

Evaluación de parámetros cinéticos de la sacarosa isomerasa recombinante de *Pantoea dispersa* UQ68J expresada en *Pichia. Pastoris* SMD.

Amado Javier Sardiña Peña, Tania Siqueiros Cendón, Edward A. Espinoza Sánchez, Lourdes Ballinas Casarrubias, Quintín Rascón Cruz, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Chihuahua, Chihuahua, 31125, p324974@uach.mx

Sacarosa isomerasa, isomaltulosa, GOD -POD

Introducción. La Organización Mundial de la Salud postula que la ingesta de carbohidratos debe ser de un 55% a 75% del consumo total diario de alimentos (1). Sin embargo, el consumo en exceso de sacarosa es perjudicial, teniendo entre sus desventajas los niveles de hiperglicemia que genera (2). Edulcorantes como la isomaltulosa constituyen una alternativa al uso de la sacarosa, dicha molécula ha demostrado propiedades prometedoras, incluyendo una prolongada liberación de energía e índice glicémico bajo (3). La sacarosa isomerasa es la enzima utilizada en la producción de isomaltulosa, pues cataliza la isomerización de sacarosa en isomaltulosa y trehalulosa e hidrólisis a glucosa y fructosa (4). Diferentes isoformas de dicha enzima se pueden encontrar en la naturaleza, con acentuadas variaciones en sus características, que serán necesarias evaluar conforme a su aplicación. El objetivo de este trabajo fue evaluar los parámetros cinéticos Km, Vmax, así como el pH y temperatura óptima de la sacarosa isomerasa recombinante de *Pantoea dispersa* UQ68J expresada en *Pichia. Pastoris* SMD.

Metodología. En la cuantificación de la actividad enzimática se empleó el método GOD – POD (5). Para la determinación de los parámetros cinéticos Km y Vmax, muestras con diferentes concentraciones de sacarosa (10 – 50 g/L) fueron preparadas en tampón citrato pH 5.0 50 mM e incubadas con 1 mg de proteínas totales por un período de 5 min. El efecto de la temperatura en la actividad de la sacarosa isomerasa fue estudiado en el intervalo de 10 a 60°C. El pH óptimo fue determinado a 30°C, usando un intervalo de pH de 4 a 8, los que fueron fijados empleando tampón citratos 50 mM. Para ambos ensayos la concentración de sustrato empleada fue de 0.15 M, el tiempo de incubación de las muestras fue de 90 min y la masa de proteínas totales empleada fue 1 mg. Seguidamente se desarrolló una cinética de producción de isomaltulosa, el sistema reaccionante consistió en 1 L de solución de sacarosa 3 M disuelta buffer citratos 50 mM pH 5.0, temperatura de 30°C, agitación lenta y una aplicación semicontinua de proteínas totales para una masa final agregada de 95 mg, la reacción fue detenida una vez se alcanzó una conversión superior al 80%.

Resultados. Mediante la linearización de Lineweaver-Burk para la ecuación de Michaelis – Menten se obtuvo valores de Km y Vmax iguales a 44 mM y 3.36 mM/min respectivamente (Fig. 1). En la Fig. 2 se aprecia que los valores óptimos de actividad isomerasa se alcanzan para 30°C y pH 5. Tanto el decremento del pH como el incremento de la temperatura promueven la actividad hidrolasa de la enzima, además para temperaturas superiores a los 50°C no se observó actividad isomerasa. En la Fig. 3 se observa que luego de 160 horas de reacción con una aplicación semicontinua de proteínas se alcanzó una conversión de sacarosa a isomaltulosa – trehalulosa superior al 80%.

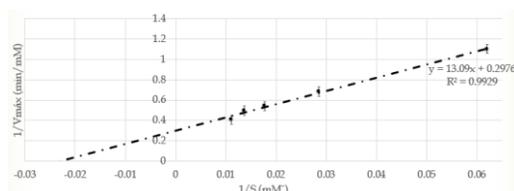


Fig. 1 Linearización de Lineweaver-Burk para la ecuación de Michaelis – Menten.

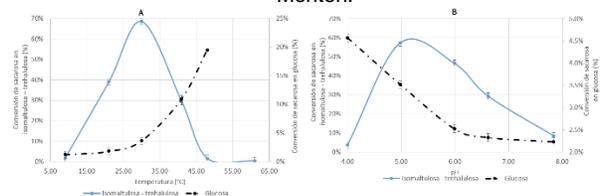


Fig. 2 A y B muestra los efectos de la temperatura y el pH sobre la actividad isomerasa e hidrolasa de la enzima contenida en el extracto de proteínas totales.

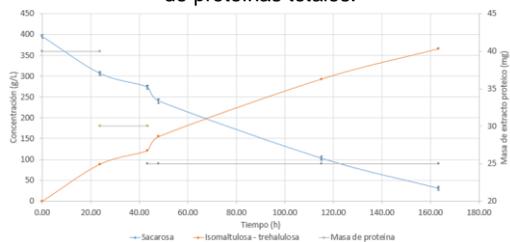


Fig. 3 Cinética de conversión de sacarosa en isomaltulosa – trehalulosa.

Conclusiones. El extracto de proteína celular del lisado de *P. pastoris* SMD, que contiene la enzima sacarosa isomerasa, presenta un pH óptimo, temperatura óptima y Km, comparables a los de la sacarosa isomerasa nativa de *P. dispersa* UQ68J. La estrategia de alimentación semicontinua de proteínas al reactor enzimático fue adecuada, pues garantizó la presencia de enzima activa durante el período de reacción.

Agradecimientos. Al CONACYT y a la Facultad de Ciencias Químicas de la UACH.

Bibliografía.

- WHO/FAO (2003). WHO Technical Report Series 916. WHO/FAO, Geneva.
- Sato, K. *et al.* (2007). The Journal of nutrition 137(8): 1908-1915.
- Lina, B. *et al.* (2002). Food and Chemical Toxicology 40(10): 1375-1381.
- Mu, W. *et al.* (2014). Applied microbiology and biotechnology 98(15): 6569-6582.
- Park, S. E., *et al.* (2007). Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 71(2), 583-586.