

L-Fenilalanina amonio liasa (PAL) de *Rhodospiridium toruloides* NBRC 0559.

Producción, caracterización e inmovilización por encapsulación en membranas celulósicas.

María Teresita Castañeda^{1,2,3,✉}; Osao Adachi⁴; Roque Alberto Hours^{1,2}

¹ Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias y Tecnología de Materiales (CITEMA), UTN-CICpBA, Laboratorio de Biotecnología, Departamento de Ingeniería Química, Universidad Tecnológica Nacional-Facultad Regional La Plata, Argentina.

² Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI), UNLP-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

³ Grupo de Control Aplicado (GCA), Instituto LEICI, UNLP-CONICET, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

⁴ Department of Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Yamaguchi University, Yamaguchi, 753-8515, Japan.

✉ castaneda@biotec.quimica.unlp.edu.ar

Resumen

Con el objetivo de diseñar un biocatalizador para la reducción del contenido en L-Fenilalanina con aplicación a la producción de fórmulas para pacientes con Fenilcetonuria, PAL fue obtenida a partir de *Rhodospiridium toruloides* NBRC 0559. Luego, PAL fue recuperada, purificada, inmovilizada por encapsulación en membranas semipermeables y empleada en: a) reactor de columna con recirculación y b) reactor tipo tanque agitado. La bioconversión se monitoreó espectrofotométricamente (DO_{290}) siguiendo la producción de ácido *t*-cinámico. La enzima obtenida evidenció una elevada actividad enzimática, gran afinidad por el sustrato y una temperatura óptima de $\sim 43^\circ\text{C}$. En cuanto al empleo de PAL inmovilizada, la utilización de un reactor tipo tanque agitado resultó óptima para la reducción de L-fenilalanina dado el efecto de la agitación en la reducción del espesor de la película estanca adyacente a la membrana. El factor más influyente en la velocidad de reacción fue el espesor de membrana, alcanzando de este modo la eliminación completa de una solución 0,1 mM de L-Fenilalanina en 6 h. En conclusión, PAL inmovilizada por encapsulación en membranas celulósicas es un método viable para la reducción del contenido de L-Fenilalanina en soluciones diluidas. Este método podría extrapolarse a sustratos más complejos como lo son hidrolizados proteicos.

Abstract

For the design of a biocatalyst capable of reducing the L-Phenylalanine content to produce formulas for Phenylketonuria patients, PAL was obtained from *Rhodospiridium toruloides* NBRC 0559. PAL was produced, recovered from the culture medium, purified, immobilized by encapsulation in semipermeable membranes and used in: a) column reactor with recirculation and b) stirring tank reactor. The bioconversion was spectrophotometrically monitored (OD_{290}) by *t*-cinnamic acid production. PAL demonstrated to have high activity and affinity for L-Phenylalanine, with an optimal temperature of $\sim 43^\circ\text{C}$. In relation to PAL utilization, the stirring tank reactor was the most appropriate system for bioconversion because of agitation effect in the diffusion of substrate and products to the membrane. In addition, membrane wall thickness was a key factor in bioconversion rate, reaching the complete removal of 0,1 mM L-Phenylalanine in 6 h. These results indicate that purified PAL immobilized by encapsulation in semipermeable membranes can be applied for the reduction of L-Phenylalanine content in diluted solutions. It could be potentially used with protein hydrolysates as a model substrate in the development of low L-Phenylalanine foodstuff.

Palabras clave: L-Fenilalanina amonio liasa; *Rhodosporidium toruloides*; Fenilcetonuria; Biocatalizador inmovilizado; Encapsulación de enzimas.

Keywords: L-Phenylalanine ammonia lyase; *Rhodosporidium toruloides*; Phenylketonuria; Immobilized biocatalyst; Enzyme encapsulation.

Recibido: 28 de Diciembre de 2018

Aceptado: 06 de Mayo de 2019

Publicado: 19 de Junio de 2019



Esta obra está bajo licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es_AR

Introducción

La enzima L-Fenilalanina amonio liasa (PAL, EC 4.3.1.25) cataliza la desaminación de L-Fenilalanina (L-Phe) y de L-Tirosina (L-Tyr) produciendo ácido *t*-cinámico (*t*-CA) y ácido *p*-cumárico, respectivamente (Fig. 1) (KEGG, 2015). PAL se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, principalmente en plantas superiores y microorganismos. En las plantas superiores, PAL es la enzima clave en la ruta de los fenilpropanoides (Kong, 2015) mientras que en microorganismos tiene un rol catabólico, permitiéndoles emplear a la L-Phe como fuente de carbono y de nitrógeno (Ogata et al., 1967). Entre los microorganismos, la levadura *Rhodospiridium toruloides* es uno de los más empleados para la síntesis de PAL, debido a su elevada actividad (Ogata et al., 1967) y a su versatilidad nutricional (NCYC, 2015). PAL es una de las pocas enzimas no hidrolíticas que ha sido extensamente estudiada para su aplicación industrial (MacDonald et al., 2007). Por un lado, la reacción inversa de PAL se ha utilizado en la producción de L-Phe para su uso tanto en la industria farmacéutica para la formulación de suplementos dietéticos como en la industria alimenticia para la producción del edulcorante aspartamo (Cui et al., 2014). Por otro lado, la reacción de desaminación de L-Phe tiene gran interés en el campo de la Medicina por su aplicación para la detección (Borrajo et al., 2016; Wang et al., 2006) y el tratamiento de la fenilcetonuria (Longo et al., 2014).

