

PURIFICACION PARCIAL DE LA INVERTASA RECOMBINANTE INV B DE *Zymomonas mobilis* EXPRESADA EN *Kluyveromyces lactis*.

Yaneth Bartolo, Alejandro Santiago y María Eugenia Hidalgo. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV-IPN. Av. IPN No 2508 Col. San Pedro Zacatenco. CP 07360. México D. F. Tel. (55)5747-3800 ext. 4354 y 4360. Fax: (55)5747-3313. E-mail: ehidalgo@cinvestav.mx.

Palabras clave: *invertasa*, *Zymomonas mobilis*, *Kluyveromyces lactis*.

Introducción. Los jarabes invertidos se utilizan para la elaboración de bebidas carbonatadas, conservas y confitería en sustitución de la sacarosa por su mayor poder edulcorante y menor tendencia a la cristalización. Actualmente, los jarabes invertidos han sido sustituidos por los jarabes fructosados que se importan de los EU y que son producidos a partir del almidón de maíz, mediante un proceso que involucra tres enzimas: α -amilasa, glucoamilasa y glucosa isomerasa. Un proceso alternativo para la producción de jarabes invertidos, consiste en la hidrólisis de sacarosa por acción de la invertasa. Este proceso representa una opción económicamente viable para países como México con una elevada producción de sacarosa, la cual se estima en más de 5 millones de toneladas de azúcar al año (1). *Zymomonas mobilis* produce dos invertasas: una intracelular (INVA) y una extracelular (INV B). Una manera de sobreproducir y purificar con mayor facilidad la enzima, consiste en expresarla en otro sistema como *Kluyveromyces lactis*, una levadura que secreta las proteínas al medio, y cuyo sistema respiratorio no está bajo la represión de glucosa (2).

En este trabajo nos propusimos purificar la INV B recombinante de *Z. mobilis* expresada extracelularmente por *K. lactis*.

Metodología. *K. lactis/pKLac1-invB* se cultivo en medio YPGal a 30°C y 250 rpm. El sobrenadante de cultivo se precipitó con diferentes concentraciones (20% a 80%) de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para obtener fracciones proteicas, que fueron dializadas con buffer de acetatos 0.1 M y pH 5.5. El grado de pureza y el PM se estimaron por SDS-PAGE. La proteína se determinó por el método de Lowry y la actividad de invertasa por la liberación de azúcares reductores por el método de DNS.

Resultados y discusión. La fracción del 40%-60% de saturación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ presentó la mayor actividad de invertasa, seguida de la actividad de la fracción del 20%-40%. Sin embargo, ésta última fracción presentó mayor grado de pureza, donde se detectó una banda de aproximadamente 52 kDa. Este valor de 5 kDa mayor al PM reportado por O'Mullan et al. (3) y al PM predicho a partir del gen codificante *invB*, lo cual sugiere que la

diferencia en PM se debe a que la INV B expresada en *K. lactis* está glicosilada. La fracción del 20%-40% de saturación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se eligió para la posterior purificación de la enzima por cromatografía de intercambio iónico.

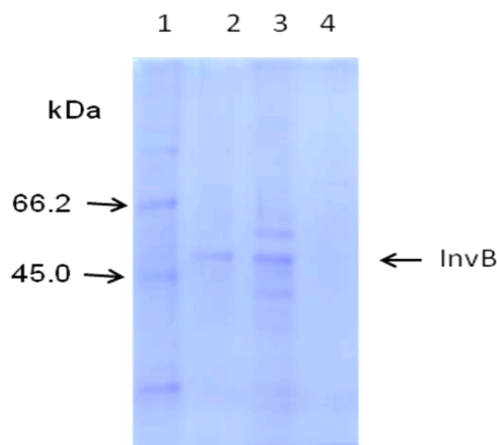


Fig.1 Análisis electroforético del fraccionamiento del sobrenadante de cultivo de *K. lactis/pKLac1-invB*, con diferentes concentraciones de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Carriles: 1, Estándares de PM; 2, Fracción del 20%-40%; 3: Fracción del 40%-60% y 4, Fracción del 60%-80%.

Conclusiones. Se obtuvo una preparación enzimática con alto grado de pureza y actividad de invertasa al saturar el sobrenadante de cultivo de *K. lactis/pKLac1-invB* con 20% al 40% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Agradecimiento. Este trabajo fue financiado por el CONACYT proyecto No. 96630.

Bibliografía.

1. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México, 2007.
2. Leyva, L. (2007). Expresión extracelular de la invertasa INV B de *Zymomonas mobilis* en la levadura *Kluyveromyces lactis*. CINVESTAV-Zacatenco. México, D.F.
3. O'Mullan, P., Chase, T. and Eveleigh, D. (1992). Purification and some properties of extracellular invertase B from *Zymomonas mobilis*. *Appl Microbiol Biotechnol.* vol (38):341-346.