdo a una opinión generalizada, juegan un papel catabólico en la célula. Estas enzimas transforman el ácido aspártico, fenilalanina, tirosina, dihidroxifenilalanina y el triptofano en amoníaco y ácido

fumárico, ácido transcorísmico, fenol, pirocatecol, ácido pirúvico e indol respectivamente; es decir, en sustancias que son producidas por la industria química.

Por el método de síntesis enzimática, se obtienen a nivel industrial algunos aminoácidos; por ejemplo, en Japón, bajo la dirección del Prof. Chibata, se elaboró un método de obtención de ácido L-aspártico a partir de fumarato de amonio mediante células de *E. coli* ATCC No.11303 inmovilizadas<sup>55</sup>. En el año de 1978, se inició la producción industrial de lisina por método enzimático, utilizando como sustrato  $\alpha$ -aminocaprolactamo, obtenido por síntesis química<sup>76</sup>, el cual como resultado de la acción enzimática, es transformado en casi un 100% en lisina. Otro de los sustratos que se utiliza para la síntesis enzimática de lisina, es el meso isómero del ácido 2,6-diaminopimélico y la enzima diaminopimelatodecarboxilasa. Prácticamente se utiliza una suspensión de células microbianas de *Brevibacterium*, previamente cultivadas en el medio correspondiente. Algunas veces, las células son tratadas previamente con acetona para obtener un polvo cetónico, aunque esto no es posible en los casos en que el ácido 2,6 diaminopimélico no es capaz de penetrar en la célula microbiana, que es donde ocurre su decarboxilación. Antes de esto, el sustrato debe ser transformado a la forma meso a partir del isómero L,L gracias a la actividad de la diaminopimelato epimerasa. Los métodos elaborados para el cultivo de *Brevibacterium sp*, aseguran una alta actividad decarboxilasa. La actividad específica más alta en el medio semisintético se observa después de 18 – 20 h. de cultivo; es decir, al final de la fase exponencial y en melaza, a la mitad de la fase exponencial.

El estudio de la tirosinfenoliasa (C.E. 4.1.992) de origen microbiano, tiene también muy amplias perspectivas<sup>53.64.118.119.167</sup>. Esta enzima tiene una especificidad de sustrato de grupo y

cataliza una serie de reacciones de disociación  $\alpha$  y  $\beta$ ,  $\beta$  - sustitución y de racemización; de esta manera, cataliza la formación de aminoácidos derivados de L-tirosina que son preparados medicinales muy importantes: L-DOPA, L-trioxifenilalanina, metil-cloro-tirosina y ácido 3,4-dihidro-3-amino-7-hidrocumárico. En algunas bacterias como: *E. herbicola*, *E. coli* y *C. freundii*, se ha descubierto una alta actividad tirosinfenoliasa, que fue inducida por la adición de tirosina al medio de cultivo<sup>53,64,118,119</sup>.

Se ha efectuado también, la síntesis de L-triptofano a partir de indol, piruvato y amoníaco bajo una reacción reversible catalizada por triptofanasa exogénica libre e inmovilizada en cefarosa, la cuál fue segregada al medio de cultivo por células de *E. coli* K-12. En el laboratorio del Proff. Yamada en Japón, se descubrió que la triptofanasa endógena está ampliamente distribuída en 40 cepas de la familia Enterobacteriaceae<sup>103</sup>. Resultó que la triptofanasa, a semejanza de la tirosinfenoliasa, tiene una especificidad de grupo y cataliza reacciones reversibles de  $\alpha$  y  $\beta$ -disociación de triptofano, 5-oxitriptofano y 3-metilriptofano. Durante la síntesis de triptofano a partir de indol, además del ácido pirúvico, pueden utilizarse: cisteína, cistina y ácido oxalacético. Todas las reacciones enumeradas de la triptofanasa, las catalizan también células libres de *Proteus rettgeri* AI2770. La producción de fenilalanina utilizando células de microorganismos como catalizadores, es un proceso que se dificulta debido a la reversibilidad de la reacción ocasionada por la inhibición de la fenilalanina amoníacoliase por el ácido transcorísmico y por lo tanto, la degradación de L-fenilalanina en ácido transcorísmico y amoníaco<sup>78</sup>. Esto fue superado agregando amoníaco en concentraciones muy altas; pero aun así, la formación de fenilalanina solo pudo ser registrada por un método altamente sensible<sup>132</sup>. Las células de *Rhodotorula texensis*, productor de

fenilalanina amoniacoliasa, fueron exitosamente utilizadas para separar a la fenilalanina de la mezcla de aminoácidos que se utiliza para el tratamiento de los niños fenilcetonúricos<sup>80</sup>.

Dentro de los métodos enzimáticos de obtención de L-aminoácidos, es necesario mencionar el proceso en el cuál se utiliza un aminoácido para obtener otro. Esto fue realizado por primera vez por Franks<sup>54</sup>; las células de *St. faecalis* inmovilizadas en gel de poliacrilamida, efectuaron la transformación de arginina en ornitina por la ruta de la argininohidrolasa. La ausencia de citrulina en el eluido, la cual es una sustancia intermedia de esta cadena de reacciones, demostró que las células inmovilizadas estaban intactas, ya que solamente las paredes de células dañadas de esta cepa, son permeables para la citrulina, lo que aseguró su transformación rápida en ornitina. La L-citrulina que tiene aplicación en medicina, fue obtenida de L-arginina utilizando células inmovilizadas de *Ps. putida* ATCE4359, productor de L-arginina-desaminasa; esta cepa no tiene ornitina-trans carbamilasa y por eso la ornitina no se transforma posteriormente en ornitina.

La histidinasa formada por algunos microorganismos como *Achromobacter liquidum* IAM 1667, separa el amoniaco de la histidina formando ácido urocánico el cual es un protector solar y se utiliza en cosméticos y en preparados farmacéuticos<sup>164</sup>.

**- Otros ejemplos de síntesis de aminoácidos por método enzimático utilizando células de microorganismos completas como catalizadores.**

1. Ácido L-aspártico a partir de fumarato de amonio utilizando células de *E. coli* ATCC 11303<sup>51,90,144,149,163,173</sup>.
2. Ácido L-aspártico a partir de fumarato de amonio utilizando células de *E. coli* 85<sup>94,165,175,176,177,178</sup>.

3. Obtención de ácido L-aspartico utilizando células de *Alcaligenes metalcaligenes*<sup>159</sup>.
4. Síntesis de L-tirosina y L-3,4 dihidroxifenilalanina utilizando células de *C. freundii* como catalizadores<sup>119,146,147</sup>.
5. Producción de L-lisina, en un cultivo continuo de *C. glutamicum*<sup>91</sup>.

La síntesis enzimática de L-aminoácidos, se ha fortalecido con la inmovilización en soportes de distinta naturaleza, de células de microorganismos que se utilizan como biocatalizadores en los diferentes procesos; ya que esto ha abierto las posibilidades de la catálisis heterógena lo cual repercute en una estabilidad alta, pureza del producto terminado y una separación simple de la mezcla reaccionante<sup>150 166</sup>.

La biotecnología moderna ha introducido un concepto bastante cercano al de “síntesis enzimática” en el que se emplean células de microorganismos como catalizadores, el de biotransformación o transformación microbiana, que comprende las transformaciones de sustancias, realizadas por células de microorganismos, en determinados productos cuya estructura es parecida a la de la sustancia original. No ocurre una degradación completa del sustrato como en un proceso fermentativo y solamente tienen lugar cambios no muy significativos que conducen a la obtención del producto con propiedades prácticas completas. Estas transformaciones están relacionadas con una o con varias reacciones enzimáticas que tienen una serie de ventajas frente a los métodos químicos de modificación en lo que se refiere a la estereoespecificidad, al surgimiento de la reacción en condiciones suaves y a los altos rendimientos del producto. Las biotransformaciones pueden ser efectuadas por células que están creciendo o en reposo, por esporas, por células deshidratadas utilizando acetona o aire, o



por células inmovilizadas<sup>38.66.101.140</sup>. Es muy importante la permeabilidad de la membrana para los sustratos. Muchos de ellos no pasan a través de la membrana y esta tiene que ser modificada para hacerla más permeable<sup>155</sup>. Durante la biotransformación de sustancias orgánicas, un significado muy importante lo tienen los diferentes mecanismos reguladores de la actividad y síntesis enzimática de las células microbianas, incluyendo la inducción y represión. La transformación microbiana es una propiedad natural de los microorganismos, ampliamente distribuida en la naturaleza, la cuál es utilizada por el hombre para la obtención de diferentes productos de valor agregado, entre ellos, diferentes aminoácidos. Se conocen miles de procesos de biotransformación; algunos de ellos son: hidroxilación, hidrólisis, metilación, condensación, descarboxilación, oxidación, esterificación, rompimiento de los enlaces C-C, desmetilación, hidratación, aminación, amidación, racemización, epoxidación, acilación, fosforilación, reducción, desaminación, halogenación, etc<sup>160</sup>.

## CAPÍTULO II

### 2.1 APLICACIONES Y MÉTODOS DE SÍNTESIS DEL AMINOÁCIDO L- ASPÁRTICO

#### 2.1.1. APLICACIONES

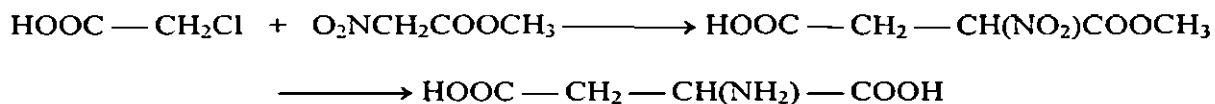
El interés por la producción del aminoácido L-aspartico, desde el punto de vista de su aplicación en farmacología, aumentó significativamente después de los trabajos de Leiboritz y col. en 1958 relacionados con su acción fisiológica y terapéutica. El ácido aspártico participa en reacciones de transaminación que son de vital importancia para la célula, ya que mediante la transaminación con el ácido  $\alpha$ -cetoglutarico, se transforma en ácido oxalacético, un intermediario importante en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, que es una de las etapas finales del catabolismo oxidativo. Además, es un antecesor de los nucleótidos pirimídicos; en el organismo sirve de base para la síntesis del ácido uracilo, un antecesor de la uridina<sup>43,128</sup>. En combinación con la glucosa y con el sorbitol, se utiliza para la curación de enfermedades del hígado<sup>123</sup>. Sus derivados entran en la composición de preparados psicotrópicos, posee una acción antidepresora<sup>8</sup> y se utiliza también en el tratamiento de la intoxicación alcohólica. El aspartato de potasio y magnesio se utilizan para tratar la fatiga e insuficiencia cardíaca y el aspartato de hierro, las anemias.

En la industria alimentaria se utilizan distintos derivados del ácido L-aspartico, por ejemplo, el aspartato de sodio es un componente de las especias para mejorar el sabor de algunos productos alimenticios. El aspartame es un dipéptido formado por el ácido L-aspartico y el metil-éster de la fenilalanina, comercializado como un edulcorante de bajas calorías que tiene gran demanda en la industria alimentaria<sup>44,79,141,142</sup>. En la agricultura, el ácido aspártico en combinación con la lisina, se utiliza como estabilizador de fungicidas<sup>160</sup>.

## 2.1.2 MÉTODOS DE SÍNTESIS

La obtención del aminoácido L-aspártico, ha recorrido todas las rutas posibles para este propósito: por separación de hidrolizados proteicos, por el método químico, microbiológico y actualmente, el que se considera más perspectivo, el método enzimático que en este caso puede considerarse como una biotransformación microbiana.

Inicialmente fue producido por separación de hidrolizados proteicos vegetales y animales; posteriormente por síntesis química, la cuál esta fundamentada en el empleo de éteres metílicos del ácido nitroacético. La base de este método la constituye la excepcional capacidad reaccionante del grupo metilénico del éter nitroacético, condicionada por la cercanía de grupos nitro y éteres complejos. El ácido DL-aspártico, con un rendimiento del 55%, se obtiene por alquilación del éter metílico del ácido nitroacético por el ácido cloroacético en soluciones dipolares no protonadas de acuerdo al siguiente esquema:



En la primera fase participa  $\text{CH}_3\text{ONa}$  y en la segunda:  $\text{H}_2$ , Ni,  $2\text{H}_2\text{O}(\text{H}^+)$

La obtención del ácido L-aspártico en forma de racemato, se realiza también por síntesis química a partir de maleato (o fumarato) de amonio, este último es obtenido del anhídrido maléico. La solución de maleato (o fumarato) de amonio, junto con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y amoníaco (pH 7.5), se calienta durante 75 min a  $180^\circ\text{C}$ . El ácido DL-aspártico se separa en su punto isoeléctrico con un rendimiento del 79%. Como derivado se forma el ácido  $\alpha$ -imino,  $\alpha'$ -disuccínico que revierte el proceso.

Las características de la síntesis química del ácido aspártico se pueden resumir en que no es necesaria la utilización de materia prima alimenticia, en la variedad de sustancias

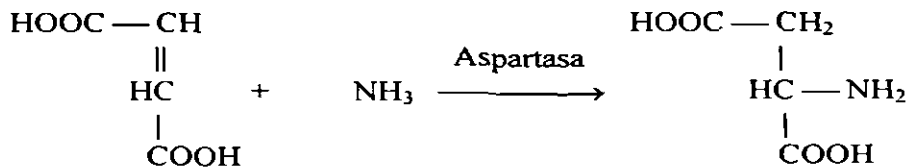
iniciales, pero tiene desventajas, que es un proceso de etapas múltiples, que el aspártico se obtiene como mezcla racémica cuya separación en los isómeros D y L aumenta el costo del proceso<sup>9,124</sup>.

Para la obtención del ácido aspártico por fermentación por distintos microorganismos, se pueden utilizar residuos de la industria alimentaria y obtener el isómero L<sup>121</sup>; sin embargo, el rendimiento es de algunos gramos por litro de medio de cultivo y otra de las desventajas es la separación del producto terminado. En el año de 1960, se efectuaron estudios sobre la fermentación del ácido aspártico utilizando fumarato como única fuente de carbono en el medio de cultivo<sup>97</sup>. Después de un screening, se seleccionaron dos microorganismos: *Ps. fluorescens* 6009-2 y una mutante ki-1023 derivada de *E. coli* k-12. Se estudió el efecto de la adición de diferentes sales de amonio y se obtuvieron mejores resultados con las sales de fumarato de amonio; se estableció también que al añadir glucosa al medio de cultivo, se formaban otros aminoácidos y disminuía la cantidad del ácido aspártico formado. Este trabajo es uno de los primeros reportes que se tienen sobre la síntesis fermentativa del ácido aspártico y se consideraba, en ese tiempo, un procedimiento con ciertas ventajas para la obtención de este aminoácido<sup>94</sup>.

Los requerimientos, cada vez mayores, del ácido L-aspártico, obligaron no solamente a perfeccionar los métodos ya existentes para su obtención; sino también, a buscar nuevos caminos para su síntesis<sup>34</sup>. Así, el desarrollo de la ingeniería enzimática y la obtención de preparados estables, tanto de enzimas como de células de microorganismos con actividad aspartasa, permitieron considerar el método de síntesis enzimática como una alternativa con perspectivas más amplias para la obtención del ácido L-aspártico<sup>11,139</sup>.

## 2.2 CARACTERÍSTICAS DE LA ASPARTATOAMONÍACOLIASA.

Una de las enzimas más estudiadas, tanto desde el punto de vista teórico como práctico, es la aspartatoamoníacoliase o aspartasa o fumaratoaminasa (C.E. 4.3.1.1). De acuerdo a la clasificación internacional de enzimas, pertenece a la clase de las liasas, las cuáles catalizan la unión de diferentes grupos funcionales a dobles enlaces y al contrario, la disociación de grupos con formación de dobles enlaces. A excepción de iones metálicos ( $Mg_2^+$ ,  $Mn_2^+$ ) no requiere la presencia de cofactores para la expresión de su actividad catalítica<sup>51</sup>. La reacción catalizada por la aspartasa posee interés no sólo desde el punto de vista teórico, sino también práctico<sup>11,154,178</sup>. Consiste en la aminación reversible del ácido fumárico por amoníaco, con formación de ácido aspártico:



La historia del descubrimiento de la aspartasa, se analiza ampliamente en el trabajo de Ruban y col. dónde se señalan las tres etapas de estudio de esta enzima<sup>121</sup>. Después del descubrimiento por Gardner en 1901 en la bacteria *E. coli*, dejó de estudiarse durante mucho tiempo. Posteriormente Quastel y Woolf en el año de 1926, establecieron la estequiometría de la reacción aspartasa y definieron a la enzima como una desaminasa. Woolf la llamó aspartasa y de esta manera se le conoce en forma trivial. La enzima comenzó a estudiarse activamente a principios de los años 50's; principalmente Elfolk en Finlandia<sup>44-47</sup> y Kretovich en la antigua URSS<sup>85-87</sup>.

Umberger y Elfolk<sup>47,154</sup>, suponen que la aspartasa cumple una función catabólica en la célula y que la síntesis del ácido aspártico ocurre mediante la transaminación del ácido oxalacético con el glutámico. El producto de la reacción aspartasa se considera un iniciador para la biosíntesis de una serie de aminoácidos: asparagina, lisina, metionina, treonina, isoleucina, que son conocidos como la “familia del ácido aspártico”<sup>136</sup>.

Inicialmente se consideró que la aspartasa era una enzima bacteriana<sup>44-47,87</sup>, ampliamente distribuida entre los grupos taxonómicos de los procariotas<sup>41,47,86,121</sup>. Elfolk enumeró una larga lista de microorganismos con actividad aspartasa: *E.coli*, *Ps.fluorescens*, *P. vulgaris*, *S. marscecens*, *Salmonella sp*, *Vibrio sp*, *Staphylococcus sp*, *Aerobacter sp*, *Bacterium cadaveris*, *Lactobacillus helveticus*. Investigaciones posteriores demostraron la presencia de la aspartasa en plantas superiores<sup>85,86,121</sup>. Esta enzima se ha descubierto también en animales, durante el período de ontogénesis de una especie de rana<sup>88</sup>, en las mitocondrias del hígado de ranas<sup>25</sup>. Se han obtenido preparados parcialmente purificados de aspartasa de algunas especies procariotas<sup>44,46,162,170</sup>, aunque se ha demostrado que durante las etapas de purificación se pierde significativamente su actividad catalítica por lo que se considera una enzima bastante inestable en forma purificada<sup>121,162,170</sup>.

## 2.3 PRODUCCIÓN INDUSTRIAL DE ÁCIDO L-ASPÁRTICO POR MÉTODO ENZIMÁTICO.

A mediados de los años 70's, en Japón se comenzaron a obtener preparados de ácido L-aspártico utilizando aspartasa de origen microbiano<sup>27,29</sup>; posteriormente se hicieron diversos intentos para inmovilizar la enzima y el extracto celular liofilizado y no se obtuvieron buenos resultados<sup>29</sup>. Debido a esto, en 1973, un grupo de investigadores japoneses bajo la dirección del Proff. Chibata, propusieron un método de obtención de ácido L-aspártico a partir de fumarato de amonio mediante células de bacterias inmovilizadas<sup>101,144</sup>. Seleccionaron seis especies de bacterias, que al ser inmovilizadas en gel de poliacrilamida efectuaban la síntesis del ácido L-aspártico. Los mejores resultados fueron obtenidos con *E.coli* ATCC No.11303<sup>27,28,29,30,31,125,126,127</sup>. La inmovilización de las células al ser tratadas con reactivos bifuncionales y ser encapsuladas en poliurea, ocasionó la pérdida de la actividad aspartasa. La efectividad de la inmovilización en gel de poliacrilamida, no fue superior al 73%.

Las células de *E.coli* fueron inmovilizadas después de mantenerlas en una solución de fumarato de amonio 1.0 M a 37°C durante 24 – 48 h. Como resultado de este tratamiento, hubo una autólisis parcial, aumentó la permeabilidad de la pared celular y de la membrana citoplasmática y la actividad aspartasa de las células, creció de 8 a 9 veces<sup>144</sup>. Posteriormente, se utilizaron las células de *E.coli* inmovilizadas en gel de poliacrilamida para obtener en forma continua el aminoácido L-aspártico utilizando un reactor en columna, en el cuál, el volúmen inicial era aproximadamente de 50 ml y después, en una columna seccionada con un volúmen de 1 L. Así, en el otoño de 1973, investigadores japoneses establecieron un reactor industrial con células de microorganismos inmovilizadas

en calidad de catalizadores. Las investigaciones demostraron, que la formación de ácido L-aspartico en el reactor, surgió de acuerdo a una reacción de orden cero, lo que indica ausencia de activación o inhibición por sustrato o producto de la reacción y la ausencia de problemas de difusión. En 120 días de trabajo de la columna, a una temperatura de 37°C, la actividad aspartasa disminuyó sólo un 50%<sup>27,167</sup>. A una temperatura más baja, la estabilidad de las células de *E.coli* inmovilizadas, fue aún más alta. De esta manera, se disminuyó hasta un 60% el costo del ácido L-aspartico en comparación con el preparado obtenido en reactores periódicos utilizando células libres.

A finales de los años 70's, este grupo de investigadores<sup>106,125,126</sup>, comparó la eficiencia de las células de *E.coli* inmovilizadas en gel de poliacrilamida con las mismas células de *E.coli*, pero inmovilizadas en gel de k-carragenina y encontraron que al utilizar este último soporte para la inmovilización, las células de *E.coli* exhibían una actividad superior. Así, en 1978 se cambió el soporte que se había utilizado inicialmente por la k-carragenina para la inmovilización del microorganismo utilizado en la producción industrial del ácido L-aspartico.

En 1984 se publicaron trabajos<sup>73</sup> sobre el desarrollo de una nueva cepa: EAPc-7 derivada de la *E.coli* 11303 con una actividad aspartasa superior; sin embargo, esta cepa tenía una desventaja, poseía más actividad fumarasa; es decir, que transformaba el ácido fumárico en málico y esto constituyó un problema para la producción industrial del ácido L-aspartico. De acuerdo a este trabajo, se realizaron tratamientos para eliminar la actividad fumarasa y así, utilizar esta cepa para la producción industrial del aminoácido mencionado.



En el año de 1974, en otra parte del mundo, en Rusia, en la Universidad Estatal de Moscú, M.V. Lomonosov, se iniciaron las investigaciones bajo la dirección de los académicos: I.V. Berezin, E.N. Kondriateva y N.S. Egorov, sobre el empleo de células de microorganismos inmovilizadas para la obtención de aminoácidos naturales<sup>95,166</sup>. Fueron seleccionadas varias cepas bacterianas con actividad aspartasa; posteriormente se eligieron las condiciones de activación e inmovilización de células de *E.coli* 85 que fue el microorganismo seleccionado para esta síntesis. Sin embargo, a pesar de los buenos resultados obtenidos con este biocatalizador<sup>11.83.165.175.176.177.179</sup>, el mercado del aminoácido L-aspartico continúa en manos de industrias japonesas principalmente.

En el año de 1998, apareció publicada en una página de internet, información sobre una compañía japonesa “Nippon Shokubai Co.” que ha desarrollado un nuevo proceso de producción de ácido L-aspartico, mediante síntesis enzimática. Lo novedoso de este proceso, al parecer, es una nueva enzima que describen como original y con una actividad y un tiempo de vida media más altos. La compañía tiene entre sus planes, construir esta planta en otra factoría llamada Himeji.que produce la materia prima que se utilizará, el ácido fumárico.

## CAPITULO III

### LOS MICROORGANISMOS COMO CATALIZADORES

La vida del hombre está íntimamente relacionada con los seres vivos del micromundo; a nivel de la biosfera en general, incluyendo todas las regiones del planeta, los microorganismos juegan un papel muy importante en la asimilación de la energía solar. La actividad biológica de los microorganismos es considerada una de las etapas fundamentales en el ciclo del carbono, oxígeno, nitrógeno y de otros elementos necesarios para la vida<sup>5.15</sup>.

Los microorganismos han servido a la humanidad desde sus inicios; los antiguos griegos, atribuían a su dios Dionisio el descubrimiento del proceso de fermentación y vinatería, y en el "Monumento azul" que data del año 7,000 a.C., está escrito el proceso de fabricación de cerveza en Babilonia. De igual manera, en la alimentación del hombre, los procesos de fermentación han jugado un papel muy importante; con ayuda de ellos se obtiene por ejemplo: queso, pan, yoghurt, salsa de soya, etc. Fue hasta mediados del siglo antepasado, cuando Pasteur estableció la enorme importancia de los microorganismos en todas las actividades relacionadas con el hombre. A principios del siglo XX, Buchner, Neiberg y Weitsman elaboraron los esquemas técnicos de producción de etanol, glicerina y otros quimicatos con la participación de los microorganismos. En los años 40's de nuestro siglo, los adelantos en biología, genética microbiana y tecnología, originaron la era de los antibióticos; en este período nació la tecnología bioquímica; se inició así, la transformación de lo que hoy se conoce como Biotecnología, de un arte empírico a una ciencia planificada con optimización

de tecnología<sup>43.59</sup>.

Como resultado de trabajos complejos en el área de biología molecular y de genética microbiana, se llegó a comprender que los microorganismos pueden participar en toda esa diversidad de procesos mencionados, gracias a sus sistemas enzimáticos, ya que en ellos está fundamentada la actividad vital total de las células. Estos trabajos teóricos fueron la base para la elaboración de la tecnología del DNA recombinante cuyas posibilidades de aplicación son enormes<sup>22.38.128.136.138</sup>.

En los tiempos actuales, los procesos de producción basados en la actividad catalítica de los organismos vivos han adquirido un significado muy importante. La Biotecnología moderna, directa o indirectamente está relacionada con la genética de los microorganismos.

En primer lugar, los microorganismos constituyen una parte esencial de los procesos biotecnológicos tales como la biosíntesis de antibióticos, enzimas, aminoácidos, en la producción de proteínas humanas (interferón, hormonas), etc. En segundo lugar, hasta la transferencia de genes en las células vegetales y animales se realiza con ayuda de una clonación primaria que se efectúa en los microorganismos. El problema principal en éste caso, es una reorganización del genoma de la célula microbiana con el objeto de una reorientación de la ruta de biosíntesis en la dirección necesaria<sup>22.38.43.65.96.120</sup>.

En la actualidad, en el área de producción de enzimas, prácticamente la mitad de su producción y las perspectivas para su obtención, están fundamentadas en la actividad vital de los microorganismos. La causa principal del interés que ha despertado la utilización de los microorganismos como fuentes principales de enzimas, se explica por la facilidad con que se logra aumentar la cantidad de enzima sintetizada mediante cambios realizados en el medio

ambiente del microorganismo y con ayuda de manipulaciones genéticas. Existen otras razones que explican la utilización de células de microorganismos como catalizadores:

1. La economía relativa del cultivo de microorganismos a nivel industrial utilizando medios con un costo no muy elevado y el rápido crecimiento de las células microbianas.
2. La enorme variedad de reacciones que los microorganismos son capaces de efectuar.
3. Los microorganismos sirven como fuente, no solo de enzimas que se encuentran en plantas y animales sino también, de una serie de enzimas que no han sido descubiertas en la naturaleza en otras fuentes; por ejemplo: tansasas, celulasas, queratinasas, hidrogenasas, etc. Solo en algunos microorganismos se han encontrado enzimas que catalizan la oxidación del metano, metanol, CO, cianuro. Entre los microorganismos se encuentran especies que crecen a 87°C y a mas de 100°C que constituyen una fuente invaluable de enzimas termoestables para objetivos biotecnológicos principalmente.
4. La capacidad de los microorganismos de adaptarse a diferentes condiciones, lo que permite trasladar microorganismos de la naturaleza a la producción donde estos pueden crecer utilizando fuentes baratas de carbono y de nitrógeno<sup>160.161</sup>.

Los microorganismos: bacterias, levaduras y hongos miceliales, son productos sorprendentemente perfectos de la naturaleza que pueden utilizar, para vivir y multiplicarse, un solo sustrato orgánico y sales minerales, capaces de vivir en condiciones aerobias y anaerobias, a temperaturas cercanas a 0 y 100°C. Toda la actividad vital y todos los mecanismos de la célula microbiana, están programados para que ocurra un crecimiento y una división sin escalas, mientras existan en el medio condiciones mínimas para ello. Estas

propiedades únicas de las células microbianas, hacen posible una aplicación efectiva de los microorganismos en la actividad humana ya que en ellos están contenidas prácticamente todas las enzimas que se conocen en la actualidad<sup>37</sup>. Muchas reacciones hidrolíticas y de oxidoreducción, pueden ser realizadas con ayuda de preparados enzimáticos; pero existen reacciones enzimáticas complejas que requieren energía y que son catalizadas por organismos vivos, productores de las enzimas correspondientes<sup>21</sup>.

Las sustancias que son producto de la actividad vital de los microorganismos y que tienen importancia industrial, por su naturaleza y significado para la misma célula microbiana, se dividen en tres grupos principales:

- a) Macromoléculas (enzimas, polisacáridos, etc. con masas moleculares desde 10 mil hasta varios millones de daltons),
- b) Metabolitos primarios (sustancias necesarias por los microorganismos para el crecimiento: aminoácidos, nucleótidos púricos y pirimídicos, vitaminas y otros),
- c) Metabolitos secundarios (que no necesitan los microorganismos para crecer: (antibióticos, toxinas, alcaloides, factores de crecimiento y de defensa para las plantas, etc.)<sup>5</sup>).