La Fenilcetonuria (PKU) y en su versión más leve las hiperfenilalaninemias (HPA), son desordenes metabólicos congénitos caracterizados por la alteración en el metabolismo de la L-Phe debido a la deficiencia total o parcial de la enzima L-Fenilalanina hidroxilasa (PAH; EC 1.14.16.1). Como consecuencia de esta deficiencia, la L-Phe se acumula en el torrente sanguíneo ocasionando graves trastornos cognitivos y microcefalia (Devlin, 1997). En las últimas décadas, se han desarrollado pruebas clínicas para detectar tempranamente a la enfermedad; sin embargo, no existe hasta la fecha un tratamiento efectivo más allá de la limitación del consumo de alimentos proteicos que contengan L-Phe en su composición. Esto implica que los pacientes, dependiendo de la severidad de la enfermedad, deben seguir una estricta dieta, baja en proteínas (Cleary, 2015). Debido a la importancia del consumo de proteínas para el desarrollo, los pacientes con PKU deben suplir la deficiencia en aminoácidos esenciales mediante la ingesta de fórmulas consistentes en una mezcla de aminoácidos sintéticos con escaso o nulo contenido de L-Phe y eventualmente suplementados con un exceso de L-Tyr (Vockley et al., 2013). Estas fórmulas y algunos tratamientos alternativos no están disponibles en la mayoría de los países subdesarrollados o en vías desarrollo, y en aquellos donde lo están, tienen costos

muy elevados, perjudicando seriamente la economía familiar de los pacientes (Cleary, 2015; Soltanizadeh et al., 2014).

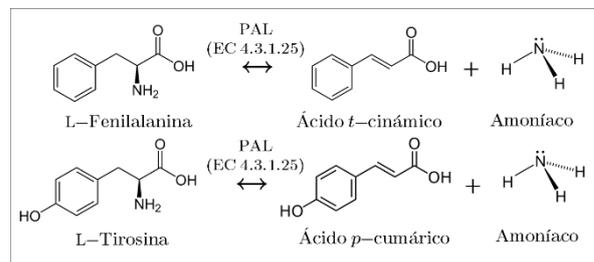


Fig. 1. Reacciones catalizadas por L-Fenilalanina amonio liasa de *Rhodospiridium toruloides* NBRC 0559.

En Argentina, la incidencia de PKU y HPA es de 1:28.239 y 1: 24.260, respectivamente (Borrajo, 2012). Entre las empresas farmacéuticas más importantes que comercializan fórmulas para pacientes con PKU en nuestro país se encuentran Nutricia Bago y B'life. Ambas cuentan con una serie de productos especialmente formulados, los cuales se fabrican en el exterior y, en el mejor de los casos, se fraccionan localmente y comercializan en nuestro país. La escasa o nula producción nacional de fórmulas o sustitutos, sumado a los elevados costos de las mismas, requieren el abordaje de soluciones más prácticas, económicas y fácilmente aplicables en las industrias locales.

Nuestro grupo de trabajo ha trabajado en los últimos años en el diseño de biocatalizadores consistentes en PAL de *R. toruloides* NBRC 0559 para su empleo en la reducción del contenido de L-Phe de hidrolizados proteicos y su potencial uso como alternativa a las fórmulas sintéticas. En estudios previos (Castañeda et al., 2015), se desarrolló un extracto enzimático enriquecido en PAL y se determinaron las condiciones óptimas de tratamiento para la reducción de L-Phe en sustratos proteicos modelo. Si bien se alcanzaron muy buenos resultados a escala laboratorio, su empleo a nivel industrial requiere de biocatalizadores altamente activos, estables en condiciones de reacción, fácilmente recuperables y reutilizables, y adaptables a diferentes configuraciones de reactores. En muchos procesos industriales, la utilización de enzimas ha sido posible gracias a su inmovilización, permitiendo alcanzar los objetivos anteriores y logrando que el proceso biotecnológico sea económicamente rentable (Arroyo, 1998). La inmovilización implica confinar o localizar el biocatalizador en una región definida del espacio, con retención de su actividad catalítica y, si es necesario, de su viabilidad, para poder utilizarlo de modo repetido y continuo (Aehle (Ed.), 2006). Aun cuando hay gran cantidad de protocolos de inmovilización, la aplicación de biocatalizadores inmovilizados a escala industrial requiere de métodos

simples y robustos. Algunos de los métodos más empleados son métodos físicos de inmovilización en los cuales no hay interacción química entre la enzima y el soporte. Dentro de estos métodos se encuentra la encapsulación de enzimas en la cual la enzima se retiene dentro de una membrana semipermeable que permite el pasaje de sustratos y productos a través de esta (Illanes et al., 2008). Esta tecnología es aplicada en el diseño de reactores de fibra hueca, los cuales han sido previamente estudiados para la disminución de niveles de L-Phe en sangre como posible tratamiento de PKU (Ambrus et al., 1987; Larue et al., 1986).

El objetivo de este trabajo fue producir, caracterizar e inmovilizar un biocatalizador consistente en PAL de *R. toruloides*, para su aplicación en la reducción del contenido de L-Phe en vista a su potencial empleo en la producción de sustitutos alimenticios para pacientes con PKU y HPA.

Desarrollo

Cepa microbiana y Materiales

La cepa *R. toruloides* NBRC 0559, obtenida del Institute for Fermentation Osaka, fue mantenida en agar inclinado (Adachi et al., 1990). Los reactivos: L-Phe, *t*-CA, tris(hidroximetil)aminometano (Tris) fueron obtenidos de Wako Pure Chemicals Co. (Osaka, Japón) mientras que el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) fue adquirido de Dojindo Molecular Technologies Inc. (Kumamoto, Japón). Finalmente, las membranas de celulosa para diálisis (UC 8-32-25 y UC 20-32-100) fueron productos de Eidia Co., Ltd. (Tokio, Japón).

Cultivo de R. toruloides

La levadura *R. toruloides* fue cultivada en el medio de cultivo para inducción de PAL reportado por Yamada et al. (1981). Este medio contiene (por litro): 10 g de extracto de levadura, 10 g de peptona, 5 g NaCl, 0,5 g L-Phe, y 5 g L-isoleucina (pH 6,0). La fermentación se llevó a cabo en cultivo sumergido en erlenmeyers de 3 litros conteniendo 600 ml de medio de cultivo. Se inoculó con células frescas (de no más de una semana) a razón de $1,5 \cdot 10^7$ UFC/ml. Los erlenmeyers se incubaron en shaker rotatorio a 200 rpm y 30°C. Al cabo de 24 h las células fueron cosechadas mediante centrifugación (4.000 rpm, 5 min, 5°C), lavadas con solución fisiológica y centrifugadas nuevamente para colectar el pellet de levaduras. El pellet obtenido se almacenó a -20°C hasta su utilización.

Purificación de PAL

La PAL fue purificada mediante protocolo de Adachi et al. (1990), con algunas modificaciones. El primer paso del protocolo consistió en la disrupción celular dada la naturaleza intracelular de la enzima. Ésta se llevó a cabo mediante dos pasajes por una prensa francesa

con posterior eliminación de restos celulares mediante centrifugación (10.000 g, 30 min). Seguidamente, se prosiguió con un tratamiento térmico a 50°C por 5 min con agitación constante, luego de lo cual se sumergieron los tubos en un baño de agua/hielo. Esta etapa tuvo como finalidad desnaturalizar algunas proteínas de baja estabilidad térmica y con ello eliminar gran cantidad de proteínas contaminantes. El precipitado se eliminó por centrifugación (10.000 rpm, 20 min). El siguiente paso consistió en una cromatografía de intercambio iónico con DEAE-celulosa equilibrada con buffer Tris-HCl (10 mM, pH 8). Las fracciones conteniendo PAL se eluyeron a 0,2 M de KCl. Las fracciones obtenidas se concentraron por precipitación empleando sulfato de amonio al 70% de saturación y luego se disolvieron en buffer fosfato de potasio (KPB, 5 mM, pH 7,5). Seguidamente, la muestra se dializó por 8 h en condiciones de refrigeración. La solución dializada se inyectó en una columna de hidroxapatita y se eluyó con 50 mM de KPB (pH 7,4). Luego, se concentró nuevamente con sulfato de amonio al 80% y se dializó. A continuación, la solución enzimática se inyectó en una columna Sephadex G-200 y se eluyó con KPB (50 mM, pH 7,5). Las fracciones fueron nuevamente sometidas a diálisis. Finalmente, la enzima obtenida a partir de este protocolo se liofilizó y se almacenó a -80°C hasta su uso. Para su empleo, la PAL liofilizada (0,18 U/mg) se reconstituyó en buffer Tris-HCl (0,1 M, pH 8,5, 1 mM EDTA), a razón de 128 mg/ml. Esta solución se mantuvo refrigerada hasta su uso.

Determinación de actividad PAL

La actividad enzimática de PAL se determinó por el método modificado de Ogata et al., 1967. La mezcla de reacción contenía 2,5 mM L-Phe, 25 mM buffer Tris (pH 8,5, 1 mM de EDTA), y la solución enzimática. La reacción fue iniciada con el agregado de PAL y se monitoreó la formación de *t*-CA espectrofotométricamente a 290 nm y 25°C, utilizando su correspondiente coeficiente de extinción molar. Una unidad de PAL es definida como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μmol de *t*-CA por minuto en las anteriores condiciones de reacción.

Caracterización de PAL purificada

La PAL purificada se caracterizó en términos de concentración de biocatalizador. Para ello, se determinó la influencia de la concentración de PAL en la velocidad inicial de reacción. A una solución 2,5 mM de L-Phe en buffer Tris-HCl (0,1 M, pH 8,5) se agregó PAL en concentraciones crecientes (~ 2 a 25 mU/ml). La reacción se llevó a cabo en cubeta y se siguió la cinética espectrofotométricamente a 290 nm por 10 min.