Los metabolitos primarios y secundarios generalmente tienen una masa molecular baja en comparación con las enzimas, menor de 1,500 Da. Es importante señalar que todos los procesos en la célula microbiana, están sometidos a reglas estrictas de economía y que los metabolitos primarios, por ejemplo, son producidos en la cantidad estrictamente necesaria para el crecimiento celular. De tal manera que la rentabilidad de los productos originados por síntesis microbiana, está basada en que se acumulen en cantidades tales que justifiquen los gastos tanto energéticos como de utilización de sustancias para los medios de cultivo y

también para la separación del producto en la forma en que se utilizará posteriormente<sup>60</sup>. En la actualidad, en muchos países del mundo, el fuerte desarrollo que han tenido los procesos biotecnológicos, ha permitido producir antibióticos, enzimas, isómeros biológicamente activos de una serie de aminoácidos, factores de crecimiento y defensa de las plantas, proteína unicelular, vitaminas etc., en una forma mas o menos simple con ayuda de microorganismos a partir de materia prima accesible y barata. En los últimos años también, estos procesos han encontrado aplicación en la minería, en la lixiviación de metales, para aumentar el rendimiento del petróleo, etc.<sup>5,37,43</sup>. La síntesis de metabolitos primarios y secundarios por microorganismos, puede ser representada como un proceso que se inicia con la absorción del sustrato por la célula (fuente de carbono y nitrógeno, microelementos, etc.) y que pasa después por una serie de etapas catalizadas por diferentes enzimas, una parte de las cuáles, participa en la regulación de la síntesis de la sustancia necesaria o de sus antecesores. Las sustancias intermediarias pueden servir como antecesores de otros metabolitos y consumirse en su síntesis o ser productos finales de otras rutas metabólicas, tener su regulación propia y consumirse en otros requerimientos celulares<sup>42</sup>. Sin embargo, las cepas naturales de los microorganismos, generalmente no poseen la capacidad de producir en grandes cantidades los productos mencionados con anterioridad; así que para la mayoría de los problemas industriales, el programa genético de la célula debe ser reestructurado de tal manera que se dirija el potencial biosintético de la célula a la producción de un producto necesario y no a una producción para si misma. Aún en los casos en los que el objetivo sea la simple obtención de biomasa (proteína unicelular), pueden ser requeridos algunos cambios en las propiedades, que mejoren los parámetros tecnológicos del proceso; es decir, que aumenten la conversión del

sustrato en producto<sup>22,102,138</sup>. En relación con esto, se debe no solo reforzar la capacidad natural del microorganismo de producir una determinada sustancia (antibiótico, enzima, toxina, etc.), sino en muchos casos, de crear un productor a partir de una cepa silvestre capaz de sintetizar sustancias que no era capaz de producir. En realidad, durante mucho tiempo y aún en nuestros días, el único método para el mejoramiento de los microorganismos, que desde el punto de vista de la genética no ha sido suficientemente estudiadas, es la mutagénesis inducida y la selección gradual de las mejores variantes<sup>37,50,133</sup>. El método es bastante laborioso, ya que generalmente se realiza sin un conocimiento detallado de las rutas biosintéticas, que en caso contrario, disminuiría significativamente el problema de la creación de cepas altamente productoras. El desarrollo de la metodología de ingeniería genética, que hizo posible aislar y cambiar genes, amplió en gran medida las posibilidades de reorganización del genoma microbiano; la tendencia actual es la construcción de cepas microbianas con propiedades determinadas, utilizando datos fundamentales de biología molecular, genética e ingeniería genética<sup>37,38,67</sup>. En la actualidad, se han dado pasos importantes en el desarrollo de una nueva área que ha renovado el interés, tanto de científicos bioquímicos como microbiólogos que tratan de manipular el metabolismo celular utilizando las herramientas que proveen la biología molecular moderna; el desarrollo de estas investigaciones esta basado en el concepto de “redes” en el sentido de que el entendimiento del metabolismo y funcionamiento celular puede ser obtenido considerando en conjunto a los componentes de las reacciones bioquímicas más que en forma individual. La modificación de las redes metabólicas de las reacciones bioquímicas con un objetivo específico, ha sido definida como “ingeniería metabólica”. La ingeniería metabólica va más allá de la simple

manipulación de la velocidad de las reacciones bioquímicas. La modificación de las redes metabólicas tiene como objetivo, redirigir los flujos de carbono y energía para lograr un objetivo particular; típicamente, para incrementar la velocidad de formación de un producto deseado o para reducir la formación de un producto secundario no deseado. Estos conceptos fueron aplicados a la red de bioreacciones de la familia de aminoácidos del ácido aspártico y se definieron los puntos críticos de ramificación y su flexibilidad<sup>136</sup>.

### **3.1 REGULACIÓN DEL METABOLISMO EN LA CÉLULA MICROBIANA.**

En el proceso de crecimiento y actividad vital de la célula microbiana, se realiza un enorme número de reacciones catalizadas por enzimas; muchas de estas enzimas que pertenecen a rutas catabólicas o anapleróticas, son necesarias a los microorganismos solamente bajo determinadas condiciones de crecimiento<sup>63</sup>. Uno de los problemas importantes de la microbiología, es el estudio del mecanismo de regulación del metabolismo en los microorganismos. Estos mecanismos aseguran la coordinación de la actividad metabólica de sistemas enzimáticos definidos y permiten a la célula, en forma económica y racional, la utilización de sustancias nutritivas<sup>107</sup>. Si la célula se ubica en un medio que contiene una sustancia de alto peso molecular, por ejemplo, almidón, también amonio y sales minerales, esta debe al principio hidrolizar el almidón hasta glucosa, asegurar la entrada de la glucosa a la célula, disociarla en sustancias con dos y tres átomos de carbono, introducir estas moléculas pequeñas en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos con el objeto de proporcionar energía a la célula y sustancias intermedias. Las sustancias intermedias formadas en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos y en otras reacciones, deben transformarse en bloques estructurales tales como:



20 aminoácidos, 4 ribonucleótidos, 4 desoxirribonucleótidos, cerca de 10 vitaminas, ácidos grasos, azúcares, hexosaminas. Los bloques estructurales, a su vez, deben transformarse en aproximadamente 2,000 proteínas, ácido desoxirribonucleico (DNA), tres tipos de ácido ribonucleico (ácido ribonucleico mensajero, mRNA; ribosomal, rRNA y de transferencia tRNA), polisacáridos, mucopéptidos, coenzimas y lípidos. Estas moléculas se utilizarán posteriormente para la formación de estructuras celulares tales como: núcleo, ribosomas, membrana celular, pared, mitocondrias, flagelos, etc; el producto de estas múltiples reacciones, es una nueva célula<sup>37</sup>.

En la naturaleza, todas las especies orientan su objetivo principal a la sobrevivencia; así que en las especies microbianas, esto se relaciona principalmente con un crecimiento rápido y efectivo. Indudablemente que si se detiene, temporal o definitivamente, la formación de algunos productos finales del metabolismo cuando su requerimiento cae temporalmente o cuándo se han acumulado en cantidades suficientes, es un hecho bastante favorable para el organismo en cuestión. Experimentalmente se ha establecido que si una enzima es sintetizada a una velocidad máxima, una parte de esta puede constituir desde un 5 a 8% de la cantidad de proteína total<sup>18</sup>. Evidentemente que si de las miles de enzimas que la célula es potencialmente capaz de sintetizar, aunque solo algunas se formaran a una velocidad máxima, el crecimiento de la célula sería mas lento, y el funcionamiento normal y aún su sobrevivencia, sería imposible. Por eso, los microorganismos deben poseer la capacidad de dirigir los procesos de biosíntesis y también de introducir reformas cualitativas en el trabajo del aparato metabólico como respuesta a las condiciones del medio. Para realizar estas funciones, las células microbianas desarrollaron y hereditariamente reforzaron mecanismos reguladores complejos y

delicados que aseguran la economía de los procesos metabólicos y un alto nivel de coordinación. La selección de los microorganismos y la creación de nuevas cepas para la industria microbiológica, está dirigida, con frecuencia, a reforzar la formación de algún producto o hasta la síntesis de uno nuevo que no es propio de dicho organismo; a enriquecer la población con células productivas a cuenta de la disminución de su actividad vital o del número de células improductivas. La solución de estos problemas, esta relacionada con cambios en los mecanismos reguladores de la célula<sup>37,161</sup>.

Uno de los problemas más importantes en los procesos biotecnológicos, es el aumento del rendimiento del producto terminado (biomasa, productos intra o extracelulares), exactamente, el aumento del rendimiento del producto en relación con el sustrato o sustratos utilizados<sup>161</sup>. Los genes bacterianos están reprimidos en un 90-95%, lo que significa que solo mediante la eliminación de la represión natural se puede establecer un cultivo microbiano completo, por ejemplo, para sintetizar nuevas sustancias, para asimilar nuevos sustratos que anteriormente no eran utilizados o aumentar significativamente el rendimiento del producto prácticamente terminado; es decir, importante para la sobresíntesis.

La alteración completa de la regulación de síntesis o degradación de un determinado producto en cepas microbianas, se puede provocar en forma artificial cambiando o afectando el sistema de regulación, lo cuál puede hacerse por dos caminos principales: genético y fisiológico. El cambio genético de la cepa se realiza mediante mutagénesis con la subsiguiente selección del mutante y la utilización de métodos modernos de recombinación por ingeniería genética y celular. Los métodos mutacionales se diferencian de estos por que son muy laboriosos y además, los mutantes obtenidos pueden sufrir reversión. Las cepas obtenidas por

métodos de genética e ingeniería, son aún menos estables debido a que la célula trata de liberarse del material genético introducido en ella si no existen ventajas selectivas. Lo anterior está relacionado con que en la síntesis de proteína, existe un gran gasto de energía (mas que para la síntesis de otros polímeros); si las proteínas "ajenas" constituyen, por ejemplo, el 10% de las proteínas totales de la célula, entonces su velocidad de crecimiento disminuirá en un 10% también en comparación con la cepa original. Por ejemplo, en el bacilo entérico se introdujeron los genes de la somatostatina uniéndolos con los genes de la  $\beta$ -galactosidasa (para que los genes de los eucariotas superiores pudieran transcribirse y trasladarse en las bacterias); pero debido a que la formación de la proteína compleja  $\beta$ -galactósido-somatostatina por la bacteria, no tenía para ella ningún significado fisiológico, cesó de sintetizar la molécula de  $\beta$ -galactosidasa completa. Lo cierto es que existen problemas biotecnológicos que pueden resolverse solamente con ayuda de cepas creadas por métodos de ingeniería genética; en este caso, se tienen que superar estas dificultades. Por ejemplo, algunas proteínas humanas se obtienen con ayuda de cepas recombinantes de bacterias y levaduras ya que la fuente de estas proteínas es cara y poco accesible; además, su obtención en cultivos de tejidos celulares de mamíferos no está, por ahora, bastante desarrollada<sup>26</sup>.

Para aumentar el rendimiento de productos de origen microbiano, conservando la estabilidad de la cepa utilizada, se emplean métodos fisiológicos. Para ello, es necesario conocer el significado fisiológico del proceso correspondiente para el microorganismo productor, la ruta de síntesis del metabolito y las condiciones óptimas de su síntesis. Además de la gran variedad de reacciones de respuesta de los microorganismos a cambios en el medio ambiente, se han establecido algunas regularidades generales basadas en la observación de la

conducta de los microorganismos en la naturaleza confirmándose posteriormente en el laboratorio<sup>38,39,160</sup>. Debido a que prácticamente todas las reacciones en la célula son catalizadas por enzimas, la regulación del metabolismo está orientada a la regulación de la intensidad de las reacciones enzimáticas. La velocidad de estas últimas, puede ser regulada de dos maneras básicamente: mediante un cambio en la cantidad de las enzimas y/o en el cambio de su actividad; es decir, del grado de utilización de su potencial catalítico<sup>3,24</sup>.

### **3.1.1 REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS**

Los factores que regulan la actividad de las enzimas son de naturaleza muy variada. Los factores físicos (temperatura, presión, luz, campo magnético, impulsos eléctricos) tienen una acción menos específica que los químicos y la acción de estos, a su vez, puede ser de varios tipos. Algunas sustancias químicas se unen con el sitio activo de la enzima; por ejemplo, sustratos, cofactores, inhibidores concurrentes o competitivos, lo que ocasiona un cambio de la actividad enzimática<sup>67</sup>. El método más simple de regulación de cualquier ruta metabólica, puede estar basado en la accesibilidad del sustrato y también del cofactor. La disminución de la concentración del sustrato, da lugar a una disminución de la velocidad de flujo de las sustancias a través de dicha ruta metabólica. Por otro lado, el aumento en la concentración del sustrato, estimulará la ruta metabólica. Un papel análogo puede jugar el aumento de la concentración del cofactor<sup>21,60</sup>.

### **3.1.1.1 REGULACIÓN DE ENZIMAS ALOSTÉRICAS.**

El mecanismo más rápido, exacto y sutil de regulación de la actividad de las enzimas, es la regulación a la que se somete un determinado tipo de enzimas que reciben el nombre de alostéricas, las cuales generalmente ocupan posiciones claves en el metabolismo, ubicándose en puntos estratégicos: al principio de las rutas metabólicas o en los sitios de bifurcación (nodos), donde se separan o se juntan algunas rutas<sup>92</sup>. Las enzimas alostéricas tienen un centro catalítico y otro regulador; esta región fue llamada por J.Monod, J.Shanjo y F.Jacob, región alostérica o centro alostérico (del griego <<alos>> - otro y <<stereos>> - superficial), el cuál está espacialmente aislado del sitio catalítico, pero funcionalmente en íntima interacción. La actividad catalítica de la enzima cambia como resultado de la unión de determinados metabolitos con su centro regulador debido a que se altera la estructura terciaria de la enzima; a estos metabolitos se les conoce como efectores.

Cuando ocurre un daño mutacional del centro alostérico, el proceso de biosíntesis no será disminuido por el producto final y este último empieza a segregarse al medio. Para la elección de mutantes de este tipo, se utilizan análogos estructurales de metabolitos; por ejemplo, el 5-metilriptofano, análogo al triptofano, al igual que este reprime la síntesis de la antranilatosintetasa pero no sustituye al triptofano en la proteína y por ello mantiene el crecimiento de la célula microbiana.<sup>37,67</sup>.

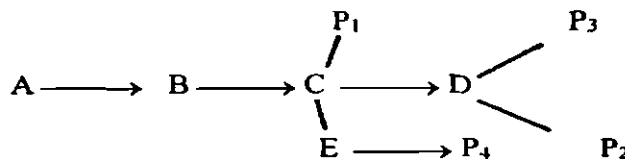
Además de los productos finales de una ruta metabólica dada, los efectores pueden ser sustratos de enzimas y también, algunos productos finales de rutas metabólicas afines. En los últimos años se ha llegado a reconocer la importancia de otro método de regulación del metabolismo, el cambio de la actividad enzimática como resultado de la modificación

covalente de su estructura. En algunos casos, las formas activa e inactiva de la enzima resultado de una proteólisis limitada puede servir de mecanismo que asegure la represión o cese de alguna actividad biológica. Algunas isoenzimas poseen diferentes propiedades reguladoras y cada una de ellas es controlada individualmente por "su" producto final<sup>37,43,63,67,174</sup>.

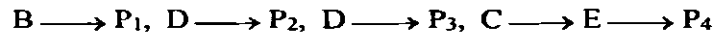
### 3.1.1.1.1 REGULACIÓN DEL TIPO FEED BACK O RETROINHIBICIÓN.

Los procesos de biosíntesis de muchos de los llamados metabolitos primarios o esenciales, se caracterizan porque el producto final de dicha ruta biosintética, al aumentar su concentración, baja la actividad de la primera enzima de esta ruta. Como resultado de esta disminución, el proceso correspondiente de biosíntesis se detiene; esto es, el producto final y también los productos intermedios que participan en su formación, no se acumulan en la célula. Este mecanismo de regulación automática conocido como retroinhibición o feedback, fue inicialmente estudiado en 1953 por A. Novik y L. Silard al estudiar el metabolismo del triptofano en *E. coli* en el que, un producto intermediario, el indolglicerofosfato (IGP) detiene bruscamente si el triptofano se añade al medio<sup>37</sup>.

La inhibición del tipo feedback, se observa también en aquéllos casos en que las rutas metabólicas resultan ramificadas<sup>43</sup>.



donde A, B y C son antecesoros de cuatro productos finales  $P_1$  ----  $P_4$ ; D es antecesor de  $P_2$  y  $P_3$ ; E es antecesor de  $P_4$ . Esencialmente, la secuencia de las reacciones en las rutas metabólicas ramificadas, tienen carácter lineal y son inhibidas por el producto final por el tipo de feedback:



En este caso es evidente lo siguiente: el mecanismo de regulación debe ser de tal manera que la sobreproducción de uno de los productos finales no ocasione que se detenga la síntesis de otros productos finales relacionados con él. Si la primera etapa de la ruta biosintética es catalizada por una enzima, sobre la superficie de la molécula de esta enzima, se tienen diferentes centros reguladores y a cada uno de ellos se une uno de los productos finales que realizan la función de efector<sup>67</sup>.

### 3.1.2 REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE ENZIMAS

La base de la regulación del metabolismo celular, la constituyen dos procesos: inducción y represión. Desde hace mucho tiempo se conoce que las posibilidades potenciales de las células microbianas con relación a la síntesis de diferentes proteínas con actividad catalítica, son mayores que la realización de dichas posibilidades. Para los organismos, es muy favorable que las enzimas que participan en la formación y disociación de una sustancia dada, se sinteticen solamente cuándo la célula las requiera. Un enfoque fundamental para comprender la naturaleza de los conceptos de inducción y represión de la síntesis de enzimas a nivel molecular, fue introducido por los trabajos de Jacob y Monod realizados en 1961<sup>107</sup>. La

expresión de la máxima economía del metabolismo celular, la constituyen los mecanismos elaborados por la célula que regulan su composición enzimática. Se ha demostrado que en los organismos procariotas, bajo ciertas condiciones, el contenido de alguna enzima es de 1 a 2 moléculas; y en otras, constituye un cierto porcentaje de la masa celular. Muchos microorganismos pueden crecer utilizando un gran número de diferentes sustratos. Esto significa que las células microbianas son capaces de sintetizar todas las enzimas necesarias para la transformación de dichos sustratos; es decir, poseen los genes estructurales correspondientes. Para la síntesis de la mayoría de las enzimas que participan en el catabolismo de los sustratos, se requiere la inducción. La formación de enzimas que participan en los procesos de anabolismo, por ejemplo, en la biosíntesis de pirimidinas, purinas y los 20 aminoácidos, es regulada mediante represión. En la mayoría de los casos, la señal para que se detenga la biosíntesis de proteínas, procede de los productos finales de este proceso (represión por producto final). Si en el medio se tienen simultáneamente dos sustratos, las células microbianas (principalmente bacterias), generalmente considera aquél sustrato que asegura un crecimiento más rápido o que es más fácilmente asimilable. La síntesis de las enzimas que disocian al segundo sustrato es reprimida y en este caso se habla de represión catabólica.

La cantidad de una enzima determinada en la célula, puede ser regulada en varios niveles: en la etapa de transcripción, traslación y también en el proceso de agrupación y destrucción de la proteína enzimática. En la jerarquía de la acción reguladora, el mecanismo más complejo que controla la cantidad de enzimas en la célula, está relacionado con el proceso de transcripción. Las señales químicas específicas pueden iniciar o bloquear la transcripción de una determinada parte del ácido desoxiribonucleico (DNA) y del ácido



ribonucleico mensajero (mRNA). En el caso de la inducción, el mRNA participa en la traslación y termina la síntesis de la cadena polipeptídica. La regulación de la síntesis proteica a nivel de traslación, puede realizarse en cualquiera de las etapas; tampoco se excluye la posibilidad de cambiar el tiempo de vida media del mRNA por acción de diferentes efectores, incluyendo productos finales de las rutas metabólicas. Las enzimas realizan su función metabólica después de que han adquirido la estructura correspondiente. La velocidad de formación de esta estructura de orden superior, también se encuentra bajo control de determinadas moléculas. De esta manera, el control a nivel funcional de la enzima activa, puede jugar un papel esencial en la regulación metabólica. Finalmente, la velocidad de destrucción de la enzima, por acción de señales metabólicas específicas también será determinada por su concentración en la célula<sup>67</sup>.

La regulación de la síntesis de enzimas en la etapa de transcripción, está basada en que la unión de los genes bacterianos ocurre selectivamente y en que la velocidad de formación de las copias del mRNA correspondiente, se encuentra bajo un complejo mecanismo de control. La velocidad de la síntesis de enzima, determinada por esta etapa, puede cambiar en diferente grado. En las células de los microorganismos eucariotas, al parecer no existen estructuras genéticas formadas de acuerdo al tipo de los operones clásicos. El papel principal en la regulación de la transcripción en este caso, lo deben desempeñar componentes estructurales de la cromatina, ya que está demostrado que la transcripción de la matriz cromatínica en los sistemas *in vitro*, conserva la especificidad inherente de las células de las que la cromatina ha sido obtenida. Entre los componentes estructurales de la cromatina, se ha prestado una mayor atención a las histonas, las cuales son proteínas de carácter básico en las que los residuos de

aminoácidos básicos están contenidos principalmente en las partes de la molécula que aseguran la unión con el DNA. La parte restante de la molécula, forma una  $\alpha$ -espiral y al parecer condiciona la interacción de las histonas una con otra. Sin embargo, por si mismas las histonas pueden crear el grado de selectividad necesario de la transcripción, aunque de hecho, ejercen un importante papel estructural. Otro elemento, probable regulador del mecanismo de transcripción del DNA en los eucariotas, son las “repeticiones muertas” de secuencias de bases, estructuradas entre sus secuencias únicas que ejercen funciones de genes estructurales y que codifican mediadores proteicos concretos. Estas repeticiones muertas pueden jugar el papel de centros de reconocimiento para la RNA polimerasa y en determinadas condiciones, someterse a modificaciones conformacionales que liberen determinados locus de DNA para la reacción de la RNA polimerasa. También, un importante papel en la regulación de la transcripción en eucariotas. al parecer lo juegan los desplazamientos de los "genes móviles". En la actualidad es difícil hacer una conclusión definitiva sobre la naturaleza de los mecanismos finos de regulación de la transcripción en las células eucariotas.

Las enzimas, cuya síntesis en la célula ocurre a una velocidad constante como resultado de una transcripción constante de los genes correspondientes y que por consiguiente, están presentes en la célula a una concentración mas o menos determinada, se llaman constitutivas. A ellas pertenecen las enzimas de la glicólisis que transforman la glucosa en piruvato. Las rutas metabólicas que funcionan con la participación de enzimas constitutivas, son controladas mediante la acción de otros reguladores; por ejemplo, de inhibición alostérica.

Además de esto, en las células microbianas se tienen enzimas cuya cantidad puede cambiar bruscamente dependiendo de la composición del medio de cultivo. Esto ocurre como

resultado de la inclusión o exclusión de los genes que las determinan de acuerdo a las necesidades de la célula; estas enzimas reciben el nombre de "inducidas". Cuando no existen en el medio los sustratos de ellas, solamente están contenidas en la célula en cantidades traza. Si se añade al medio de cultivo, una sustancia que sirva como sustrato de una enzima determinada, ocurre entonces la formación rápida de esta; es decir, la inducción de su síntesis. Si el medio de cultivo contiene una sustancia que se considera un producto final de alguna ruta metabólica, inmediatamente cesa la síntesis de las enzimas de esta ruta. Este fenómeno recibió el nombre de "represión por el producto final". Las enzimas que participan en esta ruta, pueden ser desreprimidas; es decir, aumentar la velocidad de su síntesis si la concentración del producto final decae hasta niveles muy bajos. La desrepresión de estas enzimas es análoga al fenómeno de inducción<sup>67</sup>.

### **3.1.2.1 REPRESIÓN POR PRODUCTO FINAL.**

En el estudio del mecanismo de represión por el producto final, el papel esencial lo tiene el hecho de que los genes estructurales de algunas enzimas anabólicas en el cromosoma, también están organizados en forma de operón. Considerando lo anterior, la represión de la síntesis de enzimas puede explicarse de la siguiente manera: cuando el producto de la ruta metabólica se acumula en las células, interacciona con una proteína represora formando así un represor activo. Este último se une a la región del operador y baja la transcripción del operón. El tiempo de vida media del mRNA no se prolonga y por eso, el producto final detiene la síntesis de la enzima solamente por un tiempo corto. El producto final, por si mismo, se considera un correpresor pero no en todas las transformaciones anabólicas. Durante la

biosíntesis de algunos aminoácidos, por ejemplo histidina y valina, el correpresor es un derivado del ácido ribonucleico de transferencia (tRNA). Se debe señalar también que la unión de los genes responsables de la síntesis de enzimas anabólicas en "clusters", no es una condición esencial para la regulación por el producto final. En las células de *E. coli* por ejemplo, los genes que codifican las enzimas de la biosíntesis de arginina, ocupan posiciones diferentes en el cromosoma y todos ellos son excluidos por un mismo complejo represor, la arginina.

La regulación de la síntesis de enzimas mediante represión por producto final, resulta más compleja en el caso de rutas ramificadas del anabolismo. En este caso, si uno de los productos finales baja completamente la formación de las enzimas que participan también en la síntesis de otros monómeros, entonces podría presentarse una insuficiencia de las sustancias necesarias para mantener el crecimiento de las células. Durante el estudio de la regulación de la síntesis de enzimas de rutas metabólicas ramificadas, se encontró que existen dos mecanismos que ayudan a superar las dificultades anteriormente mencionadas:

- 1) Las isoenzimas para las reacciones comunes, se sintetizan de tal manera que cada producto final tiene "su" enzima cuya síntesis puede ser reprimida o desreprimida
- 2) Para la represión de la síntesis de enzimas, es necesario que todos los productos que se sintetizan por acción de ellas, estén en exceso. Este tipo de represión se llama, represión multivalente y di o trivalente si en ella participan dos o tres productos.

Los esquemas de regulación han sido estudiados detalladamente para *E. coli* y *S. typhimurium*, pero no deben ser considerados universales para todas las especies microbianas, ya que se ha demostrado experimentalmente que en algunas otras células bacterianas como *B.*

*polymixa*, *Rhodospirillum rubrum* y *B. subtilis* por ejemplo, se han desarrollado otros mecanismos de regulación. Se puede concluir que en el proceso evolutivo de diferentes microorganismos, las rutas anabólicas no han cambiado sino lo que ha cambiado significativamente es su modo de regulación<sup>63</sup>.

### **3.1.2.2 INDUCCIÓN DE LA SÍNTESIS DE ENZIMAS.**

El término, inducción de enzimas, puede conceptualizarse como un aumento relativo de la velocidad de síntesis de la enzima en respuesta a la presencia de una sustancia química, el inductor<sup>37</sup>. La síntesis inducida de enzimas en los microorganismos, fue descrita en los años 30's, pero el mecanismo de este proceso permaneció incomprendido durante mucho tiempo; está fundamentada en un fenómeno ampliamente conocido, como es la adaptación de los microorganismos a diferentes condiciones del medio ambiente<sup>67</sup>.

En la mayoría de los casos, la regulación mediante inducción, es característica para las rutas catabólicas donde en calidad de inductor participan generalmente, los sustratos de estas rutas; sin embargo, las sustancias análogas de los sustratos, se consideran los inductores más favorables debido a que no pueden funcionar como sustratos de las enzimas inducidas; algunas veces, el inductor es el producto de la reacción que es catalizada por la enzima inducida. El ejemplo clásico de enzima inducida, es la  $\beta$ -galactosidasa de *E.coli*; al añadir lactosa al medio de cultivo, la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa en las células, aumenta aproximadamente en 1000 veces. En ausencia de lactosa, el contenido de esta enzima en las células de *E.coli*, es tan pequeño que solo puede detectarse por métodos especiales. Se sabe que la metabolización completa del sustrato, requiere más de una enzima; por ejemplo, para la disociación de la lactosa, son necesarias: una permeasa, la  $\beta$ -galactosidasa y enzimas que transforman la galactosa en glucosa 1-fosfato.

El metabolismo de muchos sustratos, que son la única fuente de carbono o de nitrógeno en el medio nutritivo, está relacionado con la necesidad de su transporte al interior de la célula. La entrada de la lactosa a las células de *E.coli*, la asegura una proteína con características de enzima, la galactósido permeasa, cuya síntesis es inducida al mismo tiempo con la  $\beta$ -galactosidasa como resultado de la llamada inducción coordinada. La galactosa formada por acción de la  $\beta$ -galactosidasa, puede a su vez, inducir la síntesis coordinada de una serie de enzimas que la transforman en glucosa-1-fosfato. Sin embargo, la formación de estas enzimas no está relacionada con el momento en que aparece la  $\beta$ -galactosidasa y la galactósido permeasa. De esta manera, una asimilación completa de la lactosa, ocurre como resultado de una inducción secuencial de las enzimas que la transforman en metabolitos que pueden ser utilizados inmediatamente por la célula. La inducción secuencial se ha encontrado para el caso de rutas catabólicas largas, en las cuáles hay disociación de varios sustratos.

En el año de 1961, F.Jacob y J.Monod, en base al estudio genético y bioquímico de la asimilación de la lactosa por células de *E.coli* K12, propusieron la hipótesis sobre la regulación de la actividad de los genes en las bacterias obteniendo un modelo ampliamente conocido como el modelo del lac-operón. De acuerdo a este modelo, en el cromosoma se tienen por lo menos cuatro sistemas de regulación: gen estructural (o genes que controlan la relación de las funciones bioquímicas); un gen regulador, un promotor y un operador. El gen regulador determina la estructura de la proteína represora. El lac-operón, no se transcribe en ausencia de la lactosa debido a que en esas condiciones, la región operadora está bloqueada por el represor. Cuando a las células de *E.coli* entra la lactosa, se forma cierta cantidad de alolactosa con la participación de  $\beta$ -galactosidasa; la alolactosa se une con la proteína

represora, la cuál cambia entonces su conformación y se destruye su unión con el operador. De esta manera, se hace posible la transcripción del lac-operón<sup>37</sup>.

Durante el crecimiento en un medio que contiene sustancias aromáticas, las células de *Pseudomonas putida* deben sintetizar aproximadamente diez enzimas que no se forman cuándo estas crecen en otros sustratos. Para realizar lo anterior, se distinguen dos mecanismos de inducción: la inducción coordinada y la inducción secuencial. En el primer caso, el sustrato que está contenido en el medio de cultivo "enciende" la síntesis de todas las enzimas necesarias para su disociación. Este mecanismo se ha descubierto para secuencias cortas de reacciones catabólicas<sup>63</sup>. La síntesis coordinada de todas las enzimas necesarias para la utilización de algún sustrato, proporciona a la célula la ventaja de que puede reaccionar rápidamente a la presencia de este. Durante la inducción secuencial, la velocidad de transformación del sustrato, que significa la velocidad de crecimiento de las células, aumenta lentamente debido a que la concentración del producto de la primera reacción debe alcanzar un nivel determinado antes de pueda estimular la formación de la segunda enzima. Durante la regulación de la síntesis de enzimas de rutas convergentes del catabolismo, se tiene una subdivisión oportuna de estas enzimas en grupos regulados coordinadamente, cuya síntesis a su vez, es inducida por el producto de los grupos de enzimas precedentes.