Por otro lado, PAL se caracterizó cinéticamente con la finalidad de determinar si la enzima seguía una cinética del tipo Michaelis-Menten. Para ello, se emplearon concentraciones crecientes de L-Phe (0 a 5 mM) en buffer Tris-HCl (0,1 M, pH 8,5) y se le adicionó PAL en una concentración de 10,3 mU/ml en la mezcla de reacción. Se determinó la velocidad inicial de reacción mediante la pendiente de la recta de formación de *t*-CA, la cual se calculó a partir de la cinética registrada espectrofotométricamente a 290 nm para cada concentración. Para la determinación de los parámetros cinéticos (v_{max} y K_m) se empleó el método de linealización de Lineweaver-Burk.

Finalmente, la temperatura óptima de PAL purificada se determinó por incubación de la solución de 1 mM de L-Phe en Tris-HCl (0,1 M, pH 8,5, 5 mM EDTA) con PAL en concentración final de 206 mU/ml, a diferentes temperaturas (20 a 70°C) por el término de 2 h. Luego, las muestras se sumergieron en un baño de hielo, se centrifugaron (10.000 rpm, 20 min) y se midió el *t*-CA formado por espectrofotometría a 290 nm.

Inmovilización por encapsulación de PAL

La PAL purificada fue inmovilizada en tubos de diálisis constituidos por membranas de celulosa Viskase Corp., UC 8-32-25 y alternativamente UC 20-32-100 con un espesor de 0,0508 mm y 0,0203 mm, respectivamente. La enzima encapsulada dentro de la membrana semipermeable se mantuvo en condiciones de refrigeración en buffer hasta su utilización.

La PAL encapsulada en membranas de 0,0508 mm fue utilizada en dos tipos de reactores: (a) Reactor de columna, (b) Reactor tipo tanque agitado.

Para el caso (a), la PAL encapsulada fue colocada en una columna (17 mm × 120 mm) en contacto con una solución de 1 mM de L-Phe en buffer Tris-HCl (0,1 M, pH 8,5, 5 mM EDTA). Se emplearon para este fin 100 µl de la enzima pura (~2 U totales). La solución conteniendo el sustrato (30 ml) fue recirculada mediante una bomba peristáltica con un flujo de 1,3 ml/min. La cinética de reacción se monitoreó espectrofotométricamente (DO_{290}) y se correlacionó la producción de *t*-CA con la reducción de L-Phe.

Por otro lado, para el caso (b), PAL encapsulada fue colocada en un recipiente (50-100 ml de capacidad) con agitación magnética en contacto con la mezcla de reacción, simulando un reactor tipo tanque agitado. Para este sistema se estudiaron dos variables. Por un lado, se evaluó la influencia del espesor de la membrana en la difusión del sustrato y producto a través de la membrana.

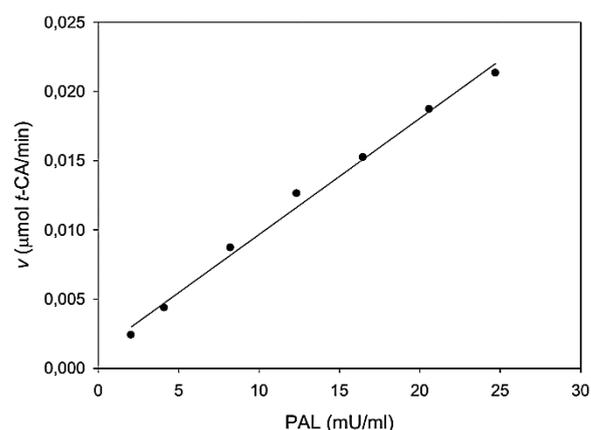


Fig. 2 Influencia de la concentración de PAL en la velocidad inicial. Sustrato: 2,5 mM de L-Phe en buffer Tris-HCl (0,1 M, pH 8,5) y temperatura de reacción: 30°C.

$$\text{Correlación: } y = 9.10^{-4} x, R^2 = 0,9823$$

Para ello, se comparó en simultáneo las membranas UC 8-32-25 y UC 20-32-100. Luego, un volumen de 100 µL (~ 2 U totales) de PAL fue incluido en cada membrana y se colocaron en 10 ml de mezcla de reacción consistente en una solución de 0,1 mM L-Phe en buffer Tris-HCl (0,1 M, pH 8,5, 5 mM EDTA). La biotransformación se llevó a cabo a 30°C y se tomó muestra cada 20 min para registrar la cinética de reacción. Al igual que en el ensayo anterior, la cuantificación del *t*-CA formado se llevó a cabo mediante la determinación de DO_{290} y se correlacionó su producción con la disminución del contenido de L-Phe. Otra variable estudiada en este sistema fue la cantidad de enzima inmovilizada en la membrana. Con esto se desea determinar si se puede hallar una mejora del proceso mediante el aumento de la cantidad de biocatalizador. Con este fin, se colocaron diferentes volúmenes de PAL para alcanzar actividad total de ~ 2

U y 6 U. Las membranas (0,0203 mm de espesor) conteniendo la enzima en diferente proporción, se incubaron en contacto con 10 ml de una solución 0,1 mM de L-Phe en buffer Tris-HCl (0,1 M, pH 8,5, 5 mM EDTA), a 25°C. Se tomaron muestras periódicamente y se analizaron midiendo DO_{290} , de la misma forma descrita anteriormente.