### **3.1.2.3 REPRESIÓN CATABÓLICA.**

Además de la represión por producto final característica para las rutas anabólicas, se ha descrito un tipo de represión al cuál Magazanik lo llamó *represión catabólica*. Este consiste en que un sustrato, fuente de energía, que es mas fácilmente asimilable para la célula, reprime

la síntesis de las enzimas de otras rutas del catabolismo que participan en la metabolización de otra fuente de energía que comparativamente se asimila por la célula en forma más lenta<sup>63</sup>.

La represión catabólica esta fundamentada en el fenómeno de diauxia; si en un medio para el cultivo de *E. coli* por ejemplo, están contenidas glucosa y lactosa, la célula utilizará inicialmente a la glucosa. Independientemente de la presencia del inductor del lac-operón, las enzimas que participan en el catabolismo de la lactosa, no se sintetizan. La transcripción de los genes del operón de lactosa se inicia cuándo la concentración de la glucosa en el medio llega a ser muy baja. De esta manera, la glucosa evita la síntesis de las enzimas del lac-operón.

Experimentalmente fue descubierto que la represión catabólica está relacionada con el nivel de adenosinmonofosfato cíclico (cAMP) intracelular, el cuál, en este proceso funciona en calidad de efector. El cAMP, forma un complejo con una enzima alostérica activadora de catabolito que no es activa en estado libre; este complejo se une a una región determinada del promotor, asegurando la posibilidad de unión de la RNA-polimerasa con el promotor y el inicio de la transcripción. La cantidad de complejo formado, está determinada por la concentración de cAMP, la cuál disminuye al aumentar la concentración de glucosa en el medio. Así, la glucosa ocasiona un cambio en la concentración de cAMP intracelular. Esta sustancia se ha encontrado en las células de todos los organismos procariotas; su única función es reguladora. El cAMP se forma a partir de adenosintrifosfato (ATP), en la reacción catalizada por la adenilatociclasa la cuál está unida a la membrana citoplasmática. La adenilatociclasa posee una alta actividad si los componentes del sistema de transporte de la glucosa en la célula, están fosforilados. Esto ocurre en ausencia de glucosa, es decir, cuándo no es necesario transportarla; de tal manera que la actividad de la adenilatociclasa aumenta al



disminuir la concentración de glucosa en el medio. Esto último origina un aumento del cAMP y como resultado final, la inducción de la síntesis de enzimas del catabolismo de la lactosa. De esta manera, la glucosa a través de su sistema de transporte regula la concentración del cAMP en la célula. Debido a que el catabolismo de la glucosa está relacionado con la formación de energía metabólica y con su reserva en moléculas de ATP, al aumentar la cantidad de ATP en la célula, disminuye la cantidad de cAMP y al contrario<sup>67</sup>. Podemos concluir que generalmente los sustratos que son utilizados por sistemas enzimáticos constitutivos, ocasionan una represión catabólica de las rutas metabólicas inducidas. La glucosa y fructosa, no en todos los microorganismos se consideran sustancias dominantes en este proceso. En *Cl.tetanomorphum* por ejemplo, el L-glutamato reprime la síntesis de enzimas del catabolismo de la glucosa. Así, los mecanismos básicos que regulan las rutas catabólicas son: la inducción de la síntesis de enzimas y la represión catabólica.

La regulación de los procesos de transporte activo que aseguran la entrada de la mayoría de las sustancias necesarias para las células procariotas, ocurre a nivel de la síntesis del transportador y de su funcionamiento. La biosíntesis de los componentes proteicos de muchos sistemas de transporte, es regulada por el tipo de inducción. La glucosa, cuyo sistema de transporte en la mayoría de los procariotas es constitutivo, baja la formación de los sistemas de transporte de otros azúcares y de una serie de ácidos orgánicos mediante represión catabólica. La excepción la constituyen algunos microorganismos aerobios obligados, en los cuáles, el transporte de ácidos orgánicos es constitutivo y el sistema de transporte de la glucosa es inducido. Un exceso de sustrato en el medio, puede reprimir la síntesis del sistema de transporte correspondiente; esto es particularmente característico para los aminoácidos. En

este caso, la regulación del transporte está coordinada con la regulación de su metabolismo subsecuente. De esta manera, los procesos de transporte celular se encuentran bajo control de los mismos mecanismos que los procesos anabólicos y catabólicos intracelulares.

La obtención de mutantes con daños en el sistema de regulación del metabolismo celular que conducen a la sobresíntesis de determinados metabolitos, se utiliza ampliamente para la obtención de aminoácidos, vitaminas, polisacáridos y de otras sustancias que tienen un significado práctico<sup>67</sup>.

En la represión catabólica, el caso es más complicado cuándo algún aminoácido sirve para la célula, no solo como fuente de energía y carbono sino también como fuente de nitrógeno. Para ilustrar esto, en el ejemplo de utilización de histidina por células de *E.aerogenes*, se observa como puede influir la glucosa en el contenido de enzimas que catalizan la asimilación del aminoácido mencionado. Si estas células se crecen en un medio que contiene glucosa y nitrógeno amoniacal, no ocurre la formación de histidinasa aún en presencia de histidina. La glucosa y los iones de amonio en forma conjuntan, detienen casi por completo la síntesis de esta enzima. Cuándo los iones de amonio no están presentes, es decir, cuando las células no tienen una fuente de nitrógeno complementaria y deben utilizar el nitrógeno de la histidina, la acción represora de la glucosa sobre la síntesis de la histidinasa esta menos expresada. Este ejemplo demuestra que la deficiencia de nitrógeno puede, parcialmente, disminuir la represión catabólica ocasionada por la glucosa. De esta manera, la síntesis de la enzima catabólica depende no solamente de la presencia del inductor y de la fuente de energía, sino también de la presencia de nitrógeno en el medio<sup>128</sup>.

## **PARTE EXPERIMENTAL**

### **CAPÍTULO IV**

#### **4.1 ETAPAS DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN.**

Como mencionamos anteriormente, el objetivo del presente trabajo fue el diseño de biocatalizadores fundamentados en células de microorganismos para la síntesis de aminoácidos; específicamente del aminoácido L-aspartico.

El desarrollo de este trabajo, comprendió varias etapas:

- a) Colección de muestras de suelo de distintas áreas de la región.
- b) Tratamiento de las muestras colectadas para el aislamiento y la obtención de cultivos puros.
- c) Identificación de las especies microbianas aisladas, las cuáles fueron utilizadas para el desarrollo de este trabajo.
- d) Inducción de los microorganismos seleccionados para la sobreproducción de la enzima aspartatoamoníacoliase.
- e) Comprobación de que los microorganismos seleccionados desarrollaron la actividad enzimática aspartatoamoníacoliase.
- f) Selección de medios de cultivo líquidos que permitieron la máxima expresión aspartatoamoníacoliase de los biocatalizadores.
- g) Determinación del tiempo óptimo de incubación de los biocatalizadores, para la máxima expresión de la actividad aspartatoamoníacoliase.
- h) Estudios cinéticos de crecimiento microbiano para obtener información sobre la fase en la

que se encuentran los biocatalizadores desarrollados.

- i) Influencia de la concentración de cada componente del medio de cultivo líquido seleccionado sobre la actividad aspartatoamoníacoliase de los biocatalizadores obtenidos.
- j) Estudio de la influencia del tolueno como plasmolizador de los biocatalizadores obtenidos, para establecer su efecto sobre la velocidad inicial de la reacción aspartasa.
- k) Definición del estado de anabiosis de las células microbianas utilizadas en el proceso de biotransformación del ácido fumárico en aspártico, mediante el empleo de inhibidores de la actividad vital de organismos procariotas.

#### **4.2 OBTENCIÓN DE CULTIVOS PUROS E IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS SELECCIONADAS.**

El aislamiento de los microorganismos de su hábitat natural: tejidos, líquidos del organismo animal, medio ambiente, etc, se realiza mediante la resiembra de éstos materiales en medios nutritivos artificiales. Para efectuar estudios posteriores de los cultivos microbianos obtenidos, es necesario que estos sean cultivos puros, los cuáles se logran mediante la siembra de la muestra obtenida en medios sólidos y resiembras posteriores que pueden realizarse en medios sólidos, líquidos y semilíquidos<sup>116</sup>.

En el presente trabajo, la colecta inicial de las muestras de suelo, se realizó colocándolas en tubos de cultivo estériles que contenían 10 ml de solución fisiológica. Con una asa bacteriológica, se pasó una porción de la muestra a la superficie de un medio de cultivo sólido preparado a base de agar nutritivo y se sembró en este por estría y por difusión utilizando una varilla de cristal estéril para esparcir la muestra, con lo cuál se logra adelgazarla y además, que

las colonias que se desarrollen, queden separadas unas de otras<sup>23</sup>, se incubaron durante 24-48 . a una temperatura de 30-37°C. Las colonias de microorganismos obtenidas de estos cultivos mixtos, se resemebraron periódicamente por estría en agar nutritivo en cajas Petri, suponiendo que cada colonia aislada era la descendencia de una sola célula y por lo tanto, un cultivo puro<sup>110</sup> y se incubaron bajo las condiciones mencionadas hasta que finalmente se obtuvieron cultivos perfectamente puros; es decir, colonias de un solo tipo de individuos<sup>6</sup>.

En esta etapa se obtuvieron mas de treinta cepas diferentes, tanto bacterias, levaduras y hongos, pero debido a la consideración de que la aspartatoamoníacoliase está ampliamente distribuida en el grupo taxonómico de los organismos procariotas<sup>41.44.47</sup>, se seleccionaron las colonias bacterianas para continuar la investigación.

Para mejorar las posibilidades de aislamiento del biocatalizador deseado<sup>6</sup>, se preparó un medio de cultivo sólido con la siguiente composición (%): cloruro de potasio - 0.1; cloruro de sodio - 0.1; peptona - 1.0; extracto de levadura - 0.5; agar bacteriológico 1.5 y se le añadió ácido L-aspartico - 0.05%. Se sembraron diez cepas bacterianas en este medio por estría en caja Petri y en tubo de cultivo con el medio solidificado en pico de flauta, durante 24 y 48 hrs. a una temperatura de 30-32°C. En esta fase, únicamente seis cepas presentaban desarrollo en el medio seleccionado. Se aumentó la cantidad de ácido L-aspartico añadido al medio de cultivo a 0.1%, resemebrando a los microorganismos en las condiciones indicadas hasta que finalmente, seleccionamos dos cepas que presentaban un excelente desarrollo en dicho medio de cultivo.

Las dos cepas seleccionadas, se resemebraron en forma periódica en el medio de cultivo sólido mencionado, pero se hicieron las siguientes variaciones de la cantidad de ácido L-aspartico que era añadido al medio como inductor (%): 0.05, 0.1, 0.2 y 0.3. El cultivo de los

microorganismos, se realizó por estría en cajas Petri y en tubos de cultivo con el medio solidificado en pico de flauta.

La necesidad de identificar, clasificar y caracterizar adecuadamente las cepas microbianas que son fuentes de diversas enzimas y que se utilizan en procesos biotecnológicos, nos condujo a realizar estudios sobre las características morfológicas y bioquímicas de los microorganismos seleccionados. Para ello, inicialmente se realizaron tinciones diferenciales, particularmente la más difundida de ellas, la tinción de Gram, con la cual se aprecia la capacidad de las bacterias de fijar el colorante o de decolorarse con alcohol-cetona, lo que está relacionado con la estructura química de la pared celular; específicamente con la capa de peptidoglicano<sup>43</sup>. La tinción por Gram se realizó de acuerdo a la técnica descrita en el trabajo de Cowan S.T. en 1974<sup>24</sup>.

Frecuentemente, la identidad de una especie microbiana determinada requiere que se conozca de manera detallada su actividad bioquímica, porque las características morfológicas tanto coloniales como celulares, no son suficientemente distintivas o diferenciales<sup>110.128</sup>. En general, el microorganismo se cultiva en medios sintéticos previamente establecidos para este propósito y después de la incubación, el cultivo se examina para ver los cambios químicos que hayan ocurrido. Particularmente se investiga la relación del microorganismo con sus fuentes de carbono y nitrógeno, los productos de la actividad vital que se acumulan en el medio (ácido, gas, alcohol), su relación con el oxígeno, bases y otros factores del medio ambiente; también es muy importante determinar su actividad enzimática<sup>143</sup>. En base a estos antecedentes, se realizaron distintas pruebas bioquímicas para las dos cepas seleccionadas, eligiendo una serie de medios que miden diferentes características metabólicas de los microorganismos en estudio que permiten determinar una "huella digital" bioquímica para

lograr la identificación de las especies. Esto fue realizado de acuerdo a las técnicas descritas por Koneman y col<sup>160</sup>. Además, las dos cepas fueron enviadas a la American Type Culture Collection en Rockville, Maryland U.S.A para la confirmación de su identificación.

### **4.3 COMPROBACIÓN DEL DESARROLLO DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA ASPARTATOAMONÍACOLIASA EN CÉLULAS DE *B. cereus* Y *E. cloacae*.**

La aspartatoamoníacoliasa (C.E. 4.3.1.1) cataliza la reacción reversible de aminación del ácido fumárico con amonio formando ácido aspártico. Para efectuar esta reacción utilizando las células de *B. cereus* y *E. cloacae* como biocatalizadores, fue necesario inicialmente seguir las condiciones de reacción mencionadas en la literatura<sup>82.126.165</sup>: sustrato - fumarato de amonio 0.5M; temperatura - 37°C; pH - 8.0, cloruro de magnesio 0.1% y tolueno - 1.0%

#### **4.3.1 Preparación de los biocatalizadores.-**

Las células de *B. cereus* y *E. cloacae* fueron cultivadas en un medio líquido preparado con fundamento en los trabajos de Enei<sup>49</sup>, Kisumi<sup>97</sup> y Kondriateva<sup>83</sup>. Se estableció un medio nutritivo líquido para la propagación de los biocatalizadores con la siguiente composición (%): caldo de Hottinger ( preparado de acuerdo a la técnica de R.V. Epshtein – Litvak<sup>19</sup>) - 50 %/v- extracto de levadura (50 ml de una solución al 0.5%); peptona - 0.5 y ácido L-aspártico - 0.1. El pH del medio se ajustó a 7.0 cuando fue necesario con hidróxido de amonio o ácido acético. El medio nutritivo se esterilizó a 121°C durante 15 minutos, después de lo cual, se distribuyó en volúmenes de 100 ml. en matraces Erlenmeyer de 1000 ml. Se prepararon las cepas para su inoculación al medio líquido de la siguiente manera: se cultivó a los microorganismos en tubos de cultivo con medio solidificado en pico de flauta durante 24 h.,

pasado este tiempo, se le agregó al tubo de cultivo, 1 ml. del medio líquido, se hizo una suspensión lo más homogénea posible; de aquí, se tomaron volúmenes de 0.1 ml (0.1 ml de suspensión corresponde aproximadamente a  $2.15 \times 10^6$  células), los cuáles fueron inoculados en los matraces que contenían los 100 ml de medio nutritivo líquido. Se incubaron durante 10 h.<sup>126,165</sup> a una temperatura de 30-32°C bajo agitación constante a 250 rpm. De la misma manera se cultivaron los microorganismos control; es decir, aquéllos que se desarrollaron en medio sólido sin ácido aspártico como inductor y que por lo tanto se consideró, no sobreproducían la enzima aspartasa. Posteriormente se procedió a separar la biomasa desarrollada por centrifugación a una temperatura de 0-4°C durante 20 minutos a 6370Xg. El paquete celular obtenido, se lavó dos veces con agua de la llave esterilizada o con solución amortiguadora de fosfatos 0.01M de pH-7.0 para eliminar los residuos del medio nutritivo líquido que pudieran haber quedado adheridos a la pared celular. Se separó el paquete celular centrifugando durante 15 min. bajo las mismas condiciones. Después de la última lavada, las células se suspendieron en solución amortiguadora de fosfatos 0.01M de pH-7.0 y se conservaron a temperatura ambiente o a 4°C.

#### **4.3.2 Preparación del sustrato para la reacción catalizada por la aspartasa intracelular de *B. cereus* y *E. cloacae*.**

Como sustrato para la reacción aspartasa o aspartatoamoníacoliasa, se utilizó fumarato de amonio 0.5M, preparado con ácido fumárico e hidróxido de amonio y ajustando hasta un pH de 8.0 con este último<sup>82,165</sup>. El avance de la reacción en el curso del tiempo, se realizó por el método espectrofotométrico<sup>48,115</sup>; se realizaron mediciones de la concentración del sustrato consumido (o transformado en producto) por su absorbancia a 240 nm. en un



espectrofotómetro Beckman DU-650. La longitud de onda de máxima absorbancia del fumarato de amonio, fue seleccionada realizando espectros de absorción de esta sustancia desde 200 hasta 400 nm; asimismo, se estudiaron los espectros de absorción del ácido L-aspartico para tener mayor seguridad de que la longitud de onda seleccionada no coincidiera con la de máxima absorbancia del fumarato de amonio. Las mediciones se realizaron en una celda de 1 cm de espesor utilizando agua destilada para calibrar y un coeficiente de extinción molar de  $2.53 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ <sup>165,179</sup>.

El cambio en la concentración de sustrato en el curso del tiempo de la reacción, fue determinado por la siguiente ecuación:

$$[S] = D_{240} \cdot d / \epsilon \cdot a$$

Donde: [S] - es la concentración de sustrato

$D_{240}$  - es la densidad óptica de la solución

d - dilución de la solución inicial

$\epsilon$  - es el coeficiente de extinción molar del ácido fumárico,  $2530 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

a - trayecto óptico de la celda, 1 cm

La determinación inmediata de fumarato de amonio solo es posible a concentraciones bajas de  $10^{-4}$  a  $10^{-3}$  M; en este caso se trabajó a concentraciones más altas, así que fue necesario efectuar diluciones de las muestras, aproximadamente de 2,000 a 4,000 veces.

#### 4.3.3 Determinación de la concentración de proteína.-

Debido a que la aspartatoamoníacoliase está contenida en el interior de las células de *B. cereus* y *E. cloacae* y no se conoce su concentración exacta<sup>164</sup>, fue necesario determinar el contenido de proteína total en las células microbianas, para calcular posteriormente la

actividad enzimática aspartasa. Para ello, se utilizó la metodología propuesta por Peterson para células de microorganismos<sup>113</sup>, que permite una rápida determinación de la concentración de proteínas de la membrana y de proteolípidos en soluciones diluídas (1-100 µg de proteína por ml). Inicialmente se construyó una curva de calibración lineal utilizando como proteína estándar, la albúmina de suero bovino. En esta curva de calibración se expresa el logaritmo de la densidad óptica de la solución, en función del logaritmo de la concentración de proteína en la muestra. Se considera que la región lineal de la curva de calibración es posible ampliarla desde 5 µg hasta 125 µg de proteína en la prueba<sup>61</sup>. El procedimiento que se siguió para la determinación de proteína fue el siguiente:

**\*\* Preparación de los reactivos necesarios:**

- Tartrato de sodio-potasio al 2%
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  al 1%
- $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 20%
- NaOH 0.8N

Estos reactivos, además del SDS (dodecil sulfato de sodio), se utilizaron para la preparación del reactivo "A": 0.6 g. de SDS, 12 ml de agua destilada, 6 ml de NaOH 0.8N, 6 ml de una solución que se preparó con 5 ml de carbonato de sodio al 20%, 1 ml de sulfato de cobre al 1%, 1 ml de tartrato de sodio y potasio al 2% y 3 ml de agua destilada.

- Reactivo de Folin 2N\*

\* El reactivo de Folin se preparó también en el Departamento de Biotecnología de la siguiente manera:

En un matraz erlenmeyer de 1 L, se disolvieron 25 g. de wolframato de sodio ( $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) y 6.25 g. de molibdato de sodio ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) en 175 ml de agua

destilada. Se agregaron cuidadosamente 25 ml de ácido fosfórico al 85% y 25 ml de HCl conc. Se adaptó un condensador y se sometió a reflujo durante 10 h., después de lo cual se dejó enfriar y se adicionaron 37.5 g. de sulfato de litio, 12.5 ml de agua destilada y 3 a 4 gotas de bromo. Se llevó a ebullición nuevamente ya sin condensador y dentro de una campana de extracción durante 15 min. para eliminar el exceso de bromo. Se completó a 250 ml con agua destilada y se conservó en frasco ámbar en refrigeración.

**\*\* Construcción de la curva de calibración.-**

Para la construcción de la curva de calibración se preparó una solución madre que contenía 125 µg/ml de albúmina de suero bovino. De aquí, se tomaron las siguientes cantidades: 1.0, 0.8, 0.6, 0.5, 0.4, 0.2, 0.1 ml se completaron a 1 ml con agua destilada y se colocó un control que contenía solo 1 ml de agua destilada. Todas las muestras fueron tratadas con 1 ml de reactivo "A". Después de 10 min. se les añadió 0.5 ml de reactivo de Folin y al cabo de 30 min. se leyó la absorbancia de cada muestra a una longitud de onda de 750 nm. en un espectrofotómetro Beckman DU-650 en una celda de 1 cm de espesor frente al control. Se construyó la curva de calibración como se indicó anteriormente.

De esta manera, para la determinación de proteína celular, se tomaron 0.1 ml de la suspensión celular obtenida en el desarrollo de la biomasa y se diluyó en 50 ml de agua destilada. Se trató de la misma manera que las muestras para la construcción de la curva de calibración y se extrapolo en la gráfica construida para este fin, obteniéndose así la cantidad de proteína bacteriana total en mg/ml, que es utilizada como biocatalizador en la reacción aspartasa. Es necesario mencionar que las lecturas de las muestras en el espectrofotómetro, deben hacerse inmediatamente después de que han pasado 30 minutos de la adición del reactivo de Folin, ya que hay una pérdida del 1-2% en la coloración de las muestras por h.<sup>113</sup>.

#### 4.3.4 Determinación de la actividad enzimática.-

La actividad aspartatoamoníacoliase de las células de *B. cereus* y *E. cloacae*, se determinó con base en las mediciones cinéticas realizadas en estudios de consumo de sustrato en función del tiempo de reacción. La reacción se llevó a cabo en reactores batch enchaquetados con capacidad de 120 ml bajo agitación constante. En cada uno de ellos se agregaron 30 ml del sustrato, fumarato de amonio 0.5 M de pH - 8.0, MgCl<sub>2</sub> - 0.03 gr, tolueno 0.3 ml y la temperatura de reacción fue de 37°C. La reacción se inició al añadir 3 ml de la suspensión de células que corresponden a una cantidad de proteína de 1–2 mg/ml. Se recogieron alícuotas de 250 µl (las alícuotas que se recogen deben ser de volumen pequeño en comparación con el volumen total de la mezcla reaccionante para alterar lo menos posible la interrelación sustrato - biocatalizador).

Para un estudio mas completo del período inicial de la reacción, los primeros 20 min. se recogieron alícuotas cada 5 min; después, cada 10 min. hasta que se llevaba 1 h de reacción y finalmente la segunda hora, cada 15 min. Las muestras se colocaron en tubos de ensayo con agua destilada, se detuvo la reacción por calentamiento a 80-100°C durante 3 min, posteriormente se determinó la absorbancia de cada muestra en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 240 nm. Los resultados obtenidos de las lecturas de absorbancia, se convierten de unidades ópticas a concentración de sustrato de acuerdo a la ecuación expresada en el apartado de preparación del sustrato. Los datos se procesaron en una gráfica de concentración de sustrato en función del tiempo de reacción,  $[S] = f(t)$ . La actividad enzimática aspartasa se determinó cuantitativamente de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$A.\text{mmoles/mg seg} = \frac{k_1}{[p]}$$

Dónde:  $k_1$  - es la constante efectiva de la velocidad del proceso, que se determina como la tangente del ángulo de desviación en la gráfica de  $[S] = f(t)$  y  $[p]$  es la concentración de proteína expresada en miligramos de proteína por mililitro de mezcla reaccionante o sustrato. La actividad enzimática aspartasa, fue calculada también como Unidades de Actividad Aspartasa (U), que corresponden a la cantidad de micromoles de sustrato transformado por miligramo de proteína por hora.

#### 4.3.5 Metodología para la identificación del producto de la reacción aspartasa.-

El producto de la reacción aspartasa, catalizada por células de *B. cereus* y de *E. cloacae*, el aminoácido L-aspartico, fue determinado inicialmente por el método de ninhidrina<sup>92</sup> que es ampliamente utilizado para la determinación de aminoácidos. La ninhidrina descarboxila por oxidación los  $\alpha$ -aminoácidos a  $\text{CO}_2$ ,  $\text{NH}_3$  y un aldehído con un átomo de carbono menos que el aminoácido precursor. Luego, la ninhidrina reducida reacciona con el aminoácido formando un complejo de color azul<sup>100</sup>. En esta reacción, el sustrato, fumarato de amonio, no presenta reacción con la ninhidrina y debido a ello, es posible la determinación inmediata del producto de la reacción en las alícuotas tomadas de la mezcla reaccionante. En base a estos datos, se realizó la identificación en la mezcla reaccionante, que resultó positiva. Además de esta prueba de identificación, se realizó un estudio cromatográfico en capa delgada<sup>104</sup>; para ello, se prepararon placas de sílica gel con una superficie perfectamente uniforme, se colocaron estas placas en la estufa a una temperatura de 80 - 100°C durante 2 o 3 h. para activarlas y posteriormente se aplicaron las muestras que consistieron en: ácido L-aspartico de grado analítico (control), una mezcla de aminoácidos (ácido L-aspartico, lisina, histidina, triptofano y tirosina) y el producto de la reacción obtenido al detener la reacción aspartasa por

calentamiento y precipitando el producto con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> hasta un pH de 2.5-3.0<sup>144,179</sup>. Las placas se colocaron en cámaras que contenían el eluente: butanol-ácido acético y agua (1:1:1). Se dejó correr el eluente hasta 1 cm antes de la altura total de las placas; se secaron en la estufa a 80°C y se revelaron con una solución de ninhidrina. La identificación final del ácido L-aspartico obtenido se realizó por cromatografía de líquidos (HPLC), utilizando una columna de fase reversa empacada con Lichrosorb RP-18 de 5µm, y acetonitrilo/fosfato como eluente.

#### **4.4 SELECCIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO LÍQUIDO PARA LA PROPAGACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS CON ACTIVIDAD ASPARTATOAMONÍACOLIASA**

En el párrafo correspondiente a la preparación de los biocatalizadores, se mencionó ya la composición del medio de propagación que fue establecido en base a revisión de literatura. Los microorganismos desarrollados en este medio, tanto *B. cereus* como *E. cloacae*, expresan claramente la actividad enzimática aspartatoamoníacoliasa; sin embargo, para el estudio adecuado de un biocatalizador, es deseable utilizar un medio optimizado y balanceado ya que las características fisiológicas de los microorganismos varían ampliamente en relación a sus necesidades nutricionales y dan respuestas diversas dependiendo de las condiciones de los medios de cultivo<sup>89,110</sup>; además, es conveniente que los microorganismos que se utilizan en los procesos biotecnológicos, sean propagados en medios de cultivo cuyos componentes estén estandarizados; es decir, que no tengan variaciones en el contenido de la fuente de carbono, nitrógeno, etc. ya que esto repercute en la fisiología del microorganismo y por lo tanto, en el rendimiento del producto terminado<sup>22,42,96</sup>.

El medio de cultivo líquido que se había utilizado para la propagación de los biocatalizadores contenía (%): caldo de Hottinger - 50 (%/v), extracto de levadura (50 ml de una solución al 0.5%); peptona - 0.5 y ácido L-aspártico - 0.1. De estos componentes, como ya se había mencionado, el caldo de Hottinger es un medio natural ya que es preparado a partir de materia prima fresca; debido a ello, puede tener variaciones en su composición dependiendo de la calidad de estas. Por lo anterior, se buscó un medio de cultivo líquido para los biocatalizadores en los que el caldo de Hottinger fuera sustituido por otro componente ya estandarizado y que este cambio no influyera en la expresión de la actividad enzimática de los biocatalizadores. Se prepararon también otros medio de cultivo líquido para comparar el desarrollo y la actividad enzimática de los microorganismos tomando en cuenta que los microorganismos seleccionados crecen en presencia de oxígeno y en medios que contienen caldo nutritivo y algunos péptidos<sup>63</sup>. Fueron utilizados los siguientes medios de cultivo:

I. Caldo de Hottinger - 50 (%/v)

Cloruro de sodio - 0.5 g  
Agua de la llave - 50 ml

III. Caldo nutritivo - 0.8 g(%/v)

Cloruro de sodio 0.5 g (%/v)  
Ácido L-aspártico - 0.1 g (%/v)

II. Medio YPG (%):

Extracto de levadura - 0.3 g  
Glucosa - 2.0 g  
Peptona - 1.0 g  
Agua destilada.

IV. Caldo nutritivo - 0.8 g (%/v)

Extracto de levadura 0.3 g (%/v)  
Peptona - 1.0 g (%/v)  
Ácido L-aspártico - 0.1 g (%/v)

V. Caldo de Hottinger - 50 (%/v)

Extracto de levadura - 0.3 g  
Peptona - 1.0 g  
Ácido L-aspártico - 0.1 g

Se realizaron una serie de 10 experimentos, en los cuáles se estudió el cambio en la concentración de fumarato de amonio 0.5M que se utiliza como sustrato de la reacción aspartasa. Como biocatalizador de esta reacción, se utilizaron únicamente las células de *B. cereus* cultivadas en cada uno de los cinco medio mencionados durante seis horas bajo agitación constante a una temperatura de 30-32°C, separadas posteriormente del medio de cultivo y suspendidas en una solución amortiguadora de fosfatos 0.01M de pH-7.0. Estas células contienen todo el conjunto de enzimas necesarias para el crecimiento; sin embargo, estas se encuentran en un estado de inactividad relativa<sup>42</sup>. La determinación de la actividad enzimática se realizó de acuerdo a la metodología expuesta en el párrafo de determinación de la actividad enzimática anteriormente descrito.