Resultados y Discusión

Caracterización de la PAL purificada

La PAL purificada fue caracterizada para determinar los principales parámetros cinéticos y tecnológicos para su empleo como biocatalizador en la reducción de L-Phe. En primer lugar, se determinó la influencia de la concentración del biocatalizador en la velocidad inicial de reacción. En la Fig. 2 podemos ver que el incremento en la concentración de PAL originó un aumento proporcional de la velocidad de reacción. Esta relación implicaría por ejemplo que para lograr la bioconversión completa equivalente a 3 h de una

solución 2,5 μmol de L-Phe se requiere una $v = 0,0139$ $\mu\text{mol}/\text{min}$ de t-CA. Si la reacción transcurriera a velocidad inicial, bastarían con 15,4 mU de PAL por ml de solución, lo cual equivale a 0,67 μl de la enzima pura o bien 33,5 μl de una dilución 1/50 de la misma. En conclusión, la enzima tiene una elevada actividad lo que resulta un requisito fundamental teniendo en cuenta los costos de su producción y purificación.

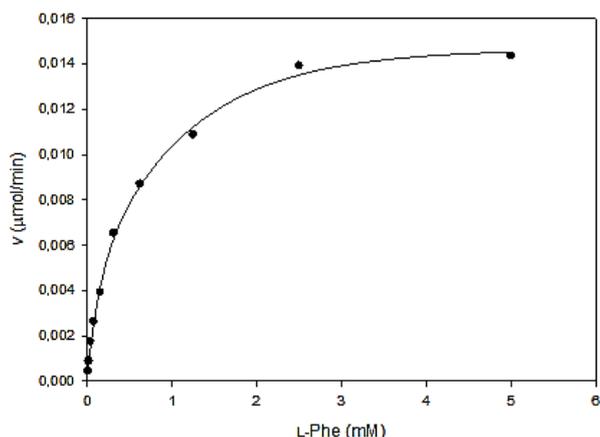


Fig. 3. Cinética de PAL purificada. Diferentes concentraciones de L-Phe en Tris-HCl (0,1 M, pH 8,5) fueron tratadas con 10,3 mU/ml de PAL a 30 °C.

En lo que respecta a la cinética de PAL purificada, como puede observarse en la Fig. 3, esta resultó una cinética del tipo Michaelis-Menten. Estos resultados concuerdan con observaciones previamente reportadas (Adachi et al., 1990; MacDonald et al., 2007). La determinación de los parámetros cinéticos se llevó a cabo mediante la linealización de Lineweaver-Burk, obteniéndose una v_{max} de 0,011 mM/min y un K_m de 0,23 mM. Este último valor está por debajo de los valores previamente reportados para la PAL pura de *Rhodospiridium toruloides* y *Rhodotorula glutinis*, los cuales fueron de 0,29 y 0,25, respectivamente (Adachi et al., 1990; MacDonald et al., 2007). Esto indicaría una mayor afinidad de nuestra enzima por L-Phe. Sin embargo, este valor resulta orientativo, ya que depende de las condiciones ensayadas.

Finalmente, se sabe a partir de estudios previos que PAL es estable hasta temperaturas de 50°C por 10 min (MacDonald et al., 2007). De hecho, ésta es una de las propiedades que se utiliza ventajosamente para su purificación. Sin embargo, hay muy poca información acerca de su temperatura óptima de reacción. Este parámetro tecnológico es muy importante ya que el incremento de la temperatura aumenta considerablemente la velocidad de la reacción; sin embargo, por encima de cierta temperatura la enzima puede ser afectada e incluso inactivada por desnaturalización. En la Fig. 4 puede observarse un leve incremento de la producción de t-CA con la temperatura hasta los $\sim 43^\circ\text{C}$ para luego disminuir abruptamente a partir de los 50°C. Estos resultados

están en concordancia con datos recientemente publicados para PAL de *Rhodotorula glutinis* (MacDonald et al., 2016; Barron et al., 2017). Aun cuando la temperatura óptima resultó ser de 43°C, no se observan mejoras considerables ($\sim 8\%$ de incremento) respecto de trabajar a 30°C (temperatura empleada usualmente para la biocatálisis de PAL). Estos resultados, sumado al ahorro del gasto energético necesario para calefaccionar el biorreactor y el estricto control necesario para evitar que la temperatura se eleve por encima de esos valores y se inactive la enzima, derivaron en la decisión de trabajar a 30°C en los ensayos posteriores.