#### **4.5 DETERMINACIÓN DEL TIEMPO ÓPTIMO DE INCUBACIÓN DE CÉLULAS DE *B. cereus* Y *E. cloacae* PARA LOGRAR UNA MÁXIMA EXPRESIÓN DE LA ACTIVIDAD ASPARTATOAMONÍACOLIASA.**

La organización de los procesos biotecnológicos en los que se utiliza la actividad de los microorganismos como catalizadores, generalmente considera estudios sobre la fisiología de los organismos productores<sup>18</sup>. Los microorganismos en la naturaleza, rara vez se encuentran en condiciones óptimas; de tal manera que, la seguridad de acceso de los sustrato y el punto óptimo de las demás condiciones, constituyen solo un período muy corto en la vida de los microorganismos tanto en el suelo como en el agua. De hecho, la combinación de todas las condiciones óptimas, es creada en el laboratorio. Si la síntesis del producto deseado en un proceso biotecnológico está relacionada con el crecimiento microbiano, entonces, la ruta básica para aumentar la productividad debe estar dirigida a lograr un desarrollo óptimo de las células que se exprese en términos cuantitativos<sup>110,128</sup>; o si el producto no guarda relación



proporcional con la cantidad de biomasa microbiana acumulada, entonces, es necesario conocer la interrelación entre este y la fase de crecimiento en la que se encuentre el microorganismo, ya que esto nos da información sobre el estado fisiológico que tiene la célula en el momento indicado<sup>114</sup>.

En relación con este punto, se realizaron estudios para establecer el tiempo óptimo de incubación que requieren, tanto las células de *B. cereus* como de *E. cloacae* para expresar de una forma máxima, la actividad aspartatoamoníacoliase desarrollada<sup>175</sup>. Para realizar este estudio, se prepararon las cepas para inoculación en medio líquido como se menciona en el párrafo de obtención de los biocatalizadores; se incubaron a diferentes tiempos: 2,4,6,8,10, 12,14 y 16 h bajo agitación constante, 250 rpm, a una temperatura de 30-32°C. Después de cada período de incubación, se recogió la biomasa por la técnica ya descrita y se determinó la actividad enzimática de acuerdo a lo propuesto en el apartado de determinación de la actividad enzimática de los biocatalizadores. para lo cuál fue necesario también conocer la cantidad de proteína celular total desarrollada para cada tiempo de incubación.

Simultáneamente con los experimentos para la determinación del tiempo óptimo de incubación, se realizó otra serie de experimentos que nos proporcionó información sobre la cinética de crecimiento microbiano. Para esto, se preparó el biocatalizador para su propagación en medio líquido, se incubó durante 24 h a 30-32°C bajo agitación constante, 250 rpm y cada hora se tomó una alícuota de 1 ml que fué tratada para sembrarse en medio de cultivo sólido. Este método se denomina conteo en placa y es ampliamente utilizado ya que pone de manifiesto únicamente la población viable sin considerar células degradadas o muertas del cultivo<sup>110</sup>.

#### **4.6 ESTUDIO SOBRE LA INFLUENCIA DE CADA UNO DE LOS COMPONENTES DEL MEDIO DE CULTIVO LÍQUIDO SELECCIONADO, SOBRE LA EXPRESIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA ASPARTASA, DE CÉLULAS DE *B. cereus*.**

La utilización de los microorganismos en los procesos biotecnológicos supone el cultivo optimizado de estos, de tal manera que expresen al máximo su capacidad biosintética de los productos deseados. Para lograr esto, se estudió el efecto que ejercen cada uno de los componentes del medio de cultivo líquido sobre la capacidad de expresión de la actividad aspartatoamoníacoliase de las células de *B. cereus* que son utilizadas como catalizadores en la síntesis del ácido L-aspartico; es decir, establecer si alguno de los componentes del medio es un factor limitante o inhibidor para la expresión de esta actividad enzimática y a qué concentración lo es. La limitación del crecimiento por la deficiencia de algún elemento de la alimentación, es analizada como un medio para dirigir el metabolismo<sup>18</sup>. El medio de cultivo seleccionado como resultado de los experimentos realizados para este fin, contenía (%): 0.8 de Caldo nutritivo; 0.3 de extracto de levadura, 1.0 de peptona y 0.1 de ácido L-aspartico. Los experimentos fueron diseñados de la siguiente manera: se hicieron variaciones en la concentración de cada uno de los componentes:

Caldo nutritivo (%): 0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.8, 1.0

Peptona (%): 0, 0.1, 0.3, 0.5, 1.0

Extracto de levadura (%): 0, 0.1, 0.2, 0.25, 0.3

Al estudiar la influencia de cada componente del medio, el resto de estos permaneció sin variaciones en su concentración. Se preparó el biocatalizador, células de *B. cereus*, de acuerdo a la metodología descrita anteriormente para este fin, utilizando los medios de propagación preparados considerando las variaciones de concentración de los componentes. Se determinó

la actividad enzimática de los paquetes celulares obtenidos siguiendo la metodología establecida para ello en el párrafo de "determinación de actividad enzimática"; de igual manera se procedió a la determinación de la proteína celular desarrollada.

#### **4.7 INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE TOLUENO COMO PLASMOLIZADOR SOBRE LA VELOCIDAD DE LA REACCIÓN ASPARTATO-AMONÍACOLIASA CATALIZADA POR CÉLULAS DE *B. cereus* Y *E. cloacae*.**

En los procesos tecnológicos en los que se utilizan células de microorganismos en calidad de catalizadores, el transporte de las sustancias a través de la pared celular y la membrana citoplasmática en condiciones naturales, se realiza principalmente por difusión pasiva que se somete a la Ley de Fick o por difusión facilitada debido al estado en el que se encuentran las células y a la fuerza iónica de la solución externa por la alta concentración de los sustratos. Esto constituye una de las principales limitantes ya que la velocidad del proceso dependerá de la velocidad a la que se transporten los sustratos a través de la pared celular y membrana citoplasmática, la cuál, no es suficiente para justificar el uso de estos biocatalizadores; debido a ello es necesario, en primer lugar, investigar las posibilidades de aumentar la permeabilidad de la membrana para los sustratos y productos de la reacción. En relación con este punto, se revisaron diferentes métodos de activación que producen un aumento en la velocidad de transporte de las sustancias<sup>70,74</sup>; en estos trabajos se describe que al calentar brevemente las células de *E. coli* hasta una temperatura cercana a la letal, ocurre el desprendimiento de los lipopolisacáridos y de algunas proteínas; asimismo, que cambia el estado físico de los componentes de la membrana. En el trabajo de Hitchener<sup>70</sup> se estableció que bajo un choque térmico de las células de *E. coli*, ocurrió un cambio en la estructura de la membrana externa de las células que sin embargo, no ocasionó su muerte, y aproximadamente el 20% de los

lipopolisacáridos se segregó a la solución. Posteriormente se utilizó etilendiaminatetracetato (EDTA) 1mM, el cual aumentó la extracción de los lipopolisacáridos hasta un 50%. Se señaló también que el choque térmico ocasionó un cambio en la membrana citoplasmática debido a la extracción de lipopolisacáridos y de algunas enzimas. Un efecto muy parecido al descrito en el trabajo de Hitchener, es ocasionado por la acción del tolueno, EDTA, cloroformo, éter, dimetilsulfóxido, fenol, acetona, alcoholes alifáticos, etc.<sup>40,52,68,108,119,157</sup>

En el presente trabajo se investigó la acción que ejerce el tolueno como plasmolizador y se estudió ampliamente su efecto sobre la pared celular y membrana citoplasmática de los biocatalizadores obtenidos y que se ve reflejada en la velocidad de la reacción catalizada por las células completas de *B. cereus* y *E. cloacae*, y posteriormente en los valores de su actividad aspartatoamoníacoliase. Con relación a este punto, se efectuaron experimentos donde se estudió la velocidad inicial de la reacción aspartatoamoníacoliase en reactores de mezclado ideal, catalizada por células libres de *B. cereus* y de *E. cloacae* bajo las siguientes condiciones de reacción: sustrato-fumarato de amonio 0.5M, pH-8.0, MgCl<sub>2</sub>-0.1%, T-37°C, variando la concentración de tolueno (%): 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, para *B. cereus* y estudiando además, 1.5%, 2.0% y 2.5% en el caso de *E. cloacae*. El curso de la reacción y la determinación de la actividad enzimática, se realizó de acuerdo a la metodología mencionada en el apartado de "determinación de la actividad enzimática".

#### **4.8 EMPLEO DE CLORANFENICOL PARA COMPROBAR EL ESTADO DE ANABIOSIS DE LAS CÉLULAS DE *B.cereus* DURANTE LA BIOTRANSFORMACIÓN DE ÁCIDO FUMÁRICO EN ÁCIDO L-ASPÁRTICO.**

Estos experimentos tuvieron como propósito, establecer si la síntesis de la aspartatoamoníacoliase ocurre *de novo* al utilizar las células de *Bacillus cereus* como biocatalizadores de la síntesis del aminoácido L-aspartico en reactores tipo batch o si las células sobreproducen la enzima mencionada en el transcurso de la fermentación y se encuentran, en la biotransformación, en un estado de anabiosis. Para ello, se inhibieron algunos procesos de la actividad vital de las células microbianas como la síntesis de proteínas. Se utilizó uno de los antibióticos más efectivos para células bacterianas, el cloranfenicol, que inhibe la formación del enlace peptídico como resultado del bloqueo del sitio activo de la peptidiltransferasa en la subunidad 50S del ribosoma <sup>37</sup>.

Las células de *B.cereus* se cultivaron en el medio nutritivo previamente seleccionado, durante 6 h a 30-32°C bajo agitación constante. El cloranfenicol se añadió al cultivo en concentraciones de 300 µg/ml, después de iniciada la fermentación: a las 2, 3, 4 y 5 horas, continuando la incubación hasta las seis horas establecidas inicialmente. Después de este tiempo de incubación, la biomasa celular desarrollada, se separó por centrifugación a 6370Xg durante 20 min a 2-4 °C. Se determinó también la proteína celular por el método de Peterson <sup>113</sup>. El paquete celular obtenido en cada caso, se utilizó como biocatalizador de la reacción aspartasa que se realizó en reactores batch de acuerdo a la metodología previamente descrita para este fin. Simultáneamente, la reacción se efectuó utilizando mezcla reaccionante que no contenía tolueno en calidad de plasmolizador, para establecer además si la integridad de la membrana celular no se veía afectada por el cloranfenicol, ya que como es sabido, este afecta toda la síntesis de proteína de la célula, incluyendo las proteínas que van a formar parte

de la pared celular y membrana citoplasmática. Como control de estos experimentos, se realizaron estudios cinéticos de consumo de sustrato, utilizando como catalizadores células cultivadas por el tiempo establecido (6 h) sin la presencia del cloranfenicol en el medio de incubación ni en el sistema reaccionante.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### CAPÍTULO V

#### 5.1 OBTENCIÓN DE CULTIVOS PUROS E IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS SELECCIONADAS.

Después del tratamiento de las muestras colectadas de acuerdo a lo descrito en metodología para este punto, se obtuvieron cultivos perfectamente puros<sup>6</sup>. En esta etapa se obtuvieron mas de treinta cepas diferentes, tanto bacterias, levaduras y hongos, lo cuál fue determinado por el tipo de crecimiento que presentaron en el medio utilizado; aunque el cultivo predominante era bacteriano ya que los hongos generalmente tienen un desarrollo mas lento que las bacterias y cuando llegan a coexistir, el desarrollo de estas sobrepasa al de los hongos<sup>6</sup>.

El cultivo de las colonias bacterianas seleccionadas en el medio sólido indicado dio como resultado el aislamiento de únicamente seis cepas. Posteriormente se seleccionaron dos cepas que presentaban un excelente desarrollo en el medio sólido en el cuál se había aumentado la cantidad de ácido L-aspartico hasta 0.1%. Esto fue realizado basándonos en que el ácido L-aspartico es utilizado como inductor en el medio y por lo tanto, para que pueda ser utilizado por la célula, esta debe sobreproducir la enzima aspartatoamoníacoliase<sup>63.83.94.148</sup>.

Después de aproximadamente 150 resiembras de las dos cepas en el medio sólido bajo diferentes concentraciones de ácido L-aspartico, se obtuvieron los resultados que se expresan en la tabla 1; de acuerdo a los cuáles, las cepas que presentan un excelente desarrollo a las 24h de incubación indican que en ellas se estimula la ruta metabólica de formación de la aspartatoamoníacoliase con esta cantidad de inductor lo que les permite adaptarse al medio de cultivo y desarrollarse. Con base en estos datos, se estableció como medio de cultivo sólido

base el siguiente (%): NaCl-0.1, KCl-0.1, peptona 1.0, extracto de levadura 0.5, agar bacteriológico-2.0 y ácido L-aspártico-0.1.

### **5.1.1 Identificación de los microorganismos seleccionados**

La clasificación de los microorganismos en grampositivos y gramnegativos establecida por la reacción de las células bacterianas a la tinción de Gram<sup>43,67</sup>. Los resultados de la tinción diferencial por el método de Gram, se muestran en la tabla No.2. Los resultados de las pruebas bioquímicas para las dos cepas seleccionadas, los cuáles fueron comprobados por la ATCC, se expresan en la tabla 3.



**Tabla 1.**

**Resultados del cultivo de dos cepas bacterianas desarrolladas en medio sólido que contenía (%): NaCl-0.1; KCl-0.1, peptona-1.0, extracto de levadura-0.5, agar-2.0 y diferentes cantidades de ácido L-aspártico. Condiciones de incubación: temperatura: 30-32°C, tiempo de incubación: 24-48 hrs.**

Cepas	Acido L-aspártico, %				
	0.0	0.05	0.1	0.2	0.3
I	+++	++-	+++	+-	---
II	+++	++-	+++	---	---

+++ Excelente desarrollo a las 24 hrs.

--- No hubo desarrollo en 24 ni 48 hrs.

+- Desarrollo regular en 48 hrs.

**Tabla 2.**

**Resultados de la identificación por tinción de Gram, de los microorganismos seleccionados.**

Cepa	Morfología colonial	Morfología celular
I	Colonias opacas, irregulares, con márgenes lobulados, elevadas, de superficie rugosa.	Bacilos rectos, grampositivos o gram variables. Las células se encuentran raras veces en forma aislada y con mas frecuencia formando cadenas cortas con una endospora formada en la región central o subterminal.
II	Colonias enteras, brillantes, circulares, lisas, transparentes.	Bacilos pequeños gramnegativos. Las células se encuentran generalmente en forma aislada.

**Tabla 3.**

**Resultados del estudio sobre la identificación de las cepas seleccionadas mediante sus características bioquímicas.**

<b>Prueba bioquímica</b>	<b>Cepa I (Bac. Gram +)</b>	<b>Cepa II (Bac. Gram -)</b>
Voges Proskauer	+	+
Utilización de citrato	+	+
Indol	-	-
Rojo de metilo		-
Hidrólisis de almidón	+	
Descomposición de caseína	+	
Descomposición de tirosina	+	
Acido a partir de glucosa	+	
Ácido a partir de arabinosa	-	
Ácido a partir de manitol	-	
Reacción yema de huevo	+	
Lisina		-
Arginina		+
Ornitina		+
KCN		+
Malonato		+
Celobiosa		+

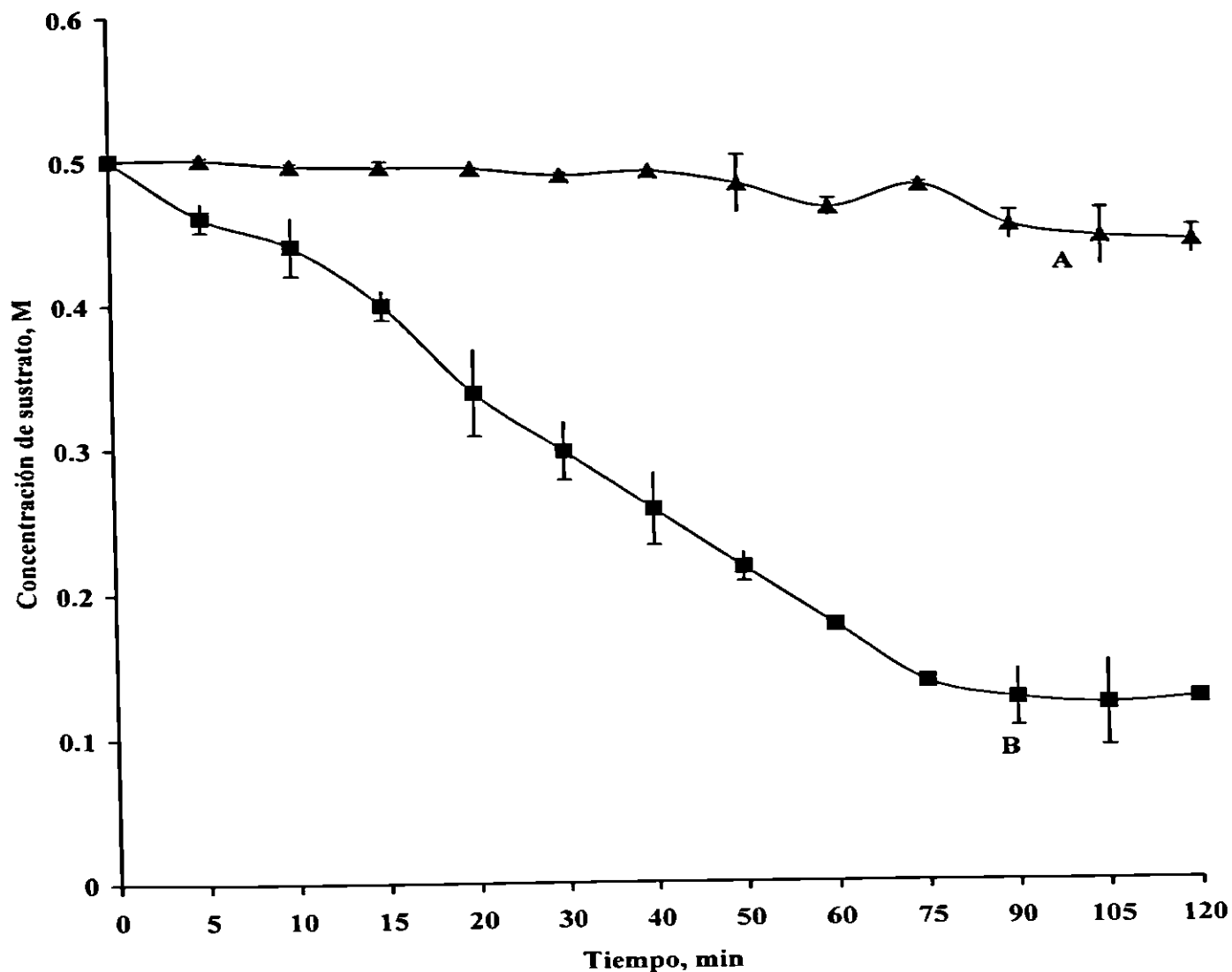
Una vez realizados estos estudios, se procedió a consultar libros de referencia que contienen las descripciones de las especies microbianas<sup>14,20</sup> y los resultados finales de la identificación fueron los siguientes:

**Cepa I - identificada como *Bacillus cereus***

**Cepa II - identificada como *Enterobacter cloacae***

## 5.2 COMPROBACIÓN DEL DESARROLLO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA ASPARTATOAMONÍACOLIASA EN CÉLULAS DE *B. cereus* y *E. cloacae*.

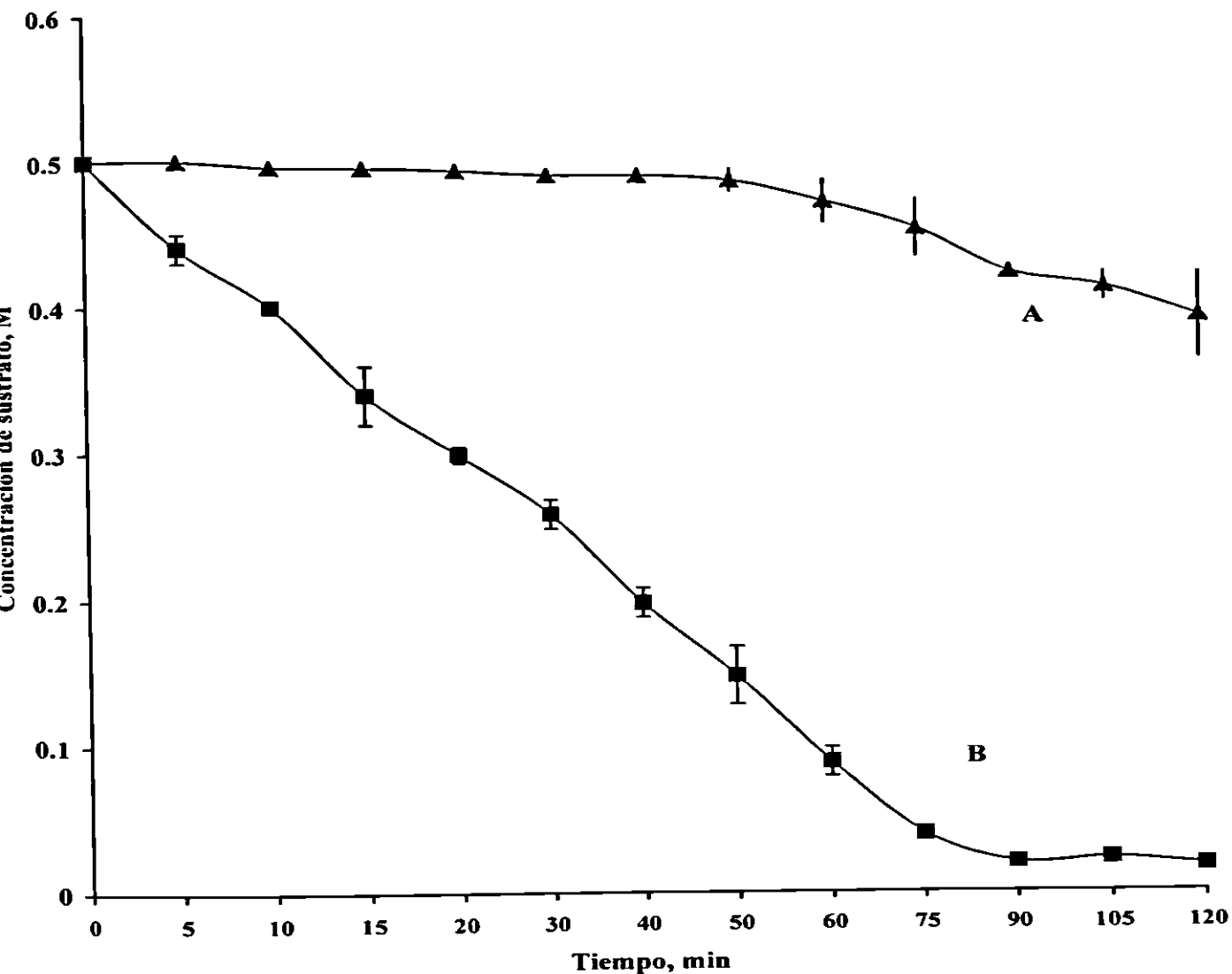
Los resultados de los estudios cinéticos de consumo de sustrato, fumarato de amonio para comprobar la actividad enzimática desarrollada en los biocatalizadores diseñados, se muestran en las Fig.1 y 2 para *B. cereus* y *E. cloacae* respectivamente. En ambas figuras se observa que a medida que transcurre el tiempo de reacción, hay un cambio en la concentración de sustrato; en la Fig.1, las velocidades iniciales de la reacción, calculadas como la tangente del ángulo de desviación en la gráfica de  $[S]=f(t)$ , tienen los siguientes valores: para la curva A, que corresponde a la reacción catalizada por células que fueron propagadas en medio de cultivo sin inductor, es de  $2.56 \times 10^{-4}$  mmoles/ml.min y para la curva B, que corresponde a la reacción catalizada por células de *B. cereus* cultivadas en un medio con inductor,  $4.98 \times 10^{-3}$  mmoles/ml.min. En la Fig.2 que corresponde a la reacción catalizada por células de *E. cloacae*, la curva A representa la reacción catalizada por células cultivadas sin inductor en el medio y la B para la reacción catalizada por células cultivadas en un medio con inductor. La velocidad inicial es de  $2.0 \times 10^{-4}$  mmoles/ml.min y  $4.16 \times 10^{-3}$  mmoles/ml.min respectivamente. De acuerdo a los datos obtenidos de estas gráficas, la actividad aspartasa basal para células de *B. cereus* fue de 15.36 U, considerando como Unidad de actividad aspartasa, la cantidad de micromoles de sustrato que es transformado en ácido L-aspartico por miligramo de proteína cada hora. (Fig.1A) y de 300U(Fig.1B) y para *E. cloacae* de 12 U la actividad basal (Fig.2 A) y de 240 U. (Fig.2B) en presencia del inductor. La relación de inducción (RI), (cociente de actividad enzimática inducida y basal) para la aspartasa de *B. cereus* fue de 19 y para la de *E. cloacae* fue de 20.



**Fig. 1**

**Cinética del consumo de sustrato, fumarato de amonio, en la reacción aspartasa catalizada por células de *Bacillus cereus* cultivadas en presencia (B) y en ausencia (A) de inductor.**

**Condiciones de reacción: Fumarato de amonio-0.5M, pH 8.0, T 37°C, tolueno 1%, MgCl<sub>2</sub>, proteína celular-1.0 mg/ml.**



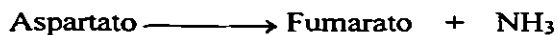
**Fig. 2**  
**Cinética de consumo de sustrato, fumarato de amonio en la reacción aspartasa catalizada por células de *Enterobacter cloacae* cultivadas en presencia (B) y en ausencia (A) de inductor.**  
**Condiciones de reacción: Ver Fig. 1**

### **5.2.1. Estrategia bioquímica para la sobreproducción de la enzima aspartatoamoníacoliase en células de microorganismos.**

En el diseño de biocatalizadores basados en células de microorganismos, los flujos metabólicos son la clave para comprender las regulaciones metabólicas; por ello, es necesario conocer la ruta que siguen en el interior de la célula, cada una de las sustancias que componen los medios de cultivo en que son propagados los microorganismos y que son utilizados por estos como nutrientes<sup>4</sup>.

En el presente trabajo, el ácido L-aspartico que es añadido al medio de cultivo, puede ser utilizado inmediatamente por las células. Esto se relaciona con el hecho de que los microorganismos pueden emplear no solamente un tipo de fuente de carbono, nitrógeno u otra sustancia, sino varios. Si por ejemplo, en el medio existe una mezcla de diferentes sustancias, las células utilizarán en primer lugar aquéllas que son más accesibles; es decir, un aminoácido en lugar de amoníaco, y esto se fundamenta en que el aminoácido puede introducirse directamente en el metabolismo microbiano y en las células se cierra el proceso de síntesis de las enzimas (represión) que catalizan la formación de aminoácidos a partir del amoníaco<sup>42</sup>. Ya en el interior de la célula, el ácido L-aspartico puede ser utilizado por el metabolismo constructivo o ser sometido a reacciones catabólicas y servir como fuente de carbono y energía. Algunos aminoácidos, incluyendo el ácido L-aspartico, están tan estructuralmente relacionados con los productos intermedios del metabolismo celular, que su disociación se realiza en forma bastante sencilla. De esta manera, conociendo el tipo de reacciones al que pueden ser sometidos los aminoácidos en las células microbianas, podemos deducir que el ácido aspártico que es añadido al medio de cultivo en calidad de inductor para que el microorganismo sobreproduzca la enzima aspartasa, se cataboliza mediante una desaminación directa y de esta manera puede incorporarse al ciclo de los ácidos tricarboxílicos como

fumarato, participando en la formación de energía que la célula utilizará posteriormente<sup>60</sup>.



Esta ruta de entrada del ácido L-aspártico al metabolismo celular, no es característica de todos los microorganismos ya que generalmente es transformado inicialmente en oxalacetato; sin embargo muchas bacterias, principalmente, pueden incorporar el aspartato a su metabolismo por la vía mencionada.

Existen diversos trabajos sobre análisis de flujos metabólicos<sup>4</sup>; sin embargo, es un tema abierto a la investigación ya que no ha sido explicada en forma concluyente la relación que hay entre los flujos metabólicos y la regulación de las enzimas, ya que esto último, en nuestro caso particular, depende relativamente, de la cantidad de inductor, de su transportación al interior de las células, de la necesidad de energía en un momento determinado, de la degradación y acumulación de la enzima, etc.

### **5.2.2 Identificación del producto de reacción:**

Los resultados del cromatograma se presentan en la Fig.3; de acuerdo a ellos, podemos concluir que el producto de la reacción aspartasa es realmente el ácido L-aspártico ya que su posición en el cromatograma (Rf), concuerda exactamente con la posición de la mancha del ácido L-aspártico de grado analítico y además, se aprecia la misma posición de este aminoácido en la mezcla de los aminoácidos colocados en la placa.

Como se había mencionado, el método de ninhidrina es general para todos los aminoácidos, así que la identificación final del ácido L-aspártico obtenido se realizó por cromatografía de líquidos (HPLC) Fig.4. En este cromatograma podemos observar otro pico de respuesta, que de acuerdo al tipo de reacción, es un producto secundario que correspondería al ácido málico.