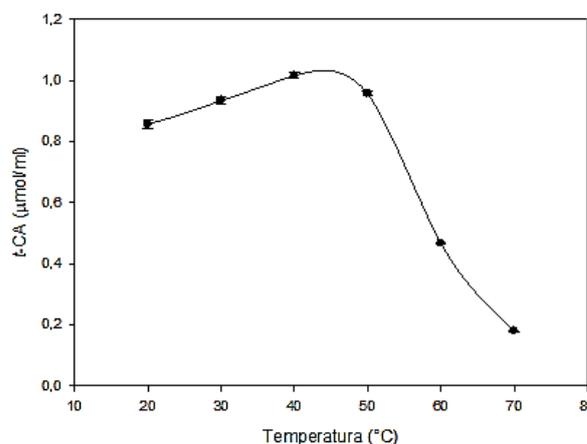


Fig. 4. Temperatura óptima para PAL pura. 1 mM de L-Phe en buffer Tris-HCl (0,1 M, pH 8,5, 5 mM EDTA) se trató con 206 mU/ml de PAL durante 2 h.

Bioconversión de L-Phe en columna con recirculación empleando PAL encapsulada en membranas.

La PAL pura encapsulada en membranas celulósicas se empleó en un biorreactor tipo columna con recirculación. Del análisis de la cinética de reacción (Fig. 5) podemos ver que hubo un retardo al principio de la reacción. Luego, la cinética de reducción de L-Phe fue prácticamente lineal hasta las 4 h, cuando la velocidad de reacción comenzó a decrecer. Finalmente, tras 6 h de proceso menos del 20% del contenido inicial de L-Phe fue eliminado. En el caso hipotético que la reacción hubiese transcurrido a velocidad inicial, la enzima libre en las cantidades utilizadas debería producir la completa biotransformación de toda la L-Phe contenida en la mezcla de reacción en aproximadamente 15 min. Los tiempos se incrementaron en estos casos porque la velocidad disminuyó en el transcurso de la reacción probablemente por la incorporación de una barrera de difusión hacia la enzima constituida por la membrana en la cual está encapsulada. Como se mencionó anteriormente, más del 80% de la L-Phe permaneció en la solución. El incremento en el tiempo de reacción no es una opción factible en este caso particular, ya

que se trata de uno de los parámetros que se desea optimizar.

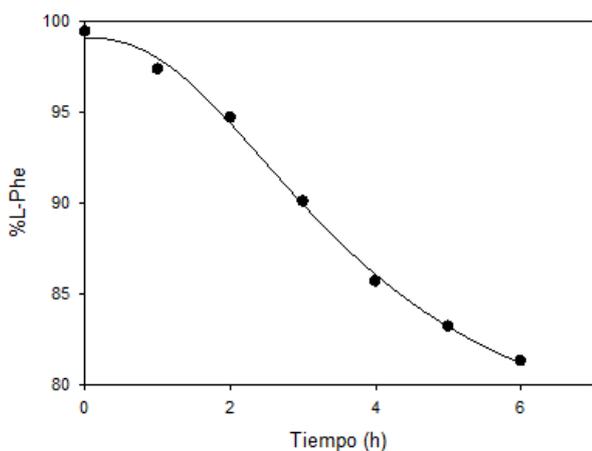


Fig. 5. Reducción de L-Phe con PAL inmovilizada en un reactor tipo columna. 30 ml de una solución 1 mM de L-Phe se trató con 100 μ l (~2 U totales) de PAL encapsulada en membrana de 0,0508 mm de espesor.

Adicionalmente, como puede apreciarse en la Fig. 5, la velocidad de reacción decreció entre las 4 y 6 h de reacción, con lo cual el incremento de tiempo no se traducirá en mejoras considerables.

A partir de estos resultados, podemos inferir que existen factores independientes a la enzima que están ocasionando una reducción de la velocidad de reacción. Estos factores pueden tratarse de barreras difusionales tanto externas a la membrana como propias de las mismas. Luego de realizar numerosas pruebas llegamos a la conclusión de que la agitación del sistema no era suficiente para asegurar la correcta difusión del sustrato y del producto hacia y desde la membrana. La agitación en un biorreactor de columna está restringida al pequeño flujo de la mezcla de reacción, con lo cual ésta es una mejora que puede incorporarse al sistema empleando otro tipo de biorreactor que permita una buena agitación. En general, el sistema en columna no logró resultados satisfactorios.

Bioconversión de L-Phe en tanque agitado empleando PAL encapsulada en membranas.

Para estudiar los problemas observados en el reactor de columna, se simuló un reactor tanque agitado mediante la incorporación de la enzima encapsulada en membranas en la mezcla de reacción contenida en un vaso de precipitado con agitación magnética. La concentración de L-Phe en la muestra se disminuyó 10 veces para facilitar la bioconversión en un tiempo razonable. A partir de este sistema se estudiaron dos variables: el espesor de la membrana y la cantidad de enzima encapsulada en la misma.

En lo que respecta a la primera variable, se evaluaron dos membranas de diferente espesor (0,0508 mm y

0,0203 mm). Las cinéticas obtenidas se muestran en la Fig. 6. La cinética de reacción para la membrana de mayor espesor resultó, en esta oportunidad, lineal. Esta mejora respecto a la cinética en columna (Fig. 5) se atribuye a la agitación del sistema, la cual probablemente disminuyó el espesor de la película estanca alrededor de la membrana y, con ello, la resistencia de difusión hacia y desde la membrana. En lo que respecta al espesor de la membrana, el uso de una membrana de menor espesor se tradujo en un incremento considerable de la velocidad inicial de reacción. Luego de unas horas, esta velocidad se desaceleró debido a la disminución de las concentraciones de L-Phe en la mezcla de reacción. Con la membrana original (0,0508 mm de espesor), se pudo reducir alrededor del 46% del valor original de L-Phe luego de 6 h de reacción.