**Fig. 3**  
**Cromatograma para la identificación del producto de la reacción aspartatoamoníacoliase. 1- control (aminoácido L-aspártico de grado analítico), 2 – mezcla de aminoácidos: histidina, lisina, ácido L-aspártico (producto de reacción), tirosina y triptofano, 3 – producto de la reacción aspartatoamoníacoliase (ácido L-aspártico).**

**Fase móvil: ácido acético-butanol-agua (1:1:1)**

**Fase fija: sílica gel**

**Revelador: ninhidrina**



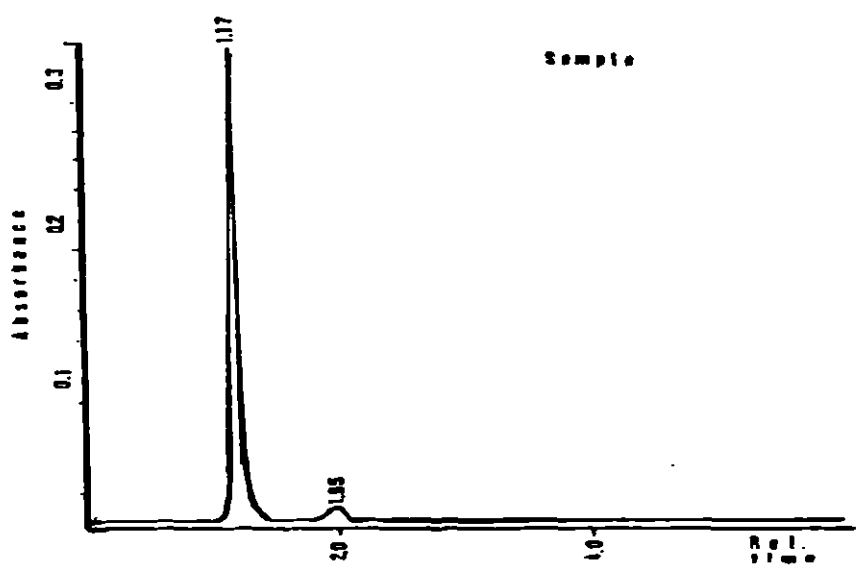
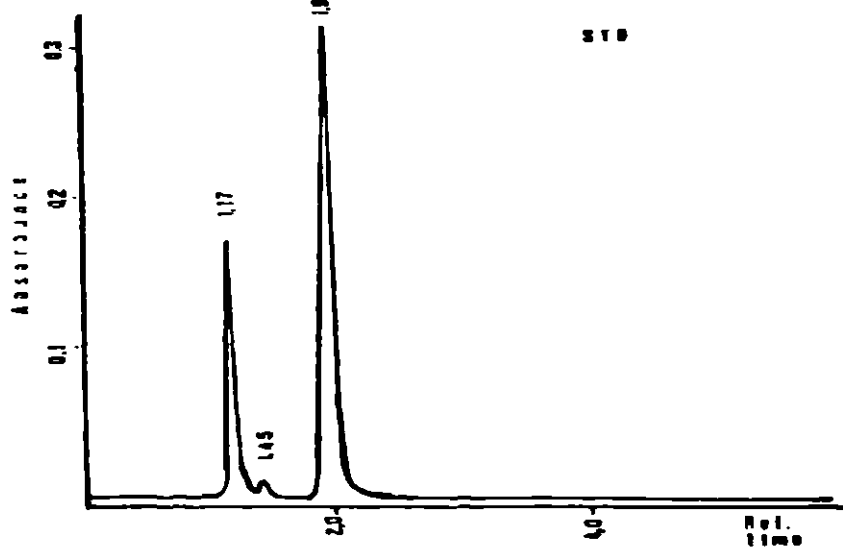


Fig. 4  
 Cromatograma de identificación del ácido  
 L-aspártico por HPLC

### 5.3 SELECCIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO LÍQUIDO PARA LA PROPAGACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS CON ACTIVIDAD ASPARTATOAMONÍACOLIASA

Los resultados de esta serie de experimentos se muestran en forma resumida en la Tabla 4. El análisis de los resultados expresados en la tabla No.4, nos indica que las células de *B. cereus* desarrolladas en el medio IV, expresan una actividad enzimática aspartatoamoníacoliasa, superior a la que expresan cuando se desarrollan en los demás medios utilizados. Resulta interesante destacar que en este medio de cultivo, el caldo de Hottinger fue sustituido por caldo nutritivo que es un medio estandarizado que permite el crecimiento de un gran número de microorganismos

La mayor acumulación de biomasa, se observa también en el medio IV, aunque es solo un 14% mas en comparación con el medio III; sin embargo, la velocidad inicial de la reacción es mayor en un 83% cuando se emplean como catalizadores las células desarrolladas en el medio IV que en el medio III.

En la literatura<sup>114</sup> se tienen datos sobre el aumento de la actividad aspartasa en células de *E. coli* B<sup>93</sup>, *A. aerogenes*<sup>121</sup> y *Ps. fluorescens*<sup>71</sup> en presencia de ácido L-aspartico. En nuestros experimentos, los medios III,IV y V, contienen el ácido L-aspartico en el medio de propagación; sin embargo, podemos observar en la tabla de resultados, que aún cuando no existe una variación muy notable en la concentración de proteína celular, la diferencia es definitiva tanto en la velocidad de la reacción como en la expresión de la actividad enzimática de las células de *B. cereus* desarrolladas en el medio IV.

Los medios I y V, tiene en común únicamente el caldo de Hottinger; la cantidad de proteína celular determinada para *B. cereus* desarrollada en el medio V, es el doble de la cantidad de proteína de las células desarrolladas en el medio I; si observamos los valores de

la velocidad inicial de la reacción catalizada por estas células, son también el doble. Esto nos indica que las células desarrolladas en el medio V duplican la formación de la enzima aspartasa en comparación con la que forman al desarrollarse en el medio I. Esto se refleja únicamente en la velocidad inicial de la reacción, como se observa en los resultados expuestos en la Tabla 4. Lógicamente, la actividad enzimática aspartatoamoníacoliase no tiene variación.

Cuándo la reacción aspartasa es catalizada por células de *B. cereus* desarrolladas en el medio II, que contiene glucosa entre sus componentes, tiene la velocidad inicial más baja, lo que al parecer está relacionado con una depresión de la aspartasa por la glucosa<sup>71</sup>. Puede suponerse de acuerdo a los datos de la literatura, que cuando las células utilizan a la glucosa como fuente de carbono, simultáneamente con la represión de la aspartasa ocurre, probablemente, la inducción de otra enzima, la glutamatodeshidrogenasa que cataliza la inclusión inicial del amoníaco en los aminoácidos. Es probable, que este mecanismo de regulación ocurra también en las células de *B. cereus* desarrolladas en este medio II, ya que los resultados obtenidos apuntan hacia esta explicación.

De esta manera, fue seleccionado el medio IV como el mas adecuado para la propagación de las células de *B. cereus* con actividad aspartatoamoníacoliase.

**Tabla 4**

**Comparación de la actividad enzimática aspartatoamoníacoliase de células de *B. cereus* desarrolladas en diferentes medios de cultivo líquido.**

<b>Medio líquido</b>	<b>Conc.proteína mg/ml</b>	<b>Vel.inic.10<sup>3</sup> mmoles/ml.min</b>	<b>Unidades de Actividad aspartasa</b>
I	0.435	1.74	240
II	0.775	1.08	83.6
III	1.12	1.66	89
IV	1.3	9.06	443
V	0.954	3.96	249

#### **5.4 DETERMINACIÓN DEL TIEMPO ÓPTIMO DE INCUBACIÓN DE CÉLULAS DE *B. cereus* Y *E. cloacae* DONDE PRESENTAN UNA MÁXIMA EXPRESIÓN DE LA ACTIVIDAD ASPARTATOAMONÍACOLIASA.**

Los resultados del estudio sobre la determinación del tiempo óptimo de incubación para células de *B. cereus*, se resumen en la Tabla 5 y se expresan gráficamente en la Figura 5 y para *E. cloacae*, se resumen en la Tabla 6 y gráficamente se presentan en la Figura 6.

El análisis de los resultados presentados en la Tabla 5, nos indica que el tiempo de incubación en el que las células de *B. cereus* reflejan un valor máximo de la actividad aspartatoamoníacoliase es de 6 h en el medio de cultivo líquido utilizado para su propagación. A las 8 h se observa que la velocidad inicial de la reacción, tiene un valor de  $9.0 \times 10^{-3}$  mmoles/ml.min el cuál es muy parecido a la velocidad inicial de la reacción a las 6 h de incubación,  $8.76 \times 10^{-3}$  mmoles/ml.min; pero la cantidad de proteína celular total es un poco mas a las 8 h, lo que explicaría que el valor de la velocidad inicial de la reacción a este tiempo de incubación, es un poco mas alto.

Al aumentar la edad del cultivo, la concentración de proteína permanece constante desde las 8 hasta las 12 horas de incubación (1.2 mg/ml), pero la velocidad inicial de la reacción y la actividad enzimática disminuyen sensiblemente. A las 10 h. de incubación, la velocidad inicial tiene un valor de  $4.98 \times 10^{-3}$  mmoles/ml.min y la actividad enzimática es de 250 Unidades ( $\mu$ moles/mg.h); de tal manera que la disminución es prácticamente un 50% de la que expresan las células a las 6 h de incubación.

En la Figura 5 se presenta la relación que existe entre el estado fisiológico en el que se encuentran las células de *B. cereus* y la fase de crecimiento en la que expresan la máxima actividad aspartasa. En el eje de las ordenadas, se expresa la actividad enzimática del biocatalizador y también la cantidad de biomasa expresada cuantitativamente como proteína

celular total y en el eje de las abscisas, el tiempo de incubación en horas. El análisis de estos datos nos indica que la enzima aspartatoamoníacoliase, es sobreproducida a las 6 horas de desarrollo de las células de *B. cereus*; es decir, al final de la fase logarítmica; posteriormente, al entrar a la fase estacionaria, esta actividad enzimática disminuye y es diferente aún en la misma fase de desarrollo del microorganismo. Lo anterior puede explicarse porque en esta fase estacionaria, el número de células permanece constante pero su fisiología es diferente en cada tiempo de incubación<sup>42</sup>. Para las células de *Bacillus cereus*, la fase lag o de adaptación de las células al medio de cultivo es muy corta, 1 hora, y a la segunda hora de incubación entra en fase logarítmica hasta las 7 horas en las que prácticamente se inicia la fase estacionaria. La fase de muerte celular empieza a las 13 horas de incubación.

El análisis de los resultados de la Tabla 6 nos muestra que a las 2, 4, 6 y 8 horas de incubación de *E. cloacae* bajo las condiciones mencionadas con anterioridad, no hay un aumento prácticamente de la concentración de proteína y por lo tanto, no se observa ningún cambio en la concentración del fumarato de amonio o sustrato. Al aumentar la edad del cultivo, aumenta también la concentración de proteína celular, determinada por el método de Peterson como se indica en el párrafo correspondiente, hasta que se alcanza un punto en la que permanece constante; esto ocurre a las 14 y 16 h. Al calcular los datos de velocidad inicial de la reacción, determinados por las tangentes de los ángulos de desviación en las gráficas de  $[S]=f(t)$ , vemos que de las 10 a las 12 h. de incubación, la velocidad inicial de la reacción catalizada por *E. cloacae*, aumenta en un 60%. A las 14 y 16 h. de incubación, aunque la cantidad de proteína celular total es la misma, los valores de la velocidad inicial de la reacción son diferentes, siendo mas alto a las 14 h ( $12.0 \times 10^{-3}$  mmoles/ml.min); aunque este valor solo es un 10% mayor que el obtenido cuando la reacción es catalizada por células con 12 h de incubación. Esto puede explicarse por el hecho de que aunque no se conozca la cantidad real

de la enzima aspartasa<sup>109</sup>, su presencia puede detectarse por el cambio en la concentración del sustrato utilizado en esta reacción en función del tiempo; así, en este caso y de acuerdo a los valores de la velocidad inicial, podemos considerar que la cantidad de la enzima aspartasa contenida en las células de *E. cloacae* bajo estos dos tiempos de incubación, es prácticamente la misma aun cuando la concentración de proteína sea mayor a las 14 h. que a las 12; lo cuál puede explicarse porque al aumentar la edad del cultivo, aumenta la cantidad de biomasa pero no necesariamente se forma mas enzima aspartasa<sup>114</sup> ya que la célula forma otras proteínas que están relacionadas con la fase de desarrollo en la que se encuentren<sup>5,145,161</sup>.

Si comparamos los valores de la actividad enzimática correspondiente a las células de *E. cloacae* con diferente edad de cultivo, observamos que las células con 12 h. de incubación, expresan la mayor actividad enzimática, 650 U. La determinación de la actividad enzimática de acuerdo a la técnica descrita en el párrafo correspondiente. involucra la velocidad inicial de la reacción y la cantidad de proteína celular total; de acuerdo a esto y a los valores obtenidos de los parámetros mencionados. observamos que aún cuando la velocidad inicial de la reacción sea mas alta a las 14 h. al determinar la actividad enzimática, este valor se dividirá entre la cantidad total de proteína y debido a que en este tiempo de incubación, esta es 50% más que a las 12 h., el valor de la actividad enzimática disminuye prácticamente un 30% del que las células expresan a las 12 h. Aunque los datos de la cantidad de proteína en estos dos puntos nos indican que a las 12 h es de 1 mg/ml y a las 14h es de 1.5 mg/ml, la diferencia corresponde a proteína celular que no es la enzima que cataliza esta reacción, ya que de ser así, los valores de la velocidad inicial de la reacción en estos dos puntos, fueran muy diferentes y como ya se mencionó, solo hay un 10% de diferencia entre ellos. A las 16 horas de incubación, el microorganismo se encuentra todavía en fase estacionaria pero la actividad enzimática que es de nuestro particular interés, ha disminuído en un 40% de la expresada en el

tiempo óptimo, 12 h. Por lo tanto, estos resultados nos llevaron a proponer como tiempo óptimo de incubación para células de *E. cloacae* con actividad aspartatoamoníacoliase, el de 12 h. en el medio líquido bajo las condiciones mencionadas.

En la Fig.6, se expresan los resultados sobre el estudio de tiempo de incubación en el que las células de *E. cloacae*, muestran la máxima actividad enzimática aspartatoamoníacoliase en correspondencia con el estudio cinético de crecimiento microbiano. De acuerdo a estas gráficas, el valor máximo de actividad enzimática se alcanza cuándo las células se encuentran al final de la fase logarítmica o principios de la fase estacionaria, con un tiempo de incubación de 12 h. Para *E. cloacae*, la fase lag es mas larga, hasta 7 h; a las 8 h entra en la fase logarítmica la cuál dura 4 h. La fase estacionaria se inicia a las 13 h y continúa todavía a las 16 h.

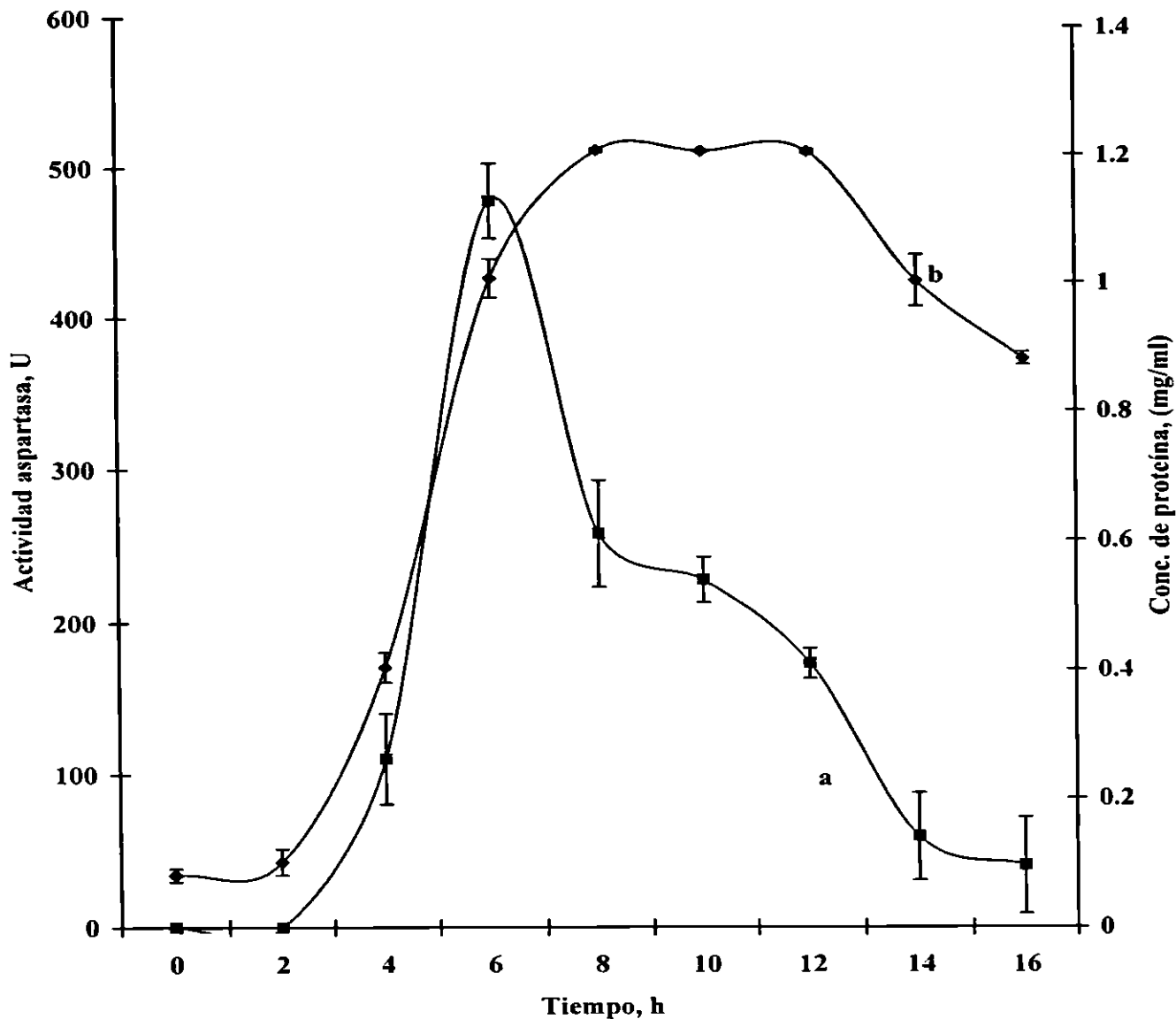


**Tabla 5.**

**Resultados sobre el estudio de determinación del tiempo óptimo de incubación de células de *B. cereus* en el que exhiben un valor máximo de la actividad enzimática aspartatoamoníacoliasa.**

<b>Tiempo de incubación, (h)</b>	<b>Conc. de proteína<sup>a</sup> mg/ml</b>	<b>Vel.inic.10<sup>3</sup> mmoles/ml.min</b>	<b>Unidades de actividad aspartasa<sup>a</sup></b>
0	0.08 ± 0.01	0	0
2	0.1 ± 0.02	0	0
4	0.4 ± 0.023	0.74	111 ± 30
6	1.0 ± 0.03	8.76	525 ± 25
8	1.2 ± 0.003	9.0	450 ± 35
10	1.2 ± 0.002	4.98	249 ± 15
12	1.2 ± 0.035	3.36	168 ± 10
14	1.0 ± 0.04	2.34	140 ± 29
16	0.88 ± 0.01	1.32	90 ± 32

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



**Fig.5**

**Efecto del tiempo de incubación de *B. cereus* sobre la expresión de su actividad aspartasa (a) en la reacción de síntesis del ácido L-aspartico y definición de la fase de crecimiento celular en la que se presenta la máxima actividad enzimática (b).**

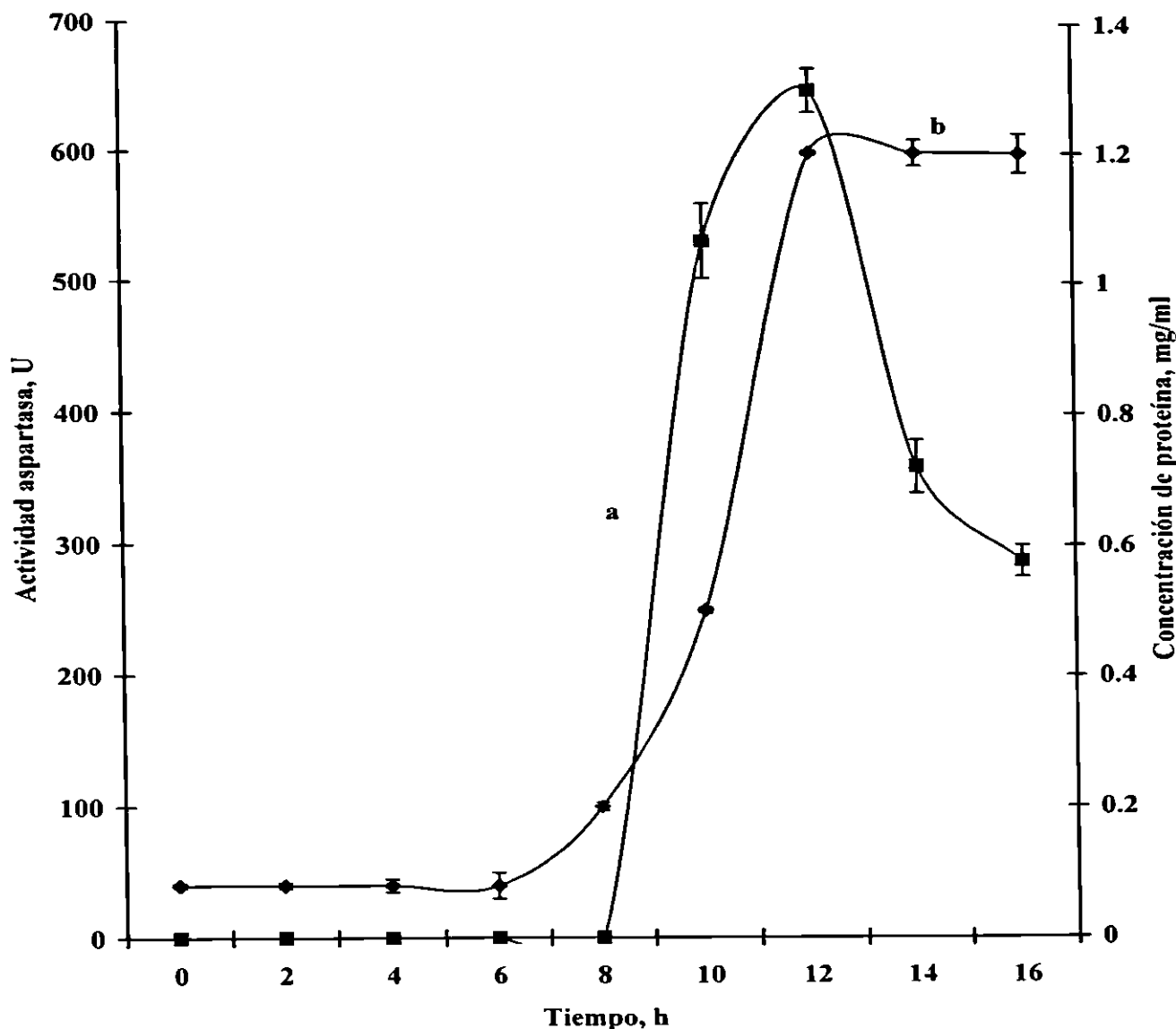
**Condiciones de reacción: fumarato de amonio - 0.5M, pH 8.0, T 37°C, tolueno 1%, MgCl<sub>2</sub> 0.1%.**

**Tabla 6**

**Resultados del estudio sobre la determinación del tiempo óptimo de incubación para células de *E. cloacae* donde reflejen su máxima actividad aspartatoamoníacoliasa.**

<b>Tiempo de incubación (h)</b>	<b>Conc. proteína<sup>a</sup> mg/ml</b>	<b>Vel.inic.10<sup>3</sup> mmoles/ml.min</b>	<b>Unidades de actividad aspartasa<sup>a</sup></b>
0	0.08 ± 0.003	0	0
2	0.08 ± 0.005	0	0
4	0.08 ± 0.01	0	0
6	0.08 ± 0.02	0	0
8	0.2 ± 0.006	0	0
10	0.5 ± 0.004	4.44	533 ± 29
12	1.0 ± 0.003	10.8	650 ± 17
14	1.5 ± 0.02	12.0	480 ± 20
16	1.5 ± 0.03	9.6	384 ± 12

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



**Fig. 6**  
**Efecto del tiempo de incubación de células de *Enterobacter cloacae* sobre la expresión de su actividad enzimática aspartasa (a) y definición de la fase de crecimiento en la que se expresa la máxima actividad enzimática.**  
**Condiciones de reacción: Fumarato de amonio- 0.5M, pH 8.0, T 37°C, tolueno 1%, MgCl<sub>2</sub> 0.1%**

## **5.5 ESTUDIO SOBRE LA INFLUENCIA DE CADA UNO DE LOS COMPONENTES DEL MEDIO DE CULTIVO LÍQUIDO SELECCIONADO, SOBRE LA EXPRESIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA ASPARTASA, DE CÉLULAS DE *B. cereus*.**

Los resultados de estos estudios, se muestran en las Tablas 7, 8, 9 y en las Figuras 7, 8 y 9. El análisis de los resultados expresados tanto en la Tabla 7 como en la Fig. 7, nos indica que al aumentar la concentración de caldo nutritivo en el medio de propagación, aumenta también la proteína celular desarrollada; esto es, que el desarrollo de la biomasa está limitado por la cantidad de caldo nutritivo agregada al medio líquido. Los postulados fundamentales de la teoría de crecimiento de un cultivo microbiano, fueron formulados para las condiciones en que la velocidad de crecimiento del cultivo esté determinada por la concentración limitante de un de los componentes del medio<sup>56.57.67.116</sup>. De esta manera, la limitación desde el principio fue ubicada como una de las condiciones necesarias en el fundamento de la teoría del cultivo dirigido de los microorganismos y fue analizada como un fenómeno que se expresa en que la velocidad de crecimiento disminuye simultáneamente con la disminución de la concentración de dicho componente en el medio de cultivo en el que se encuentra al mínimo.

Los datos sobre la velocidad inicial de la reacción, la cuál tiene una relación directa con la cantidad de enzima aspartasa presente, muestran que al aumentar la cantidad de caldo nutritivo en el medio, hay un aumento gradual de la velocidad inicial pero llega a un punto máximo y luego decae hasta un 40%; esto significa que aun cuando la biomasa celular aumente, el estado fisiológico de las células es diferente, dependiendo de la concentración de caldo nutritivo utilizada y por lo tanto, de la disponibilidad de sustrato nutritivo presente; además, la formación de la enzima aspartatoamoniacoliasa, no es proporcional a la cantidad de biomasa producida.

Así, la determinación cuantitativa de la actividad enzimática de las células de *B. cereus* alcanza un valor máximo (828 U), cuando las células se propagan en un medio que contenga caldo nutritivo en una cantidad de 0.8% .

El análisis de los datos expresados en la Tabla 8 y en la Fig. 8, nos muestra que la peptona como componente del medio de propagación, no tiene una influencia significativa sobre la formación de biomasa microbiana, la cuál está reflejada en el contenido de proteína celular; probablemente este hecho esté relacionado con que el caldo nutritivo que se utiliza también en este medio, contiene peptona que puede ser de un origen diferente al que se utiliza para este estudio y que tenga la propiedad de ser más fácilmente asimilable y permitir más rápidamente el crecimiento bacteriano, ya que esta es una característica particular entre las peptonas de diferentes tipos (dependiendo de la proteína utilizada: carne, caseína o gelatina y el método de digestión)<sup>110</sup>. Lo anterior no significa que en su totalidad, la peptona de caseína empleada para este estudio, no sea utilizada por las células de *B. cereus* ya que si analizamos los valores de la velocidad inicial para esta reacción, observamos que aumentan gradualmente al aumentar la cantidad de peptona en el medio de cultivo; llega a un valor máximo y luego disminuye; así que las características fisiológicas de las células si varían, porque la cantidad de enzima aspartasa formada es diferente para cada concentración de peptona utilizada, lo cual se refleja directamente en los valores de la velocidad inicial de la reacción.

La cuantificación de la actividad aspartatoamoníacoliase de las células de *B. cereus*, presenta un cuadro parecido al de la velocidad inicial; aumenta conforme aumenta la concentración de peptona en el medio de cultivo, llega a un máximo y posteriormente disminuye. De acuerdo a los datos de la Tabla 8, se definió como la concentración óptima de peptona agregada al medio de propagación de *B. cereus* la de 0.3%; la cuál le permite al microorganismo expresar en forma máxima la actividad enzimática aspartatoamoníacoliase.

En los resultados expresados en la Tabla 9 y en la Fig.9, podemos observar que el extracto de levadura añadido al medio de propagación para *B. cereus*, no es un factor limitante para el crecimiento del microorganismo ya que no existe variación en la cantidad de biomasa formada, expresada como la concentración de proteína celular. Es importante mencionar, que el extracto de levadura es utilizado como componente de los medios nutritivos para que tenga lugar un desarrollo normal del microorganismo; pertenece al grupo de sustancias llamadas "factores de crecimiento", las cuáles tienen un papel importante en la regulación y estimulación del metabolismo microbiano<sup>116</sup>; tienen para los microorganismos el mismo significado que las vitaminas para los organismos superiores. En este caso particular, el término de "crecimiento", no está relacionado con el aumento de la población celular. El análisis de los datos de velocidad inicial de la reacción aspartasa catalizada por las células de *B. cereus* que se desarrollan en los medio con diferentes concentraciones de levadura, nos conduce a establecer que en ausencia total de extracto de levadura en el medio, la velocidad inicial de la reacción es muy baja, lo mismo que la actividad enzimática (casi un 70% menos que la máxima expresada), pero que al aumentar el extracto de levadura en el medio, aumenta también estos, aunque no en forma gradual; de hecho, cuando se utiliza el extracto de levadura a concentración de 0.2 y 0.25%, observamos los mismos valores para los parámetros mencionados; posteriormente a concentraciones mas altas, estos disminuyen, lo que nos habla de que este componente si tiene un efecto sobre la formación de la enzima aspartasa en las células de *B. cereus*. Para fines prácticos, se eligió como cantidad óptima de extracto de levadura añadida al medio de cultivo líquido, la de 0.2%.

Los resultados de esta serie de experimentos presentados en las Tablas anteriores (7,8 y 9) nos indican la importancia del caldo nutritivo como componente del medio de propagación de las células de *B. cereus*, ya que su ausencia en este, se refleja en que se tiene el valor más

bajo de cantidad de proteína, de velocidad inicial de la reacción y también la actividad enzimática más baja, lo cual no ocurre cuando los otros dos componentes estudiados están ausentes, ya que en este caso, el caldo nutritivo está agregado al medio en un 0.8% y tanto la concentración de proteína como la velocidad inicial y la actividad enzimática aspartasa, tienen valores mas altos. Cuando hay una combinación de caldo nutritivo al 0.8%, peptona al 0.3% y extracto de levadura al 0.2%, se logra tener la mejor velocidad inicial de la reacción y la máxima expresión de la actividad enzimática aspartatoamoníacoliasa de las células de *B. cereus* desarrolladas en este medio.

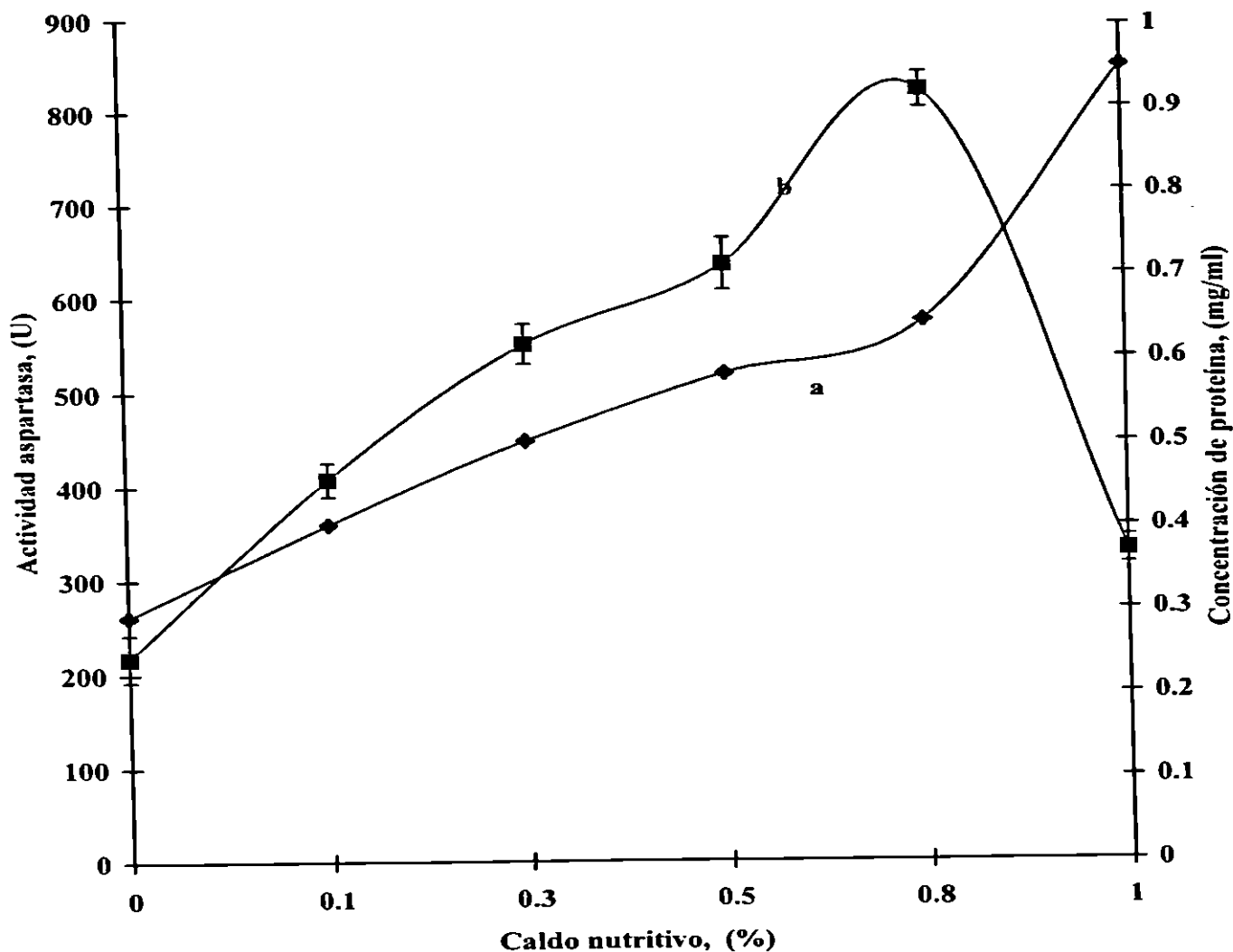


**Tabla 7**

**Resultados que expresan la influencia de la concentración de caldo nutritivo como componente del medio de propagación de las células de *B. cereus*, sobre la expresión de su actividad enzimática aspartatoamoníacoliasa.**

<b>Caldo nutritivo, (%)</b>	<b>Conc.proteína mg/ml</b>	<b>Vel.inic.10<sup>3</sup> mmoles/ml.min</b>	<b>Unidades de Actividad aspartasa<sup>a</sup></b>
0	0.290	1.05	217 ± 25
0.1	0.400	2.72	408 ± 18
0.3	0.500	4.61	553 ± 21
0.5	0.580	6.18	639 ± 28
0.8	0.643	8.88	828 ± 19
1.0	0.950	5.28	333 ± 15

<sup>a</sup> Media, ± Desviación estándar; n=6



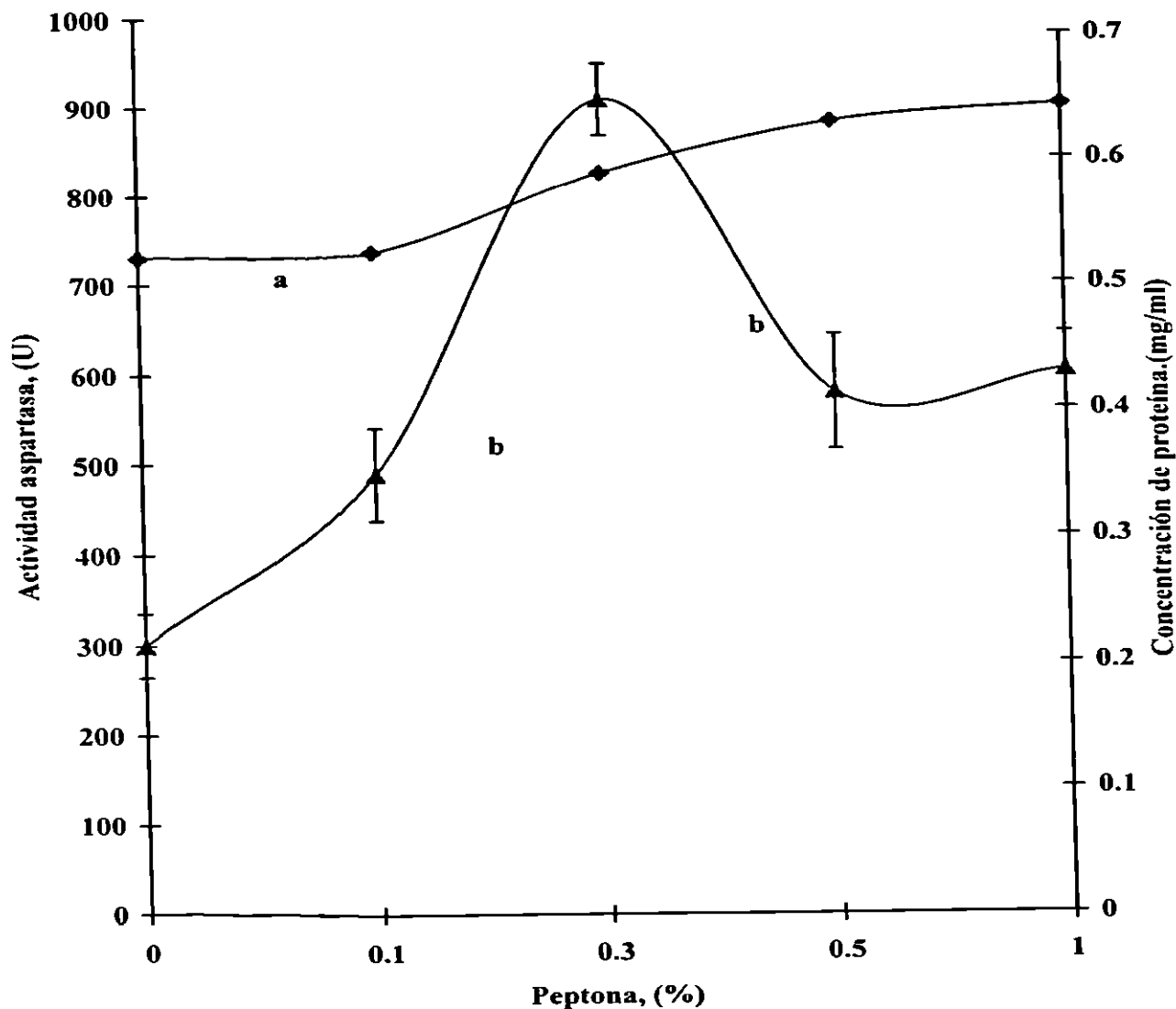
**Fig.7**  
**Efecto de la concentración de caldo nutritivo en el desarrollo de *B. cereus*, cuantificado como proteína celular (a), y en la expresión de su actividad aspartasa (b) en la biotransformación de ácido fumárico en ácido L-aspartico.**  
**Condiciones de reacción: Fumarato de amonio-0.5M, pH 8.0, T 37°C, tolueno 0.8%, MgCl<sub>2</sub> 0.1%.**

**Tabla 8**

**Resultados sobre el estudio de la influencia de la concentración de peptona como componente del medio de propagación de células de *B. cereus*, sobre la expresión de su actividad aspartatoamoniaco-liasa.**

<b>Peptona, (%)</b>	<b>Conc.proteína Mg/ml</b>	<b>Vel.inic.10<sup>3</sup> Mmoles/ml.min</b>	<b>Unidades de Actividad aspartasa<sup>a</sup></b>
0	0.511	2.64	309 ± 35
0.1	0.522	4.32	496 ± 52
0.3	0.586	9.0	921 ± 41
0.5	0.628	6.18	590 ± 65
1.0	0.643	6.6	615 ± 43

<sup>a</sup> Media, ± Desviación estándar; n=6



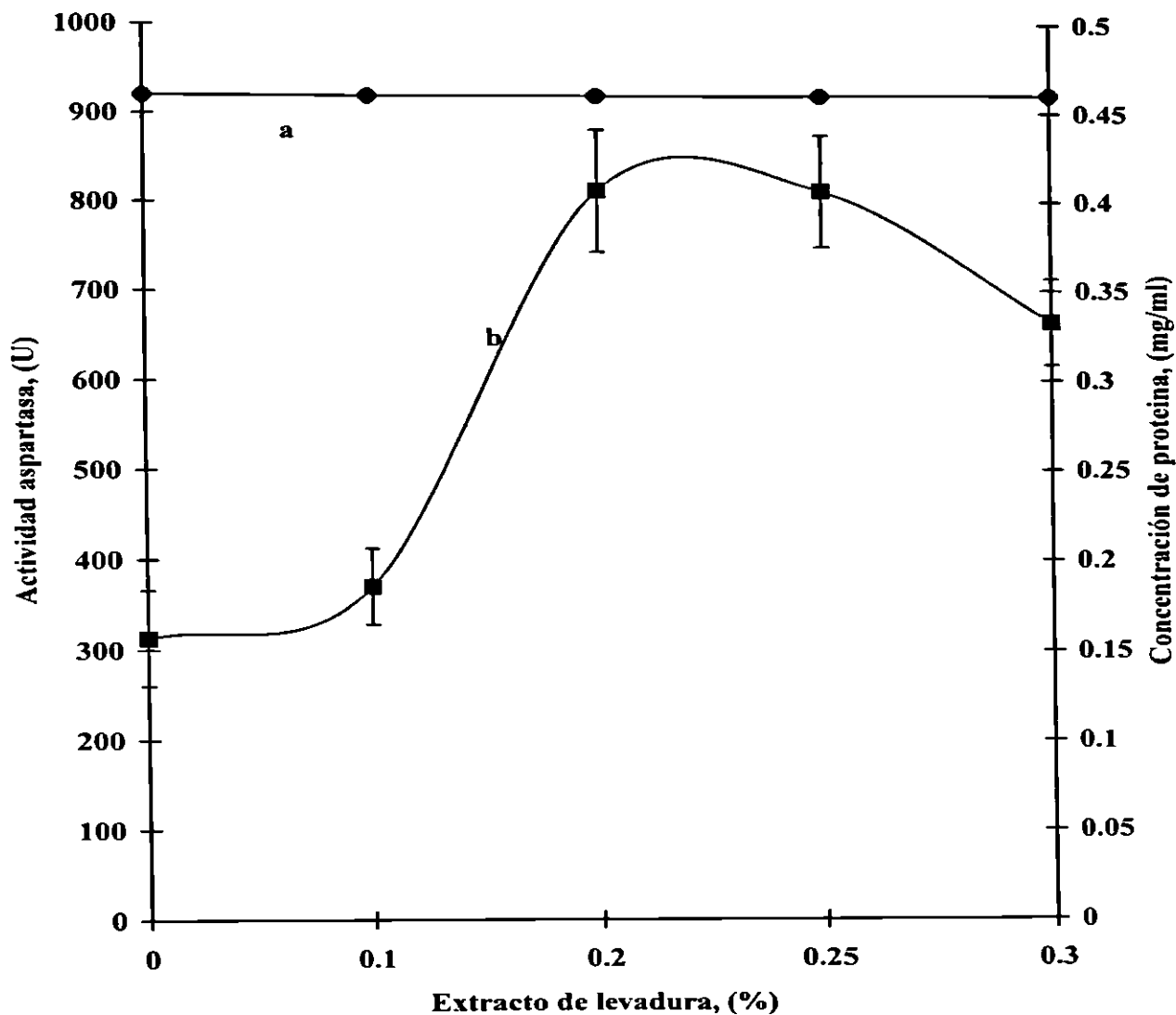
**Fig. 8**  
**Influencia de la concentración de peptona en el desarrollo de *Bacillus cereus* cuantificado como proteína celular (a) y en la expresión de su actividad aspartasa (b) en el proceso de biotransformación del ácido fumárico en ácido L-aspartico. Condiciones de reacción: Ver Fig. 8**

**Tabla 9**

**Resultados del estudio sobre la influencia del extracto de levadura, como componente del medio de propagación de células de *B. cereus*, sobre la expresión de su actividad aspartatoamoníacoliasa.**

<b>Extr. levadura (%)</b>	<b>Conc.proteína Mg/ml</b>	<b>Vel.inic.10<sup>3</sup> mmoles/ml.min</b>	<b>Unidades de Actividad aspartasa<sup>a</sup></b>
0	0.460	2.4	313 ± 53
0.1	0.460	2.85	371 ± 42
0.2	0.460	6.24	813 ± 69
0.25	0.460	6.24	813 ± 63
0.3	0.466	5.1	665 ± 48

<sup>a</sup> Media, ± Desviación estándar; n=6



**Fig. 9**  
**Influencia de la concentración de extracto de levadura en el desarrollo de *B.cereus*, cuantificado como proteína celular (a) y en la expresión de su actividad enzimática aspartasa (b), en la biotransformación de ácido fumárico en ácido L-aspartico. Condiciones de reacción: Ver Fig. 8**

## 5.6 INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE TOLUENO COMO PLASMOLIZADOR SOBRE LA VELOCIDAD INICIAL DE LA REACCIÓN ASPARTATOAMONÍACOLIASA CATALIZADA POR CÉLULAS DE *B. cereus* Y *E. cloacae*.

Los resultados de estos experimentos que tienen una repetición de 10 veces, se presentan en las Tablas 10 y 11 y en las Fig. 10 y 11.

El análisis de los datos obtenidos nos permitió establecer que debido a que la aspartasa es una enzima intracelular, cuando el tolueno no es añadido a la mezcla reaccionante o cuando es añadido en una concentración baja (0.1%), el problema del transporte del sustrato hacia el interior de la célula y la salida del producto de reacción se aprecia en forma muy notable, ya que no se observa ningún cambio en la velocidad inicial de la reacción catalizada por ambas células (Tablas 10 y 11). A medida que se aumentó la concentración de tolueno en la mezcla reaccionante, se observó una disminución gradual del período en el cuál el sustrato y el producto, se trasladan de un lado al otro de la pared celular y la membrana citoplasmática; dicho período, es conocido como de difusión. Desde una concentración de tolueno de 0.8% se logró eliminar prácticamente el período de difusión cuando se emplean células de *B. cereus* como biocatalizadores. Para la reacción catalizada por células de *E. cloacae*, se observa que el periodo de difusión desaparece desde que se utilizan concentraciones de 0.5% y más (2.5%) Los datos de la velocidad inicial de la reacción y la actividad enzimática (Tablas 10 y 11), nos sugieren que estos tienen el valor mas alto, cuando se utilizaron concentraciones de tolueno de 0.8% para *B. cereus* y 0.5% para *E. cloacae*. A concentraciones mayores estos valores van disminuyendo, lo cuál está relacionado al parecer con un deterioro mayor de la membrana ya que el tratamiento de las células con tolueno<sup>40</sup> permite la extracción de una gran cantidad de sustancias como proteínas, fosfolípidos, lipopolisacáridos, incluyendo algunas proteínas

citoplasmáticas específicas como la malatodeshidrogenasa. Este efecto es más significativo en ausencia de iones de magnesio; debido a ello, en el presente estudio, se añadieron iones de  $Mg^{2+}$  en forma de  $MgCl_2$ . Se ha establecido también que el tratamiento de las células microbianas con tolueno, no ocasiona un cambio que sea bastante notable en la estructura de la membrana externa pero que si hay un cambio muy brusco en la estructura de la membrana citoplasmática<sup>98</sup>; así, la separación de lipopolisacáridos de la membrana externa de la pared celular por acción del tolueno, puede conducir a un aumento notable de su permeabilidad sin cambio en la estructura; mientras que el cambio brusco en la membrana citoplasmática no necesariamente está relacionado con el aumento de su permeabilidad en relación con diferentes sustratos. Para el caso de la reacción catalizada por células de *E. cloacae*, desde una concentración de 1.5% y más, las células pierden viabilidad. Esto fue comprobado al terminar la reacción ya que se realizó un cultivo en medio sólido tomando como inóculo, las células empleadas en la reacción y no se observó desarrollo en 24 h de incubación a 30-32°C. La acción estabilizadora del magnesio sobre la pared celular, está relacionada con la formación de complejos metal-proteína, metal-lipopolisacárido que aumentan la resistencia de los enlaces de estas sustancias con la pared celular<sup>111</sup>.

La conclusión general que se puede hacer, basándose en el análisis de los datos obtenidos y en datos de literatura consiste en que el tratamiento de las células de *B. cereus* y de *E. cloacae* con tolueno en presencia de iones de  $Mg^{2+}$ , aumenta la permeabilidad, lo que está relacionado con la eliminación o separación de la pared celular y membrana celular, de cierta cantidad de lípidos, proteínas, fosfolípidos y lipopolisacáridos y que además, depende también de la concentración del tolueno utilizada. Evidentemente que se deben considerar las características propias de la pared celular de las bacterias gramnegativas como *E. cloacae*, y de las bacterias grampositivas como *B. cereus*, ya que aún y cuando el transporte de los



sustratos y productos de la reacción esta definido principalmente por la membrana citoplasmática, la pared celular tiene en este sentido una participación indirecta, lo cuál se ve reflejado en los resultados obtenidos.

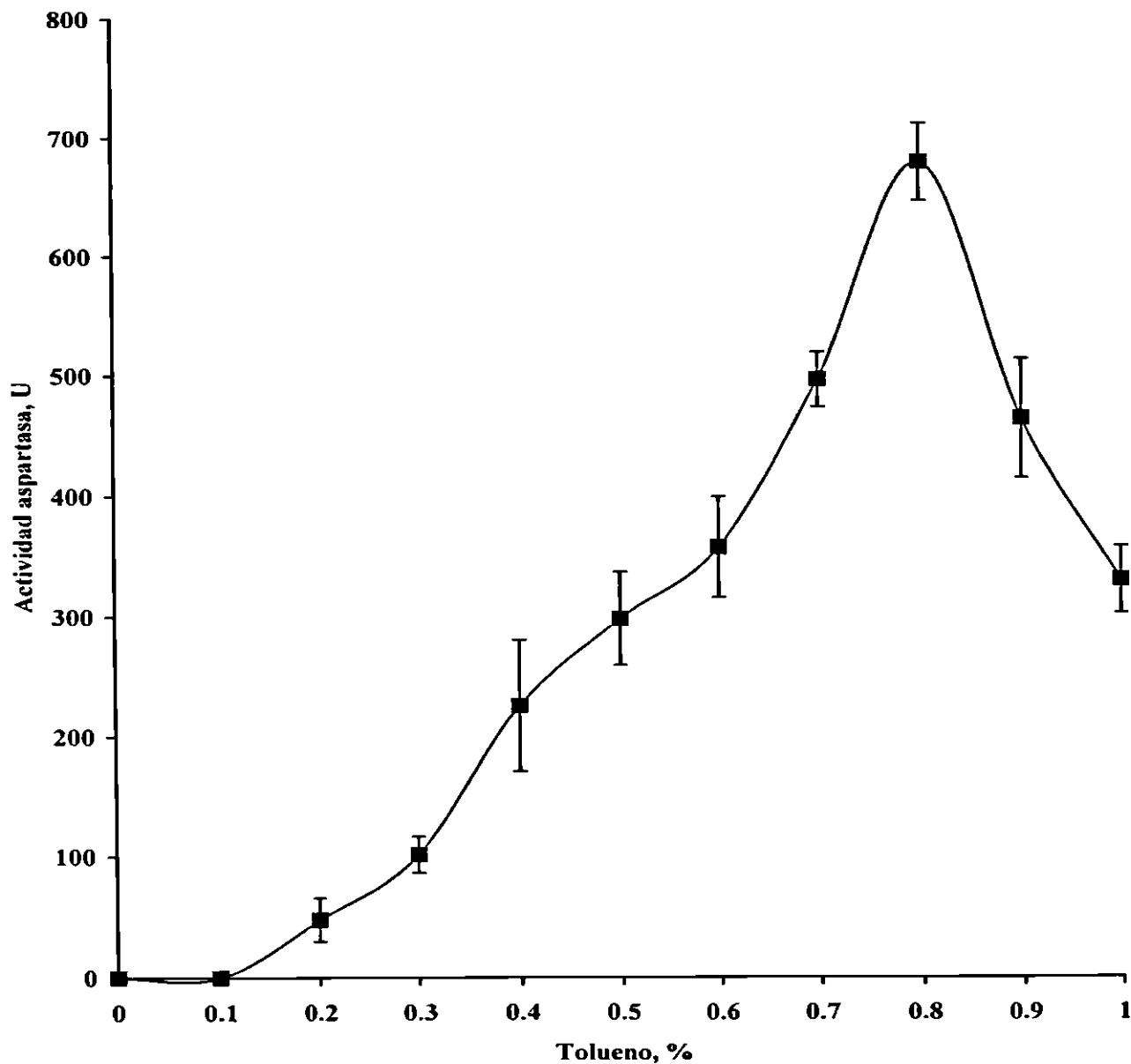
De esta manera, se estableció como concentración óptima de tolueno la de 0.8% para la reacción catalizada por *B. cereus* y de 0.5% para la que es catalizada por células de *E. cloacae*, ya que se elimina el problema de transporte del sustrato y producto de la reacción aspartatoamoníacoliase y hay una expresión máxima de la actividad enzimática de las células bacterianas utilizadas (Fig. 10 y 11). La pérdida de viabilidad de las células de *E. cloacae* cuando son tratadas con tolueno de más de 1.5%, no afectó la actividad de la enzima aspartasa; es necesario señalar en este punto que consideramos que al aumentar la concentración de tolueno y lograr la desintegración de la membrana celular, esta forma espontáneamente vesículas que contienen la aspartasa que de acuerdo a datos de literatura, es una enzima que se encuentra ubicada en la parte interna de la membrana celular. Esto nos permite trabajar en el proceso de biotransformación del ácido fumárico en aspártico, con una aspartasa que cataliza esta reacción, atrapada en microvesículas como en un proceso de inmovilización en geles naturales y esto aumenta la estabilidad de la enzima mencionada<sup>58</sup>.

**Tabla 10**

**Resultados del estudio sobre el efecto del tolueno en la expresión de la actividad enzimática y la velocidad inicial de la reacción aspartatoamoníacoliasa catalizada por células libres de *B. cereus*.**

<b>Tolueno, %</b>	<b>Periodo de difusión, min</b>	<b><math>V_0 \cdot 10^3</math>, Mmoles/mL.min</b>	<b>Unidades de Actividad aspartasa<sup>a</sup></b>
0	< 120	0	0 ± 0
0.3	30	1.71	102 ± 15
0.4	21	3.78	227 ± 55
0.5	15	4.98	300 ± 39
0.6	10	6.0	360 ± 42
0.7	5	6.9	414 ± 23
0.8	0	11.4	684 ± 33
0.9	0	7.8	468 ± 50
1.0	0	5.58	334 ± 28

<sup>a</sup> Media, ± Desviación estándar; n=10



**Fig. 10**

**Influencia del tolueno sobre la permeabilización de células de *B. cereus* para la expresión de su actividad aspartasa en la biotransformación del ácido fumárico en ácido L-aspartico.**

**Condiciones de reacción: Fumarato de amonio- 0.5M, pH 8.0, T 37°C, MgCl<sub>2</sub> 0.1%, proteína celular-1 mg/ml**

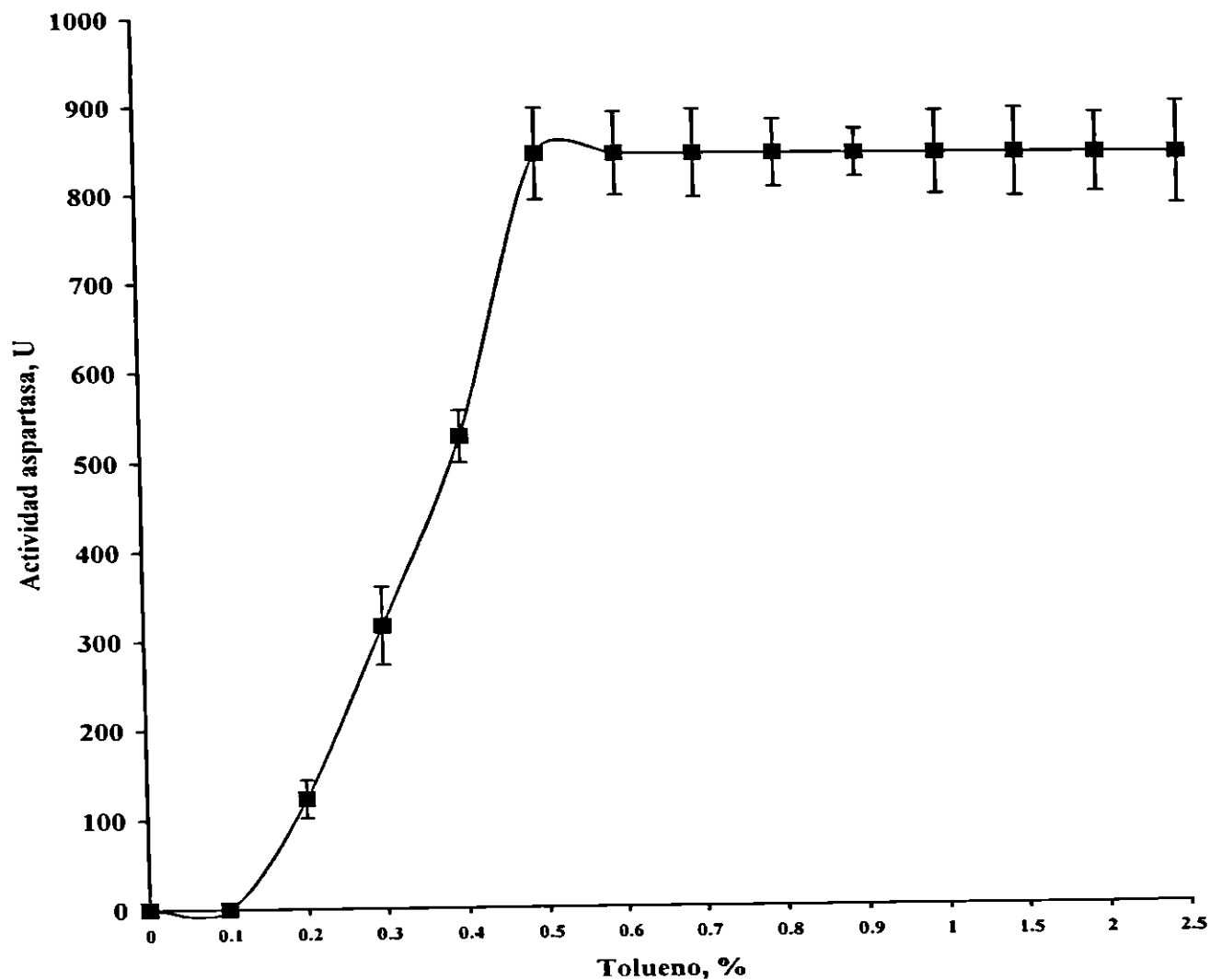
**Tabla 11**

**Efecto del tolueno sobre la velocidad inicial y la expresión de la actividad enzimática en la reacción aspartasa, catalizada por células de *E. cloacae* libres.**

<b>Tolueno, %</b>	<b>Conc. Proteína, mg/ml</b>	<b>Vo.EE3 M/min</b>	<b>Unidades de Actividad aspartasa<sup>a</sup></b>
0	1.7	0	0 ± 0
0.1	1.7	0	0 ± 0
0.2	1.7	3.5	123 ± 21
0.3	1.7	9.0	317 ± 44
0.4	1.7	15.0	529 ± 29
0.5	1.7	24.0	847 ± 52
*1.0	1.7	24.0	847 ± 47
*1.5	1.7	24.0	847 ± 50
*2.5	1.7	24.0	847 ± 45

<sup>a</sup> Media, ± Desviación estándar; n=10

\* Indica que las células perdieron viabilidad al ser tratadas con tolueno a esa concentración.