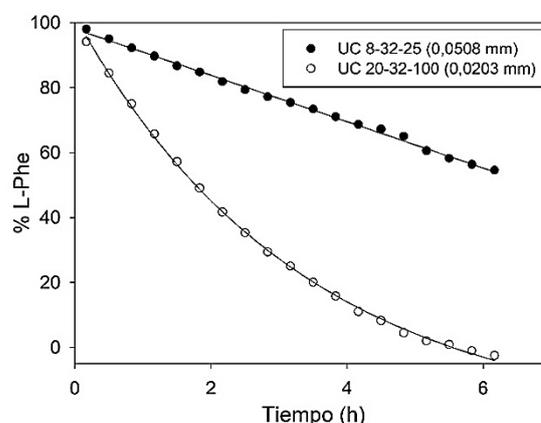


Fig. 6. Efecto del espesor de membrana en la reducción de L-Phe empleando PAL inmovilizada en un reactor tipo tanque agitado. 10 ml de una solución 0,1 mM de L-Phe se trató con 100 μ l (~2U totales) de PAL encapsuladas

Debido a que la cinética fue lineal, esta reducción pudo ser mayor si se aumentaba el tiempo. Por otro lado, con la membrana de menor espesor se logró la reducción del 100% del contenido de L-Phe en 6 h. La mejora alcanzada evidencia el efecto del espesor de la membrana como barrera difusional.

Por otro lado, se determinó la influencia de la relación enzima/sustrato en la velocidad de reacción, aumentando en 3 veces la cantidad original de enzima incluida en la membrana (de ~2 a 6 U). El incremento de la cantidad de PAL encapsulada en la membrana no logró mejoras substanciales en la cinética de PAL inmovilizada (datos no mostrados). Este dato es importante considerando el costo que significaría triplicar la producción de la enzima pura.

En resumen, la enzima pura inmovilizada por encapsulación en membranas celulósicas es un método factible para la reducción de soluciones diluidas de L-Phe, del orden de 0,1 mM. Las barreras difusionales externas a la membrana se pudieron

reducir mediante el uso de un reactor tipo tanque agitado. Se presume que dicha mejora se debió al incremento en la agitación. Finalmente, en lo que respecta a la barrera difusional constituida por la membrana, la cinética de PAL se incrementó notablemente reduciendo, a más de la mitad, el espesor de la membrana. Una vez que se disminuyeron los problemas difusivos, se encontró que el incremento en 3 veces de la concentración de PAL no logró mejoras substanciales.

Conclusiones

PAL purificada presenta propiedades cinéticas y tecnológicas interesantes para su uso a escala industrial. Entre ellas podemos nombrar una elevada actividad enzimática, buena afinidad por el sustrato (ligeramente superior a las reportadas previamente), no sufre inhibición por altas concentraciones de sustrato ya que sigue una cinética tipo Michaelis-Menten, y puede trabajar a un amplio rango de temperaturas con una elevada actividad enzimática. El método de inmovilización ensayado resultó simple, económico, reutilizable, inocuo pensando en su aplicación en un producto alimenticio y, al tratarse de un método físico, no afecta la estabilidad de la enzima. Se lograron mejoras sustanciales al trabajar con membranas de bajo espesor y empleando biorreactores con agitación, alcanzando la disminución total de L-Phe en soluciones diluidas en tiempos de proceso razonables. Estos resultados sirven como base para el diseño de biorreactores tipo fibra hueca. Por otro lado, dado que la purificación total de la enzima es un proceso muy costoso y que el objetivo final de nuestro grupo de trabajo es desarrollar fórmulas de origen natural libres de L-Phe económicas, resulta indispensable continuar indagando en métodos alternativos de obtención e inmovilización de PAL.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por proyectos de CONICET (PIP 0662), de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP, 11/X650) y de la Universidad Tecnológica Nacional (UTN, 25/I060). Además, parte de este trabajo se solventó por fondos otorgados al Prof. Adachi (KAKENHI 23580135). Finalmente, gran parte de estos estudios fueron realizados durante una estadía de Investigación en Japón de M.T.C. financiada a través del programa BEC.AR.

Referencias bibliográficas

Adachi, O., Matsushita, K., Shinagawa, E., & Ameyama, M. (1990). Crystallization and properties of L-phenylalanine ammonia-lyase from *Rhodospiridium toruloides*. *Agricultural and Biological Chemistry*, *54*(11), 2839-2843.

Aehle, W. (Ed.). (2006). *Enzymes in industry: products and applications*. John Wiley & Sons.

Ambrus, C. M., Anthone, S., Horvath, C., Kalghatgi, K., Lele, A. S., Eapen, G., ... & Li, P. (1987). Extracorporeal enzyme reactors for depletion of phenylalanine in phenylketonuria. *Annals of Internal Medicine*, *106*(4), 531-537.