**Fig.11**

**Influencia del tolueno sobre la permeabilización de células de *Enterobacter cloacae* para la expresión de su actividad aspartasa en la biotransformación del ácido fumárico en ácido L-aspartico.**

**Condiciones de reacción: Fumarato de amonio- 0.5M, pH 8.0, T 37°C, MgCl<sub>2</sub> 0.1%, proteína celular- 1.7 mg/ml**

## **5.7 COMPROBACIÓN DEL ESTADO DE ANABIOSIS DE LAS CÉLULAS DE *B. cereus*, DURANTE LA BIOTRANSFORMACIÓN DEL ÁCIDO FUMÁRICO EN ÁCIDO L-ASPÁRTICO.**

Los resultados obtenidos en la serie de experimentos realizada, utilizando cloranfenicol como inhibidor de la síntesis de proteína de células procariotas, se presentan en las Tablas 12 y 13. Estos datos nos indican que, efectivamente, la síntesis de la proteína con actividad catalítica que es de nuestro particular interés, la aspartatoamoníacoliase, es formada en el curso del proceso de fermentación; es decir, cuándo las células de *B. cereus* se encuentran en condiciones favorables para su crecimiento, desarrollo y multiplicación y llevan a cabo todas las actividades metabólicas necesarias para lograr el propósito de todo ser vivo, obtener energía, utilizando para ello los sustratos nutritivos que son añadidos al medio de cultivo como fuente de carbono y energía, de nitrógeno, etc.<sup>128</sup> además del componente que es utilizado como inductor en este caso. Lo anterior se deduce porque los valores, tanto de la velocidad inicial como de la actividad enzimática aspartasa obtenidos de la reacción efectuada en los reactores tipo batch a los que se agregó directamente el cloranfenicol, como los obtenidos del reactor control (que no contiene cloranfenicol), no son diferentes, lo que indica que cuando el antibiótico se agrega al sistema reaccionante no afecta la actividad vital de las células microbianas ya que estas se encuentran en un estado fisiológico en el que el metabolismo ha disminuido grandemente su velocidad y no se realizan las reacciones “normales”. En este sentido, en el sistema reaccionante, la célula de *B. cereus* no se encuentra en condiciones fisiológicas debido a que la concentración de los reactantes en la solución (0.5M), es muy superior a la que tienen los sustratos nutritivos bajo condiciones de cultivo. En esta situación, sobre la célula bacteriana pueden actuar algunos factores inespecíficos como un medio carente de nutrientes; es decir, la célula esta en un estado de

“ayuno”, osmobiosis, un contenido anormal de oxígeno en la mezcla reaccionante, cambios en la composición iónica del medio (uso de plasmolizadores que afectan la integridad de la pared celular y membrana citoplasmática), etc. los cuales influyen profundamente en las funciones bioquímicas de la célula; además, hay que considerar que todos estos factores no actúan en forma aislada sino conjunta<sup>98,114,177</sup>.

El análisis de los resultados mostrados en las Tablas 12 y 13, indica que cuando el cloranfenicol es añadido al medio de cultivo a las 2 h de iniciado el periodo de incubación, no hay desarrollo de biomasa, ya que el microorganismo acaba de entrar a la fase logarítmica y desde este momento es inhibida la síntesis de proteínas y se ve afectada todo el metabolismo microbiano. Lo mismo ocurre cuando se añade el antibiótico a las tres horas de iniciada la incubación. Cuando las células tienen ya 4 h de incubación, se encuentran casi en la etapa final de la fase logarítmica; dos horas antes de que alcancen el tiempo óptimo de incubación en el que se presenta mayor actividad aspartasa, de acuerdo a los resultados previamente obtenidos. Podemos observar en este punto, que hay un aumento de la velocidad de la reacción, el cual depende básicamente de la cantidad de enzima intracelular presente. por lo que se considera que a partir de este tiempo de incubación, la aspartasa empieza a ser sintetizada. El mismo cuadro se observa cuando el cloranfenicol es añadido al medio de incubación, a las 5 h de iniciado el periodo de incubación.

Es importante señalar, que la síntesis de proteínas estructurales también es inhibida por el cloranfenicol, lo cuál explica el comportamiento que tienen las células de *B. cereus* que provienen de estos experimentos (que fueron crecidas bajo las condiciones mencionadas), y que son utilizadas, después de completar el periodo de incubación previamente establecido (6 h), en calidad de biocatalizadores de la biotransformación del ácido fumárico en aspártico sin el uso de plasmolizador (tolueno) en el sistema

reaccionante. Los datos indican que la pared celular y membrana citoplasmática, se ven afectadas en su integridad ya que es evidente que se inhibió la síntesis de proteínas que forman parte de su estructura química como lipoproteínas, y proteínas de la membrana. De acuerdo a datos de literatura, el antibiótico puede bloquear la ruta de síntesis del peptidoglicano de la pared celular en la última etapa de su formación <sup>42,43</sup>. Esto se evidencia por los valores de la velocidad de reacción obtenidos, al ser comparados con los valores obtenidos al utilizar células incubadas por el periodo previamente establecido; es decir, 6 h, y sin la presencia del inhibidor, lo que significa que la pared celular y la membrana citoplasmática, tienen todos sus componentes químicos completos y que como había sido establecido con anterioridad, para aumentar la velocidad de la reacción y disminuir el problema de difusión que se presenta al utilizar células microbianas como catalizadores, es necesario aumentar la permeabilidad de la membrana y pared celular mediante el uso de plasmolizadores o de diferentes tratamientos a las células<sup>37</sup>.

Por lo anterior, podemos concluir que las células bacterianas utilizadas en este proceso de biotransformación, se encuentran en un estado de anabiosis y que el sustrato, fumarato de amonio, no es utilizado como fuente de nutrientes para la realización de actividades metabólicas propias de la célula, sino que este es transformado mediante la reacción catalizada por la enzima o sistema enzimático que fue formado en el curso normal de la fermentación<sup>22,37,63</sup>.



**Tabla 12**

**Influencia del cloranfenicol sobre la expresión de la actividad enzimática aspartasa de células de *B. cereus* utilizadas en la biotransformación del ácido fumárico en ácido L-aspartico en presencia de tolueno como plasmolizador.**

<b>Tiempo de adición del cloranfenicol, (h)</b>	<b>Vo (M/min) EE03</b>	<b>Conc. Proteína mg/ml</b>	<b>A.E. EE04 mmol/mg.s</b>
Control	6.8600	0.7895	1.4481
6	6.7700	0.7800	1.4465
5	5.2000	0.6144	1.4105
4	3.6000	0.3000	1.94
3	0.0000	0.0974	0.0000
2	0.0000	0.0868	0.0000

**Tabla 13**

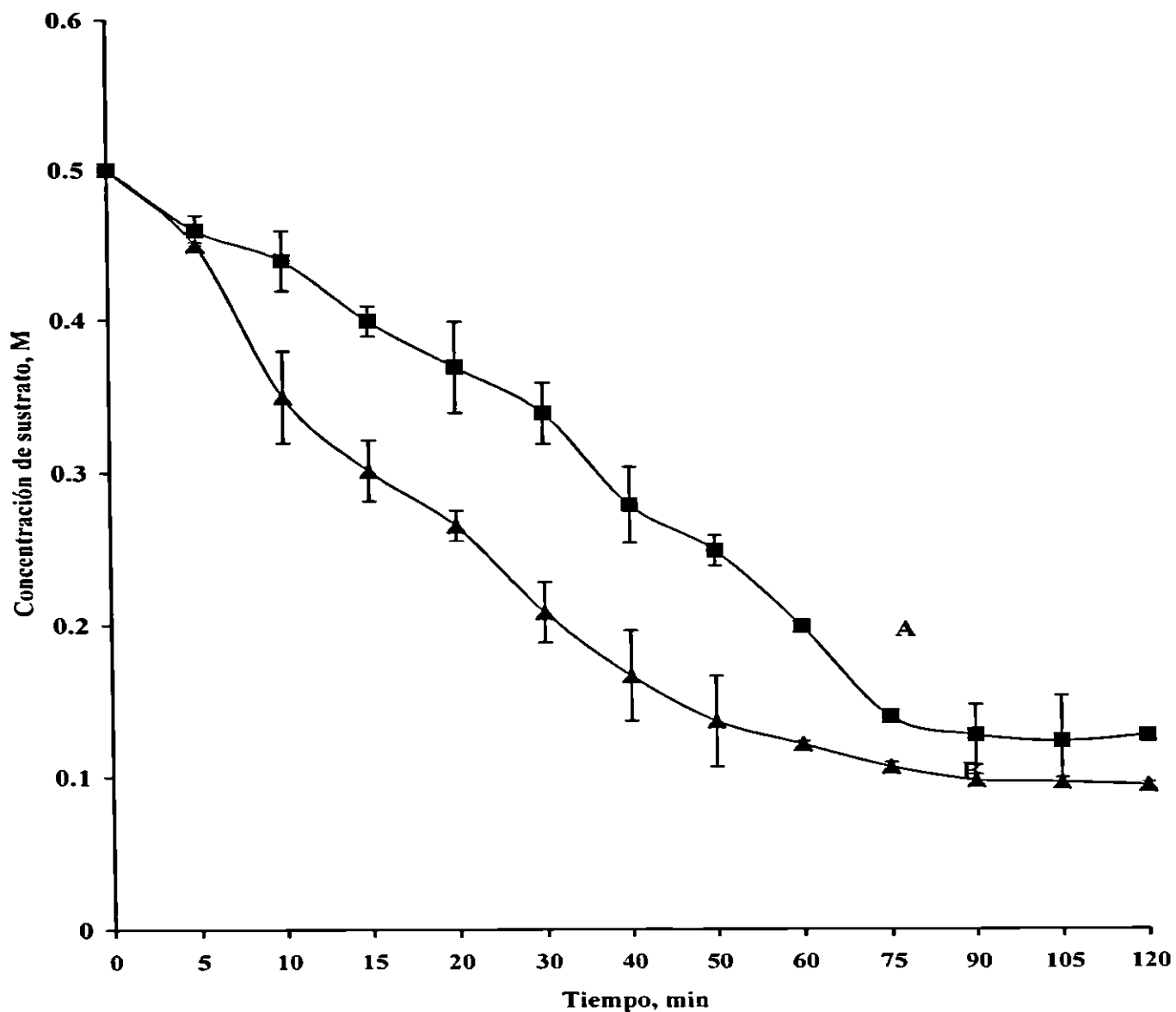
**Influencia del cloranfenicol sobre la expresión de la actividad enzimática aspartasa de células de *B. cereus* utilizadas en la biotransformación del ácido fumárico en ácido L-aspartico sin plasmolizador en el sistema de reacción.**

<b>Tiempo de adición del cloranfenicol, (h)</b>	<b>Vo (M/min) EE03</b>	<b>Conc. Proteína mg/ml</b>	<b>A.E. EE04 Mmol/mg.s</b>
Control	6.8600	0.7895	1.4481
6	0.7320	0.7800	0.1564
5	1.1900	0.6144	0.3228
4	1.7800	0.3000	0.9888
3	0.0000	0.0974	0.0000
2	0.0000	0.0868	0.0000

## **5.8 COMPARACIÓN ENTRE LOS ESTUDIOS CINÉTICOS DE CONSUMO DE SUSTRATO EN LA REACCIÓN ASPARTASA, CATALIZADA POR CÉLULAS DE *B. cereus* Y *E. cloacae*, CULTIVADAS BAJO LAS CONDICIONES INICIALES Y BAJO CONDICIONES ÓPTIMAS ESTABLECIDAS EN ESTE TRABAJO.**

El análisis global de los resultados obtenidos en la selección del medio de cultivo más adecuado para la expresión de la actividad enzimática aspartasa en células de *B. cereus*, además de la optimización de cada componente del medio de cultivo, del tiempo de incubación, de la concentración de tolueno utilizado para permeabilizar la membrana y pared celular de las células utilizadas, nos permitió efectuar una comparación del comportamiento del biocatalizador fundamentado en células de *B. cereus*, al ser utilizadas en el proceso de biotransformación del ácido fumárico en el aminoácido L-aspartico. Los resultados finales se presentan en la Fig. 12 para *B. cereus* y en la Fig. 13 para *E. cloacae*. Es necesario mencionar que la optimización de algunos parámetros, como la influencia de cada componente del medio líquido, solo fue realizado para células de *B. cereus*, no obstante, el medio optimizado también se utilizó para cultivar células de *E. cloacae* y observamos que hay un mejoramiento sustancial de la actividad enzimática aspartasa expresada por éstas células en el proceso mencionado. La Fig. 12 nos muestra que se presenta un consumo de sustrato más eficiente a una velocidad mayor, lo cuál se ve reflejado en un valor de actividad aspartasa más alto; esto es, de una actividad aspartasa de 300 U, aumento a 510 U en células de *B. cereus*. De la Fig.13, también se calculó la velocidad inicial de la reacción catalizada por células de *E. cloacae* y la expresión de la actividad aspartasa, observándose un aumento sustancial del 60% en ambos casos. Los valores de velocidad inicial obtenidos fueron: de  $5.16 \times 10^{-3}$  M/min a  $12.0 \times 10^{-3}$  M/min y la actividad aspartasa, de 258 U a 600 U.

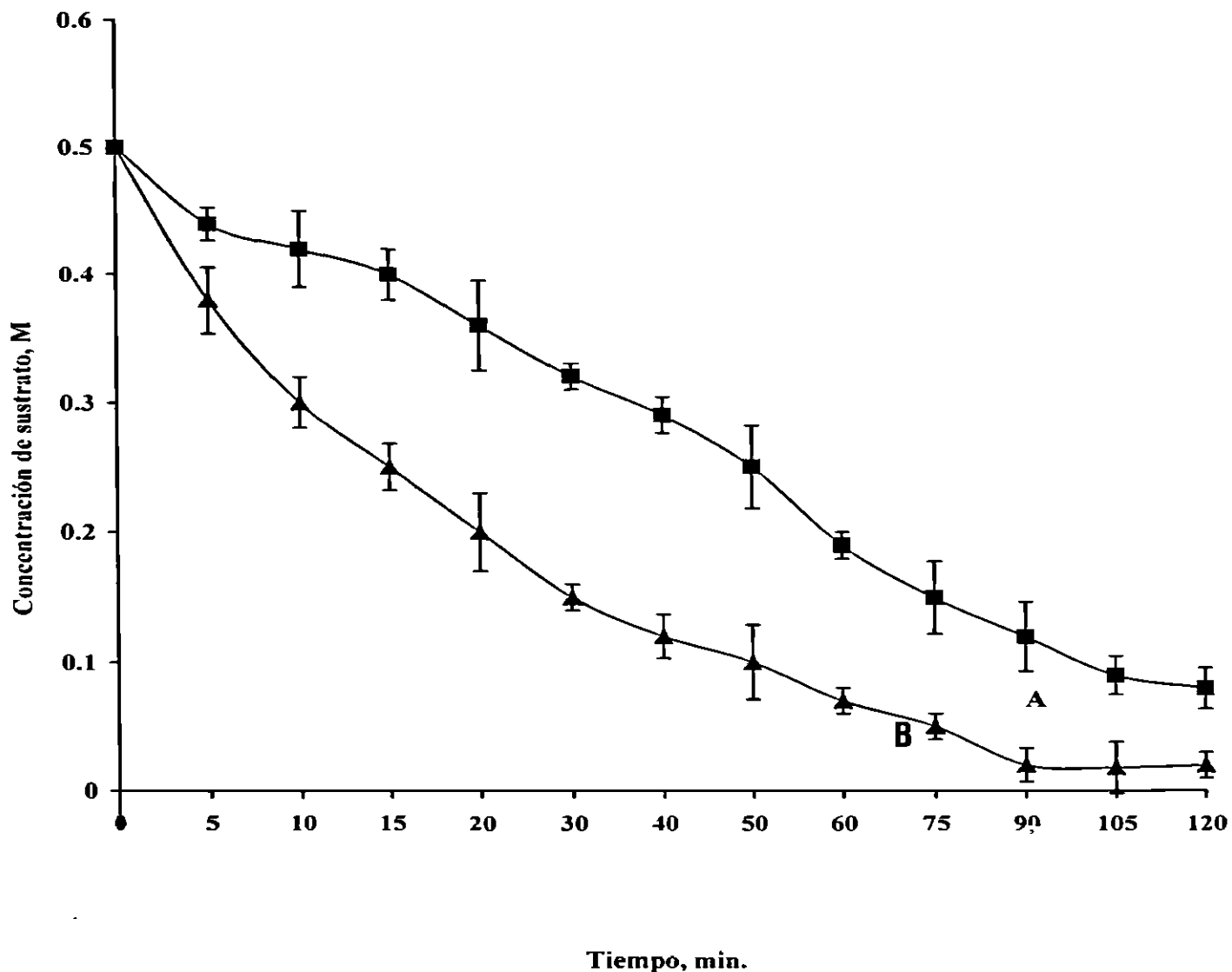
Al efectuar una comparación de rendimiento de producto formado con otros biocatalizadores que emplean distintos investigadores que se mencionan en la literatura, encontramos que en la reacción catalizada por células de *B. cereus* con 6 h de incubación, que utilizamos en nuestras investigaciones, se producen 4.0 g/h del aminoácido L-aspártico; en los trabajos efectuados por investigadores rusos<sup>175</sup>, con células de *E. coli* 85 de 18 h de incubación, obtienen 2.16 g/h de ácido L-aspártico. Comparamos también con los resultados de investigadores japoneses<sup>173</sup> que tienen una patente de este proceso, en el que utilizan células de *B. flavum* MI-233, y con las que obtienen 3.2 g del aminoácido en un periodo de 3 días. Con respecto a las investigaciones desarrolladas por Vojtisek V. et al<sup>159</sup>, con células de *A. metalcaligenes* con 48 h de incubación, obtienen 2.3 g/h de producto; finalmente, se comparó el rendimiento obtenido con el de otro grupo de investigadores japoneses<sup>126</sup> que utilizan una cepa de *E. coli* ATCC 11303, con 20 h de incubación y los cuales obtuvieron 2.6 g/h de ácido L-aspártico.



**Fig. 12**

**Cinética de consumo de fumarato de amonio en la reacción aspartasa catalizada por *Bacillus cereus* cultivada en un medio sin optimización de sus componentes (A) y bajo las condiciones establecidas en el presente trabajo (B).**

**Condiciones de reacción: Fumarato de amonio-0.5M, pH 8.0, T 37°C, tolueno 0.8%, MgCl<sub>2</sub> 0.1%, proteína celular 1.0 mg/ml.**



**Fig. 13**

**Cinética de consumo de fumarato de amonio en la reacción aspartasa catalizada por *Enterobacter cloacae* cultivada en un medio sin optimización de sus componentes (A) y bajo las condiciones establecidas en el presente trabajo (B). Condiciones de reacción: fumarato de amonio- 0.5M, pH 8.0, T 37°C, tolueno 0.5%, MgCl<sub>2</sub> 0.1% y proteína celular 1-2mg/ml.**

## CONCLUSIONES

1. Se logró el aislamiento de dos cepas bacterianas: *B. cereus* y *E. cloacae* con alta actividad aspartatoamoníacoliase, para ser utilizadas como biocatalizadores en el proceso de biotransformación del ácido fumárico en el aminoácido L-aspartico, en reactores tipo batch.
2. Se seleccionó el medio IV, para la propagación de los biocatalizadores obtenidos, ya que hay una máxima expresión de la actividad aspartasa. El contenido del medio en %: caldo nutritivo - 0.8, peptona - 0.3, extracto de levadura - 0.2, ácido L-aspartico - 0.1.
3. Se estableció que para las células de *B. cereus*, el tiempo óptimo de incubación a una temperatura de 30-32°C y una agitación constante de 250 r.p.m, es de 6 h y que el crecimiento de las células corresponde al final de la fase logarítmica. Para las células de *E. cloacae*, cultivadas bajo las mismas condiciones, es de 12 h. y que el microorganismo se encuentra también al final de la fase logarítmica. Es conveniente mencionar que la temperatura de incubación fue seleccionada de acuerdo a los datos obtenidos por la ATCC, cuando realizaron la confirmación de la identificación de las dos cepas aisladas. Además de lo anterior, efectuamos una comparación de tiempos de incubación que requieren las cepas que utilizan investigadores japoneses como la *E. coli* ATCC No. 11303, la cuál es cultivada durante 20 h<sup>27,28,29,30,31,126,127</sup> y la utilizada por investigadores rusos, *E. coli* 85, que inicialmente precultivaron 12 h y después 6 h, lo que daría un total de tiempo de incubación de 18 h<sup>11,83,176,177,178,179</sup>.

4. De los experimentos realizados para estudiar la influencia de cada componente del medio líquido seleccionado, se determinó que el caldo nutritivo es el componente limitante para el desarrollo de las células de *B. cereus*, aunque no disminuyó la concentración empleada en el medio control (0.8%). La concentración de peptona fue disminuida un 70%; de 1% en el medio control a 0.3% en el medio optimizado. La concentración de extracto de levadura, también disminuyó un 60%, de 0.5 a 0.2% en el medio optimizado. Además, hubo una mejora sustancial de la actividad enzimática aspartasa, tanto para *B. cereus* como para *E. cloacae*, ya que también se utilizó el medio optimizado para cultivar estas células.
  
5. Del estudio sobre la influencia del tolueno, que utilizamos para permeabilizar las células de *B. cereus* y *E. cloacae*, se deduce que en ausencia de tolueno, la reacción no ocurre, ya que uno de los problemas al utilizar células completas como biocatalizadores en procesos de transformación, es precisamente la necesidad de aumentar la permeabilidad de la membrana y pared celular para lograr que el sustrato entre a las células y se ponga en contacto con la enzima intracelular y que posteriormente salga el producto al medio exterior. Se estableció una concentración óptima de tolueno de 0.8% para *B. cereus*, que es 20% menor que la utilizada inicialmente. Para las células de *E. cloacae*, se estableció una concentración de 0.5% del plasmolizador, que constituye una disminución del 50% de la utilizada inicialmente. Además, se estableció que aún y cuando las células de *E. cloacae* pierden viabilidad a concentraciones de tolueno de 1.5%, estas no pierden su actividad enzimática, lo que es favorable para un proceso a escala industrial ya que no se tiene que cuidar la integridad del biocatalizador para que este mantenga su actividad enzimática.



6. Se determinó que los biocatalizadores obtenidos, fundamentados en células de *B. cereus* y *E. cloacae*, poseen una actividad metabólica disminuida (estado de anabiosis) cuando se utilizan en el proceso de biotransformación del ácido fumárico en ácido L-aspartico, por lo que se concluye que la regulación del metabolismo mediante el proceso de inducción de la síntesis de la aspartasa, tiene que ser realizado durante la fermentación y no en el proceso de biotransformación en si, ya que en este caso, las condiciones de reacción, deberán ser establecidas considerando todos los parámetros que pueden afectar cualquier reacción química como la temperatura, pH, concentración de sustrato, concentración de enzima, etc. y no las condiciones para un proceso microbiológico propiamente, lo cuál se hace previo al proceso de biotransformación.

## PERSPECTIVAS DE LA INVESTIGACIÓN

Esta investigación, constituye la base de un proyecto de obtención de L-aminoácidos: ácido L-aspártico, L-tirosina y L-3,4dihidroxifenilalanina mediante células de microorganismos nativas o libres e inmovilizadas, el cuál es propuesto por vez primera en nuestro país y que tiene como objetivo establecer el fundamento científico y tecnológico para la síntesis de los aminoácidos mencionados utilizando un método con amplias perspectivas, acorde a los requerimientos ecológicos actuales, la síntesis enzimática basada en la catálisis heterogénea que comprende además el concepto de biotransformación microbiana. En general, puede decirse que la selección de un biocatalizador fundamentado en células microbianas como en el presente trabajo, constituye una de las operaciones más críticas en un proceso de biotransformación.

Las células en reposo de *B. cereus* y *E. cloacae* al ser utilizadas como catalizadores en el proceso de biotransformación del ácido fumárico en el aminoácido L-aspártico, tienen una serie de ventajas frente a las células que están en crecimiento o frente a las enzimas aisladas y purificadas. En este caso, el proceso es mucho más limpio que con las células en crecimiento, y el producto es fácilmente separado. Comparado con enzimas aisladas, estos biocatalizadores en reposo, pueden efectuar reacciones enzimáticas de etapas múltiples sin la necesidad de adicionar coenzimas. Para reacciones de una sola etapa, su uso minimiza la pérdida de actividad enzimática, lo que inevitablemente ocurre durante el aislamiento y purificación de una enzima.

Además de las ventajas mencionadas, hemos considerado el empleo de las células de *B. cereus* y *E. cloacae*, en estado inmovilizado, lo cuál permite el uso múltiple de los biocatalizadores en reactores de flujo continuo proporcionando además estabilidad a la enzima intracelular; para ello, se trabaja actualmente en la selección de soportes de naturaleza polimérica; entre ellos, k-carragenina, gel de poliacrilamida y alcohol polivinílico, este último soporte,

permite trabajar con temperaturas más elevadas sin deterioro de la actividad enzimática, lo que por supuesto, aumenta la velocidad de la reacción y la formación del producto, el cual es obtenido con un alto grado de pureza y es fácilmente separado.

Consideramos que esta investigación, puede ser llevada a una escala industrial en reactores en columna empacados con células inmovilizadas en el soporte más adecuado para ello. Esto es importante no solo desde el punto de vista de sustitución de importaciones, ya que nuestro país no produce el aminoácido mencionado, sino además, contribuye dentro de una Institución de Educación Superior, a la formación de recursos humanos con conocimientos adecuados que puedan ser aplicados en la obtención de otras sustancias que podrían ser aminoácidos esenciales, ácidos orgánicos, etc.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Abbot B.J. Preparation of pharmaceutical compounds by immobilized enzymes and cells. *Advances in Appl Microbiol.* N.Y: Acad.Press, 1976, v.20, p.203.
2. Aharon M.Eyal., Eyal Bressler. 1993. Mini-Reviews. Industrial separation of carboxylic and amino acids by liquid membranes: Applicability, Process Considerations and Potential Advantages. *Biotech. and Bioeng.* Vol.41, pp.287-285
3. Álvarez de la C.J., De la Garza A.M. 1992. Aminoácidos producidos por microorganismos. *Biotecnología Hoy.*, CONACYT, p.43-54.
4. A.Goel., J.Ferrance., J.Jeong. and M.M.Atai.1993. Analysis of metabolic fluxes in batch and continuous cultures of *Bacillus subtilis*. *Biotech. and Bioeng.* Vol.42, pp. 686-696.
5. Arcadieva Z.A., Besvorodov A.M., Bloxin I.N. 1989."Microbiología Industrial", Ed. Esc.Sup. Moscú, Rus. p.106:113-117,338-353, 359-362
6. Asonov R. 1989. "Microbiología-Morfología bacteriana"., Ed Coloso., p.22
7. Bailey J.E., Ollis D.F. 1989. *Biochemical engineering fundamentals*.Sec.Ed., Ed.Mir, p.11,12, 299, 348-355
8. Baughenan R.W., Gilbert S.D. 1980. Aspartate and glutamate as posibles neurotransmitters of cells in layer of visual cortex. *Nature.*, V.207, p.845-850.
9. Belikov V.M. 1973. Aminoácidos, su síntesis química y aplicación. *Acad.Cienc.Rus.*, T.8., p.33-39
10. Berezin B.B., Tikhonov L.E., Belchin L.A., Dabanikov V.A. 1978. Cromatografía de intercambio de ligandos en los enantiómeros de aminoácidos. *Quím.Bioorg.*, T.4, No.9, p.1170
11. Berezin I.V., Yakovleva V.I. 1980. Métodos enzimáticos de obtención de algunos aminoácidos, perspectivas para su uso práctico. *Conf. Síntesis Microbiol. y Enzim. de aminoácidos.* Acad.Cienc. Rus. Pushino. p.16-17.
12. Berezin I.V., Yatsimirsky A.K. 1986. *Biotecnología y sus perspectivas.* Serie Biología, No.11. Ed."Conocimiento", p.1-26.
13. Berezin I.V., Kliachko N.L., Levashov A.V., Martinek K.1987. *Enzimas inmovilizadas.* Serie Biotecnología.,Ed.Esc.Sup. Moscú.Rus. No.7, p.6-7

14. Bergey D.H., Harrison F.C., Breed R.S., Hammer B.W., Hunton F.N. 1984. *Bergey's Manual of determinative bacteriology*., 8th. ed., p.529-535
15. Bernal J. 1956. *La ciencia en la historia de la sociedad*. Ed.Mir. p.3-6
16. *Biología: transformación productiva y repercusiones sociales*. Revista Mex. Sociología., Año 6, No.16, Mayo-Agosto 1991
17. *Biología*. 1993, Vol.3, No.5 y 6, p.S-82.
18. Briukov U.V., Kantere V.M. 1985. "Optimización de los procesos periódicos de síntesis microbológica". *J.Microbiol.*, v.11., p.29-38
19. Birger M.O. 1982. "Manual sobre métodos de investigación en microbiología y virología"., Ed.Medicina, Moscú., p.40:49-50:51
20. Brock Thomas D., Smith David W., Madigan M.T., 1980. "Microbiología"., 4<sup>th</sup> ed., Prentice Hall Hispanoamericana, S.A. México., p.786-788.
21. Bruchmann E.E. 1981. *Bioquímica Aplicada*. Trad. Alemán-Ruso.Zviagilskoy R.A. Redacc. Kretovich V.L. Ed. Moscú, p.152-164, 257-270
22. Buikov V.A., Krilov I.A., Manakov M.N., Markvichev N.S., Orlova L.M., Tarasova N.V. 1987. *Producción microbológica de sustancias y preparados fisiológicamente activos*. Ed.Esc. Superior., Moscú,Rus. Serie *Biología* No.6, p.6,10-20
23. Collins C.H., P.M. Lyne. 1970. "Microbiological methods".,3rd.ed. University Park Press, Baltimore.
24. Cowan S.T. 1974. "Cowan and Steel's Manual for identification of medical bacteria". 2nd.ed., Cambridge University Press., London. England., p.45-122
25. Cutinelli L., Pictropaolo C., Venuta S., Zappia V., Salvatore F. 1972. *Studies on the identification and characterization of an aspartase activity in liver of elasmobranch fishes*. *Comp.Biochem. Physiol.* v.41, No.4, p.905-919
26. Cheetham Peter J.S. 1987. *Review Screening for novel biocatalysts*. *Enzyme Microbiol.Technol.*, Vol.9, April. p.194-213
27. Chibata I., Tosa T., Sato T., Mori T., Yamamoto K. 1973. *Continuous enzyme reaction by immobilized microbial cells*. *Enzyme Eng.*, N.Y., Plenum Publ.Corp., v.2., No.4, p.303 315.
28. Chibata I., Tosa T., Sato T. 1974. *Immobilized aspartase containing microbial cells: preparation and enzymatic properties*.- *Appl.Microbiol.*, v.27, No.5, p.878-885.

29. Chibata I., Tosa T. 1976. Industrial applications of immobilized enzymes and immobilized microbial cells. Appl. Biochem. and Bioeng., N.Y., Plenum Press, V.1, p.329-357.
30. Chibata I., Tosa T., Sato T. 1976. Production of L-aspartic acid by microbial cells entrapped in polyacrilamide gels.- In: Ed. Mosbach K. methods in enzymology., N.Y., San Fco., London, Acad.Press., v.44, p.739-745
31. Chibata I. 1979. Immobilized microbial cells. Amer.Chem.Soc., Washington D.C, chapt. 13, p.187-202
32. Chibata I. Masahiko K., Saburo K., Kousaku M. 1984. Fermentation production of L-treonine. United States Patent. No.4,463,094.
33. Chibata I., Masahiko K., Masaki S., Tsutomu T. 1984. Method for fermentative production of L-proline. United States Patent. No. 4,455,372.
34. Chibata I., KoAida., Kiyoshi N.,Koichi T. 1986. Biotechnology of aminoacid production. Progress in Industrial Microbiology., V.24., p.3-15, 145-151.
35. Davankov V.A. 1980. Separación de racematos de aminoácidos. Mem.Simp. sobre aminoácidos para la agricultura, industria alimentaria, salud e investigación. Frunze,URSS, p.63-64
36. Davankov V.A., Zolotariov Y.A., Teamin A.V. 1978. Cromatografía de intercambio de ligandos de racematos de aminoácidos. Quím.Bioorg. T.4, No.9, p.1164.
37. Debabov V.G., Libshits V.A. 1988. Métodos modernos de creación de cepas microbianas industriales. Serie Biotecnología No.2. Ed. Esc.Sup. Moscú, Rus. p.6- 68.
38. Demain A.L. and Davies J.E. 1999. Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. Second edition. ASM Press. P: 3, 165-180
39. Demain A.L and Solomon N.A. 1986. Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology., "Screening and selection for strain improvement"., American Society for Microbiology, Washington D.C. p.155-169
40. DeSmet M.J., Kingsa J., Witholt B. 1978. "The effect of toluene on the structure and permeability of the cuter and cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*"., Biochem-Biophys. Acta., v.506., No.1.,p.64-80
41. Dreyfus L.A., Brubaker R.R. 1978. Consequences of aspartase deficiency in *Yersinia pestis*.- J.Bacteriol. v.136, No.2, p.757-764
42. Egorov N.S. 1986. "Metabolismo Microbiano-prácticas"., Ed.Univ.Moscú, Rus. p.44-51

43. Elinov N.P. 1989. "Microbiología Química", Moscú, Ed. Esc.Sup., p.108-109, 171-201, 202-312.
44. Elfolk N. 1953. Studies on aspartes I. Quantitative separation of aspartase from bacterial cells and its partial purification.- Acta.Chem.Scand. v.7, No.5, p.824-830.
45. Elfolk N. 1953. Studies on aspartase II. On the chemical nature aspartase.-Acta Chem.scand., v.7, No.7, p.1155-1163.
46. Elfolk N. 1954. Studies on aspartase III. On the specificity of aspartase. Acta chem. scand., v.8, No.1, p.151-156
47. Elfolk N. Aspartase and study on its nature and purification.- Ann.Acad.Sci.,fennicue, ser.A,II,1956., v.79, p.7
48. Emery T.P. 1963. "Aspartase catalyzed synthesis of N-hydroxiaspartic acid., Biochemistry., v.2., No.5., p.1041-1045
49. Enei H., Yamashita K., Okumura S., Yamada H.1973. "Culture conditions for the preparation of cells containing high tyrosine-phenol-lyase activity", Agric. Biol. Chem., v.37., No.3
50. Erokhina L.I. 1979. Investigaciones genoselectivas con productores de enzimas// II Reun. sobre Enzimas Microbianas.
51. Falzone Christopher J., William E. Karsten., Judith D. Conley and Ronald E. Viola.1988. L-aspartase from *E. coli*: substrate specificity and role of divalent metal ions.Biochemistry, 27, 9089-9093.
52. Fam Van Nugen. 1978. "Estudio de la L-aspartato-2-glutamatoaminotransferasa en sistemas biocatalíticos heterogéneos". Tesis Doctoral. Univ. Estatal de Moscú.p.11-13
53. Forrest Foor, Nancy Morin and Keith A. Bostian. 1993. Production of L-Dihydroxyphenylalanine in *Escherichia coli* with the tyrosine phenol-lyase gen cloned from *Erwinia herbicola*. Appl. And Env. Microbiology. Vol.59, No.9, p: 3070-3075
54. Franks E.1972. Biotech. Bioeng.Symp.3,327
55. Fr.Pat. 2158330. Inter.Cl. 12d 13 00, 1973
56. Fusee M.C., Swam W., Calton G.J. 1981. Appl.Environ.Microbiol., v.42,No.4,p.672- 676
57. Galovlev E.L. 1980. Influencia de la limitación del crecimiento sobre el metabolismo microbiano.Pushino. Acad.Cienc.Rus.Centro de Inv.Biol. p.22-23

58. Gennis B.R. 1997. Biomembranes – Molecular Structure and Function. (trad. Inglés-ruso). Mir, Moscú. p: 24-28
59. Guerasimov M.A. 1972. Tecnología de las fermentaciones. Ed.Mir, p.10-13
60. Guirard B.M., Snell E.E. 1962. Nutritional requirements of microorganisms. In: The Bacteria, vol.4, I.C. Gonzalez and R.Y. Stainer (eds), Academic Press, New York, p.33-95
61. Gorina I.A., Yakovleva V.I. 1980. "Rapid method for measuring protein content in microbial cells"., Biochem and Microbiol. Appl., Acad. Sci, Moscú.T.XVI., ed.6., p.936-939.
62. Gordienko S.V., Latov V.K., Koshevalova L.V. 1980. Separación de mezclas de aminoácidos a partir de hidrolizados protéicos de origen vegetal., Pushino. Tes. y Conf. Sínt. Microbiol. y Enzim. de aminoácidos., p.64
63. Gottschalk Gerhard. 1982. Bacterial Metabolism. Trad.ingl-ruso. Red. E.N.Kondriateva. Ed. Mir., Moscú,Rus. p.26,27.132-134,158-185.
64. G. Para, P. Lucciardi and J. Baratti. 1985. Synthesis of L-tyrosine by immobilizaed *Escherichia intermedia* cells. Appl. Microbiol Biotechnol. 21:273-279
65. Gracheva I.M., Gavrilova N.N., Ivanova L.A. 1980. Tecnología de preparados protéicos microbianos, de aminoácidos y grasas. Ind. Alim. 448 p.
66. Green A.M, and G.M. Stephens. 1996. Biotransformations by *Clostridium beijerinckii* UCIMB 8052 in pH-auxostat culture. Appl. Microbiol Biotechnol. 44: 553-556
67. Gusev M.V., Mineeva L.A. 1992. Microbiología. 3rd Ed. Univ. Moscú, Rus., p.87,111-123.
68. Hardway K.L., Buller C.S. 1979. "Effect of ethylendiamine-tetracetate on phospholipids and cuter membrane function in *Escherichia coli*"., J.Bacteriol., v.137., No.1., p.62-68
69. Henderson L.L., Johnston R.B. Inhibition studies of the enantiomers of  $\alpha$ - chloroalanine on purified alanine racemase from *B.subtilis*.- Biochem.Biophys. Res.Communs, 1976, v.68, No.3. p.793.
70. Hitchener B.J., Egan A.F. 1977. "Outer membrane damage in sublethally heated *Escherichia coli* K-12., Can. J. Microbiol.,v.23., p.311-318
71. Hubert J.C., Wurtz B. 1975. Arch.Microbiol., v.102., No.1., p.35
72. Hwang S.O., Gil G.H. 1985. The fermentation process for L-Phe production using an auxotrophic regulatory mutant of *E.coli* . Appl.Microbiol and Biotechnol, v.22, N.2, p.108-113.



73. Isao Umemura, Satoru Takamatsu, Tadashi Sato, Tetsuya Tosa and Ichiro Chibata. 1984. Improvement of production of L-aspartic acid using immobilized microbial cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 20:291-295
74. Janoff A.S., Gupto S., McGroarty R.J. 1980. "Correlation between temperature range of growth and structural transitions in membrane and lipids of *Escherichia coli* K-12"., *Biochem. Biophys. Acta.*, V.598., No.3., p.641- 644
75. Jeewan Lee and Satish J.Parulekar. 1993. Enhanced production of  $\alpha$ -amilase in Feed batch cultures of *Bacillus subtilis* TN 106 (pAT5). *Biotech and Bioeng.* Vol.42, pp.1142-1150.
76. Jerome J.Kinzel and J.K. Bhattacharjee. 1982. Lysine biosynthesis in *Rhodotorula glutinis*: properties of pipecolic acid oxidase. *Journal of Bacteriology.*, Vol.151,No.3, p.1073-1077
77. Joshi S.S., Subrahmanyam A. 1984. Amino Acid by Bacteria// *Hindustan Antibiot. Bull.* Vol.26, No.3-4, pp.117-138
78. K. Shetty, D.L.Crawford and A. L.Pometto III. 1986. Production of L-Phe. from starch by analog-resistant mutants of *Bacillus polymyxa*. *Applied and Environmental Microbiology.*, Vo.52, No.4., p.637-643
79. Katova G.A., Voilova M.B. Producción y aplicación de aminoácidos. *Simp. Aminoácidos para la industria alimentaria, salud e investigación.* Frunze, 1981, Moscú, Rus. p.5-7
80. Kawaguchi K., Izumitami T., Tami Y., Yamada H., Ogata K. 1971. *J.Ferment. Technol.*, 49:222.
81. Kinoshita S., Chua J.W., Kato N., Yoshida T & Taguchi H. 1986. *Enzyme Microb. Technol.*, 8,691-695.
82. Kitahara K., Fukui S and Misawa M. 1978. "Preparation of L-aspartic acid by bacterial aspartase"., *J.Agr.Chem.Soc. Japan.*, p.34:44-48
83. Kondriateva E.N., Egorov N.S., Berezin I.V., Krasilnikova E.N., Yakovleva V.I., Malofeeva I.V. 1979. "Cepa de *Escherichia coli* 85, productora de ácido L- aspártico". *Ac.*,No.644833., Publ. en I.B. 1979., No.4
84. Kozo Yamamoto., Tetsuya Tosa and Ichiro Chibata. 1980. Continuous production of L-alanine using *Pseudomonas dacunhae* immobilized with carrageenan. *Biotech. and Bioeng.* Vol.XXII, p.2045-2054.
85. Kretovich V.L., Bundel A.A., Aseeva K.N. 1951. Formación de ácido aspártico en las plantas, a partir de ácido oxalacético y amoniaco. *Conf. Acad Cienc. Rus.*, t.50, No.2, p.225-228

86. Kretovich V.L. 1972. Metabolismo del nitrógeno en las plantas. Ed.Ciencia, p.118-142.
87. Kretovich V.T., Koriakina T.I., Vainova M.K., Sidelnikova L.I., Kazakova O.V.1981. Conf. Acad Cienc. Rus., T.256, No.5, p.1258-1260
88. Kurata V. 1962. Appearance of hidrogenase nitratoreductase and aspartase during the ontogeny of the frog., Exp.cell.res. v.28, p.424-429
89. L.Vee and H.W. Blanch. 1993. Defined media optimization for growth of recombinant *Escherichia coli* X90. Biotech. and Bioeng. Vol.141, N0.2, pp.221-230
90. Lee C.K. and Hong J. 1987. Membrane reactor coupled with electrophoresis for enzymatic production of aspartic acid. Biotech. and Bioeng.. Vol.32, pp.647-654.
91. Lee H.W., J.G. Pan., J.M. Lebeault. 1995. Characterisation of kinetic parameters and metabolic transition of *Corynebacterium glutamicum* on L-lysine production in continuous culture. Appl. Microbiol. Biotechnol. 43: 1019-1027
92. Lehninger A.L. 1974. Bioquímica, 2ª Ed. Omega, Barcelona, España, 1117p.
93. Liess K., Mecke D., Holzer H. 1966. "Biochemistry", V.346.,No.3., p.244
94. Malofeeva N.V., Yakovleva V.I. 1979. "Formación de ácido aspártico por *Escherichia coli* y *Pseudomonas fluorescens* en función de las condiciones de cultivo". Bioquímica y Microbiología Aplicada., Tom.XV., No.5., p.671-675
95. Malofeeva I.V., Yakovleva V.I. 1979. Bioquim.Microbiol.Apl., T.15, No.5, p.671-675
96. Marcin C., L. Katz., R. Greasham and M. Chartrain. 1993. Optimization of lipase production by *Pseudomonas aeruginosa* MB 5001 in batch cultivation. Journal of Industrial Microbiology, 12: 29-34
97. Masahiko Kisumi., Yoshitara Ashikaga and Ichiro Chibata. 1960. "Studies on the fermentative preparation of L-aspartic acid from fumaric acid".,Agr.Chem.Soc.Japan., Vol.24., No.3., p.296-305
98. Masayory I., Halegoua S. 1980. "Secretion and membrane localization on proteins in *E.coli*"., CRC Critical reviews in Biochemistry., p.339-371
99. Masters P.M., Bada J.L., Eigler J.S. 1978. Aspartic acid racemization in heavy molecular weight cristallins and water insoluble protein from human linces and estearts. 1978. Prec.Nat.Acad.Cienc. USA. V.75, No.3, p.1204-1208.
100. Menger M.F., Goldsmith J.D., Mandel L. 1976. "Química Orgánica"., Fondo Educativo Interamericano., p.394-395

101. Moresi M., E. Parente., M. Petruccioli and F. Federici. 1991. Optimization of fumaric acid production from potato flour by *Rhizopus arrhizus*. Appl. Microbiol Biotechnol, 36: 35-39
102. Mosichev M.C., Skladnev A.A., Kotov V.B. 1982. Tecnología de las producciones microbiológicas., Ind. Alim., 264 p.
103. Nakazawa H., Enei H., Okumura S., Yamada H. 1972. "Agr.Biol.Chem,36, 2523
104. Nathan P.J. 1975. "Separaciones cromatográficas", ANUIES., p.29-34
105. Nikiforuk I.V., Kuraeva M.N., Ledovaia E.F., Gaebisky A.P. 1980. Obtención de L-aminoácidos a partir de hidrolizados protéicos. Pushino., Conf.y Tesis sobre Sínt.Microbiol. y Enz. de aa. p:72-73
106. Nishida I., Sato T., Tosa T., Chibata I. 1979. Enzyme Microbiol. Technol., v.1, No.4, p.95-99
107. N.S. Egorov., Zh. K. Loria, B. Briukker. 1982. Regulación de la síntesis de enzimas proteolíticas extracelulares en los microorganismos. Prikl. Biokimia y Mikrobiol.T.20, p:59-79.
108. Ozolin R.K. 1965. "Síntesis de ácido L-aspartico y actividad aspartasa en los microorganismos., Bioquim y Microbiol. Apl., T.1., No.6., p.707-715.
109. Peart S.Z. 1978. Fundamentos del cultivo de células y microorganismos".
110. Pelczar J.M., Reid D.R., Chan E.C.S. 1992. "Microbiología", 4a. ed., McGraw Hill., p.88-179
111. Peña A. 1985. "Membranas de las células". Fondo Interamericano para la Cultura Económica. P.58
112. Plachy J. 1979. Formation of DL-alanine by *Corynebacterium sp.*9366-EMS/270. Folia Microbiol,24,176-181
113. Peterson G.L. 1977. Anual Biochem., V.83, p.346
114. Rabotonova I.L. 1980. "Inhibidores del crecimiento y metabolismo microbiano" en el lib:Limitación e inhibición de los procesos microbiológicos. Inst.Microbiología. Moscú, Rus. Centr. de Inv. Biol. p.3-7
115. Racker E. 1950. "Spectrophotometric measurements of the enzymatic formation fumaric acid and cis-aconitic acids", Biochem Biophys Acta. V.4.p.211-214

116. Radish E., D.Birger. 1982. "Cultivo de microorganismos"- Manual sobre métodos de investigación en microbiología y virología., Moscú., Ed.Medicina, p.63
117. Raunio R.P., Munter M.Y., Yaakola O.Y. Karpinen Y.T. D-aminoacids of the aminoacids pool occurrence of racemase and D-aminoacid oxydase activities in *Escherichia coli* B.- Folia Microbiol. 1978, v.23, n.5.,p.341.
118. Rodríguez M.J., Rangel G.L., Garza G.Y. 1993. Estudio de las condiciones de síntesis de L-tirosina a partir de fenol, acetato de amonio y piruvato de sodio por células de *C. freundii* nativas e inmovilizadas en k-carragenina. Biotecnología, Vol.3 No. 3 y 4, p: TE26-TE32
119. Rodríguez M.J. 1984. "Obtención de L-tirosina por células de *C.freundii* 62 con actividad TFL libres e inmovilizadas". Tesis Doctoral., Univ. Estatal de Moscú.
120. R.G.Binder., K.Numata., D.A.Lowe., T.Murakami and J.L.Brown. 1993. Isolation and characterization of a *Pseudomonas* strain producing glutaryl-7-aminocephalosporanic acid amylase. Appl. and Environment Microbiology. Oct.Vol.59. No.10, pp.3321-3326
121. Ruban E.L., Verbina R.M., Butienko S.A., Ozolin R.K., Zarin D.K. 1968. Biosíntesis de aminoácidos por microorganismos. Ed.<<Ciencia>>, p.185-200
122. Rudnick G., Abeles R.H. Reaction mechanism and structure of the active site of proline racemase.- Biochemistry. 1975, v.14, N.20, p.4515.
123. Sadabnukova M.S., Belikov V.M. 1978. Rutas de aplicación de aminoácidos en la industria. Serie Química,T.47, No.2, p.356-383.
124. Safonova E.N., Belikov V.M. 1974. Adelantos en el área de síntesis y producción de L-aminoácidos. Avances en Química. ,T.43, N0.9, p.1575-1609.
125. Sato T., Nishida I., Tosa T., Chibata I. 1979. Biochem Biopys Acta, V.570, No.1, p.179-186.
126. Sato T., Nishida Y., Tosa T., Chibata I. 1979. "Immobilization of *Escherichia coli* cells containing aspartase activity with carrageenan. Enzymatic properties and application for L-aspartic acid production". Biochem Biophys Acta., V.570., No.1.,p.179-186
127. Satoru Takamatsu., Kiyorazu Yamashita and Akihiko Sumi. 1980. Kinetic of production of L-aspartic acid by aspartase of immobilized *Escherichia coli* cells. J.Ferment Technol., Vol.58, No.2, p.129-133
128. Schlegel G. Hans. 1987. Microbiología General. Trad. Alemán-ruso.

129. Sholin A.F., Posdniakova T.M., Verner E.S., Demina H.G., Muradian A.G., Baruskov E.D., Ermakova H.G., Roshal E.R., Oros G.Y., Maneshin V.V. 1980. Problemas básicos de la tecnología de separación y purificación de aminoácidos y rutas para su solución. Pushino. Conf. Síntesis Microbiol. y Enzim. de aminoácidos. Acad.Cienc. Rus. p.40
130. Simona Buto., Loredano Pollegioni Luigi D'Angiuro and Mirella S.Pilone.1994. Evaluation of D-aminoacid oxidase from *Rhodotorula gracilis* for the production of  $\alpha$ -keto acids: A reactor system. Biotech. and Bioeng., Vol.44, pp.1288-1294.
131. Simon C.W. Kwong and Govind Rao. 1994. Metabolic monitoring by using the rate of change of NAD(P)H fluorescence. Biotech. and Bioeng., Vol.44, pp.453-459.
132. Sivolodsky E.P. 1979. "Method for determination of bacterial triptophandesaminase (L-aminoacidoxidase). Acad.Med. Leningrado,Rus., p.180
133. Skriavin G.K., Golovliova L.A. 1976. Empleo de microorganismos en síntesis orgánica. Ed.Ciencia, p.248-250.
134. Slock I., H. Sahm. 1984. L-isoleucine formation from L-ketobutyrate by *Corynebacterium glutamicum*. 3 Eur.Congress. Biotechnol. Munchen, 10-14 Sept. vol.1. Weinheim 1984. p.45-50.
135. Smith W.J., Inloes D.S., Mafin A., Robertson C.R., Cohen S.N. 1984. Biosynthesis of aspartase and production of aspartic acid in a hollow membrane fiber immobilized cell reactor. 3th. Eur. Congress Biotechnol. Munchen. 10-14 sept. Vol.1. Weinheim. p.975.
136. Stephanopoulos G. And Anthony J. Sinskey. 1993. Metabolic engineering. Methodologies and future prospects. Reviews. Elsevier Science Publisher. P: 392-396
137. Stephen A. Duniyak and Thomas M. Cook. 1985. Continuous fermenter growth of a methionine overproducing mutant of *Candida utilis*. Appl.Microbiol Biotechnol. 21.182-186.
138. Sumihisa Shiba., Yoshiro Nishida., Yong Soo Park., Shinji Lijma and Takeshi Kobayashi. 1994. Improvement of cloned  $\alpha$ -amylase gene expression in fed batch culture of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* by regulation both glucose and ethanol concentrations using a fuzzy controller. Biotech. and Bioeng. Vol.44. pp.1055-1063
139. Tagaki T., Taniguchi T., Yamamoto Y. and Shibatani T. 1991. Biotech. and Appl. Biochem., Vol.13, No.1, pp.112-119
140. Takaaki Tanaka, Keiichi Yamamoto, Sirintornthep Towprayoon, Hiroki Nakajima. Kenji Sonomoto, Kenzo Vokozeki, Koji Kubota and Atsuo Tanaka. 1989. Continuous production of L-serine by immobilized growing *Corynebacterium glycinophilum* cells. Appl. Microbiol Biotechnol. 30:564-568

141. Takeshi Nagayasu., Masamitsu Miyanaga., Takaaki Tanaka., Takaharu Sakiyama and Kazuhiro Nakanishi. 1994. Synthesis of dipeptide precursors with an immobilized thermolysin in ethyl acetate. *Biotech. and Bioeng.* Vol.43, pp.1108-1117
142. Takeshi Nagayasu., Masamitsu Miyanaga., Takaaki Tanaka., Takaharu Sakiyama and Kazuhiro Nakanishi. 1994. Synthesis of aspartame precursor with an immobilized thermolysin in tert amyl alcohol. *Biotech. and Bioeng.* Vol.43,pp-1118-1125.
143. Teper E.Z., Shilnikova V.K., Pereverzeva G.I. 1993. "Prácticas de Microbiología", Ed.Moscú-Coloso.,p.61-64
144. Tetsuya Tosa., Tadashi Sato., Takao Mori and Ichiro Chibata. 1974. Basic studies for continuous production of L-aspartic acid by immobilized *Escherichia coli* cells.*Appl. Microbiology.* Vol.27, No.5, p.886-889
145. Timakov V.D., Levashov V.S., Borisov L.B. 1983. "Microbiología". Ed. Moscú-Medicina., p.66-69
146. Tisichnaya I.V., Yakovleva V.I., Aren A.K. 1981. Métodos de obtención de formas L- de tirosina y 3,4-dihidroxifenilalanina. *Bioquim. y Microbiol. Apl. T.XVII*, No.5, p.645-659.
147. Tisichnaya I.V., Rodríguez M.J., Yakovleva V.I., Berezin I.V. 1984. Inmovilización de células de *Citrobacter freundii* con actividad tirosinfenoliasa por el método de atrapamiento en geles naturales. *Bioquím. y Microbiol. Apl. T.XX*, No.4, p.79-86.
148. Tosa T., Sato T., Matuo Y., Chibata I. 1973. Continuous production of L-aspartic acid by immobilized aspartase. *Biotech. & Bioeng.*, v.15., No.1, p.69- 84
149. Tosa T., Sato T., Mori T., Matuo Y and Chibata I. 1973. *Biotechnol & Bioeng.*, 15,69.
150. Tosa T., Sato T., Mori t., Yamamoto K., Takata I., Nishida I., Chibata I. 1979. *Biotech. & Bioeng.*, v.21, No.10, p.1697-1709
151. Toshihide N., Mamoru K., Minoru S. 1983. Process for producing L-glutamic acid. United Stated Patent. No.4,440,856
152. Tramper J. 1985. Immobilizing biocatalysts for use in synthesis. *Trends in Biotechnology.* Vol.3, No.2, p:45-50
153. Umbarger H.E. 1975. "Regulation of aminoacid biosynthesis in microorganisms// Synthesis of aminoacids and Proteins// Biochemistry. Serie 11., Edit.H.R.V. Arnstein, London; Baltimore, V.7, p.1-56
154. Umbarger H.E. 1978. Amino acid biosynthesis and its regulation.- *Ann.Rev. Biochem.*,v.47, p.533-605.

155. Van der Werf M.J., S. Hartman, W.J. Vender Tweel. 1995. Permeabilization and lysis of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* cells by triton X-100 for efficient production of D-malate. *Appl. Microbiol Biotechnol*, 43: 590-594
156. Van Sijdam J.C and J.A. Roels. 1993. Strategies of Biotechnological Industries. Pres. VI European Congress on Biotech. Firenze, Italy., Jun.13-17
157. Varbanietz L.D. 1980. "Proteínas de la membrana externa de bacterias gramnegativas". *Microbiología*., T.42., No.5., p.661-671
158. Vater J., Kleinkauf M. Gramicidin S-synthetase. A further characterization of Phe racemase the light enzyme of gramicidine S-synthetase- *Biochem Biophys Acta*,1976, v.429, N.3, p.1062.
159. Vojtisek V., Guttman T., Bárta M and Netrval J. 1985. Preparation of L- aspartic acid by means of immobilized *Alcaligenes metalcaligenes*. *Biotechnol. and Bioeng.*,Vol. XXVIII, p.1072-1079.
160. Vorobieva L.I. 1987. *Microbiología Técnica*. Ed.Univ. de Moscú. p.104-105, 129-132.
161. Vorobieva L.I. 1989. "Microbiología Industrial", Ed. Univ. de Moscú,Rus. 9:66-73
162. Williams V.R., Lartigue D.J. 1967. Quaternary structure and certain allosteric properties of aspartase.- *J.Biol.Chem*, v.242, No.12, p.2973-2978
163. Wood L. 1984. Immobilized microbial cell composition for making L-aspartic acid United States Patent. No. 4,436,813.
164. Yakovleva V.I. 1979. "Obtención de aminoácidos naturales con ayuda de catalizadores bioorgánicos", Serie *Biología Química. Avances en Ciencia y tecnología*. No.12
165. Yakovleva V.I., Malofeeva I.V., Zueva N.N., Andreeva A.P., Gubnitsky L.C., Shervakova V.N., Berezin I.V. 1979. "Síntesis de ácido L-aspartico a partir de fumarato de amonio por células de *E.coli* libres e inmovilizadas". *Bioquim. y Microbiol. Apl.*, T.15., No.3..p.328-336
166. Yakovleva V.I.,Berezin I.V. 1980. Aspectos fisicoquímicos y bioquímicos de la utilización de células de microorganismos libres e inmovilizadas para la obtención de L-aminoácidos. *Conf. sobre aminoácidos para la agricultura, industria alimentaria, salud e investigación*. Frunze, URSS., p.63-64
167. Yamada H., Kumagai H., Enei H. 1972. *Pros.IYIFS; Ferment Technol.Today* p.445.
168. Yamada K. Recent advances in industrial fermentation in Japan.- *Biotechnol and Bioeng.*, 1977, v.19, N.11, p.1563.

169. Yoichi Kitsuta and Michimasa Kishimoto. 1994. Fuzzy supervisory control of Glutamic acid production. *Biotechnol. and Bioeng.* Vol.44, pp.87-94.
170. Yokote Y., Maeda S., Yabushita N., Noguchi S., Kimura K., Samejima N.1978. Production of L-aspartic acid by *E.coli* aspartase immobilized on phenol-formaldehyde resin.- *J.Soli fase Biochem.*, v.3, No.4., p.247-261.
171. Yoshida N. Tanaka Y., Nakayama K. 1974. Production L-DOPA by *Pseudomonas melanogenum*.- *Agric. Biol. Chem.*, v.38, N.2, p.455
172. Yoshida H., Tanaka Y., Nakayama K. 1974. Properties of tyrosinase from *Pseudomonas melanogenum*.- *Agric. Biol. Chem.*, v.38, N.3, p.627.
173. Yukawa H., Nara T., Takayama Y. 1982. Process for production of L-aspartic acid. United States Patent. No. 4,326,029.
174. Zagan Z.S. 1969. Regulación alostérica de enzimas del metabolismo del nitrógeno en las plantas.- *Avances en Ciencia y Tecnología.*, Ser. Biol.Quím. p.310-312.
175. Zueva N.N., Shervakova V.N., Yakovleva V.I., Avsiuk I.V., Chan Txi Mai and Berezin I.V. 1980. "The kinetic mechanism of L-aspartate synthesis from ammonium fumarate catalyzed by free and immobilized cells of *E.coli*". *Biochem.*,T.45., No.12., p.2202- 2216
176. Zueva N.N., Schervakova V.N., Yakovleva V.I., Nikitin Y.S., Avsiuk I.B., Chan Tji Tuet May., Berezin I.V. 1980. Posibilidades de utilización de soportes sólidos para el armado del gel de poliacrilamida para la inmovilización de células de *E.coli*.-*Bioquim y Microbiol Apl.*, T.15, No.6, p.918-924.
177. Zueva N.N., Yakovleva V.I., Avsiuk I.V., Aren A.K., Fechina V.A., Berezin I.V. 1982. Estabilidad de los biocatalizadores para la síntesis de ácido L-aspártico en base a células de *E.coli* inmovilizadas.- *Bioquim. y Microbiol.Apl.*, T.18, No.5, p.681-687
178. Zueva N.N., Yakovleva V.I., Berezin I.V. 1982. Características y significado práctico de la aspartatoamoníacoliase. *Ciencias Biológicas*, No.5.p.5-17.
179. Zueva N.N., Yakovleva V.I., Veriovkin A.N., Avsiuk I.V., Aren A.K., Berezin I.V. 1985. Comparación de la actividad aspartasa y su estabilidad en células de *Escherichia coli* inmovilizadas en gel de poliacrilamida y carragenina. *Bioquim. y Microbiol Apl.* T.XXI, No.3, p. 334-341.





DONATIVO