Arroyo, M. (1998). Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharmaceutica*, *39*(2), 23-39.

Barron, C. C., Sponagle, B. J., Arivalagan, P., & D'Cunha, G. B. (2017). Optimization of oligomeric enzyme activity in ionic liquids using *Rhodotorula glutinis* yeast phenylalanine ammonia lyase. *Enzyme and Microbial Technology*, *96*, 151-156.

Borrajo, G. J. (2012). Epidemiologic view of phenylketonuria (PKU) in Latin America. *Acta Pediátrica de México*, *33*(6), 279-287.

Borrajo, G., Castañeda, M. T., Hours, R. (2016). Improved Procedure for Obtaining Lyophilized Phenylalanine Free Serum Using Phenylalanine Ammonia Lyase. ISNS 9th International Symposium, The Hague, The Netherlands, September 11-14, 2016. *International Journal of Neonatal Screening*, *2*(3), 5.

Castañeda, M. T., Adachi, O., & Hours, R. A. (2015). Reduction of L-phenylalanine in protein hydrolysates using L-phenylalanine ammonia-lyase from *Rhodospiridium toruloides*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, *42*(10), 1299-1307.

Cleary, M. A. (2015). Phenylketonuria. *Paediatrics and Child Health*, *25*(3), 108-112.

Cui, J. D., Qiu, J. Q., Fan, X. W., Jia, S. R., & Tan, Z. L. (2014). Biotechnological production and applications of microbial phenylalanine ammonia lyase: a recent review. *Critical Reviews in Biotechnology*, *34*(3), 258-268.

Devlin, T. M. (1997). *Textbook of biochemistry with clinical correlations*. John Wiley & Sons.

Illanes, A., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J. M., & Wilson, L. (2008). Heterogeneous enzyme kinetics. In *Enzyme Biocatalysis* (pp. 155-203). Springer, Dordrecht.

KEGG (2015) Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Orthology: K13064 Phenylalanine/tyrosine ammonia-lyase. Recuperado de http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?ec:4.3.1.25.

Kong, J. Q. (2015). Phenylalanine ammonia-lyase, a key component used for phenylpropanoids production by metabolic engineering. *RSC Advances*, *5*(77), 62587-62603.

Larue, C., Munnich, A., Charpentier, C., Saudubray, J. M., Frezal, J., Rémy, M. H., & Rivat, C. (1986). An extracorporeal hollow-fiber reactor for phenylketonuria using immobilized phenylalanine ammonia lyase. *Developmental Pharmacology and Therapeutics*, *9*, 73-81.

Longo, N., Harding, C. O., Burton, B. K., Grange, D. K., Vockley, J., Wasserstein, M., & Gu, Z. (2014). Single-dose, subcutaneous recombinant phenylalanine ammonia lyase conjugated with polyethylene glycol in adult patients with phenylketonuria: an open-label, multicentre, phase 1 dose-escalation trial. *The Lancet*, 384(9937), 37-44.

MacDonald, M. C., Arivalagan, P., Barre, D. E., MacInnis, J. A., & D’Cunha, G. B. (2016). *Rhodotorula glutinis* Phenylalanine/tyrosine ammonia lyase enzyme catalyzed synthesis of the methyl ester of para-hydroxycinnamic acid and its potential antibacterial activity. *Frontiers in Microbiology*, 7, 281.

MacDonald, M. J., & D’Cunha, G. B. (2007). A modern view of phenylalanine ammonia lyase. *Biochemistry and Cell Biology*, 85(3), 273-282.

NCYC (2015). National Collection of Yeast Cultures. *Rhodospiridium toruloides* NCYC 921. Recuperado de <https://catalogue.ncyc.co.uk/rhodospiridium-toruloides-921>.

Ogata, K., Uchiyama, K., & Yamada, H. (1967). Metabolism of Aromatic Amino Acid in Microorganisms: Part I. Formation of Cinnamic Acid from Phenylalanine. *Agricultural and Biological Chemistry*, 31(2), 200-206.

Soltanzadeh, N., & Mirmoghtadaie, L. (2014). Strategies Used in Production of Phenylalanine-Free Foods for PKU Management. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(3), 287-299.

Vockley, J., Andersson, H. C., Antshel, K. M., Braverman, N. E., Burton, B. K., Frazier, D. M., ... & Berry, S. A. (2013). Phenylalanine hydroxylase deficiency: diagnosis and management guideline. *Genetics in Medicine*, 16(2), 188-200.

Wang, Z., Chen, Y. Z., Zhang, S., & Zhou, Z. (2006). Investigation of a phenylalanine-biosensor system for phenylketonuria detection. In *Engineering in Medicine and Biology Society, 2005. IEEE-EMBS 2005. 27th Annual International Conference of the* (pp. 1913-1916). IEEE.

Yamada, S., Nabe, K., Izuo, N., Nakamichi, K., & Chibata, I. (1981). Production of L-phenylalanine from trans-cinnamic acid with *Rhodotorula glutinis* containing L-phenylalanine ammonia-lyase activity. *Applied and environmental microbiology*, 42(5), 773-778.