

MEJORAMIENTO DE LAS INVERTASAS INVA E INVB DE *Zymomonas mobilis* por MÉTODOS BIOQUÍMICOS Y MOLECULARES

María de los Ángeles Calixto Romo, J Alejandro Santiago Hernández, María Eugenia Hidalgo Lara

Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV-IPN. Av. Instituto Politécnico Nacional No. 2508. México, D.F. C.P. 07360. Tel. 5061-3800 ext. 4360.

e-mail: ehidalgo@cinvestav.mx

Palabras clave: invertasa, *Pichia pastoris*, *Zymomonas mobilis*

Introducción: La invertasa es una enzima de interés industrial utilizada en la hidrólisis de sacarosa para la obtención de jarabes fructosados, (JF), los cuales son empleados principalmente en la industria refresquera. La invertasa proveniente de *Saccharomyces cerevisiae* es la más empleada para la obtención de JF y ésta presenta algunas desventajas como: 1) inhibición por sustrato a concentraciones bajas de sacarosa, 5 %; y 2) su baja estabilidad operacional (1). Es por ello que es necesario el estudio de otras invertasas así como también el empleo de diferentes técnicas para la obtención de mejores biocatalizadores que hidrolicen sacarosa. El objetivo de este trabajo consistió en obtener invertasas con propiedades catalíticas mejoradas mediante estudios de inmovilización en Avicel y Nylon-6 y la expresión heteróloga en la levadura *Pichia pastoris*. Las enzimas empleadas como modelo de estudio fueron las invertasas INVA e INVB de la bacteria *Zymomonas mobilis*.

Metodología y Resultados

Inmovilización de la invertasa intracelular INVA en Avicel y Nylon-6. La invertasa INVA de *Z. mobilis* fue expresada en *E. coli* como proteínas de fusión INVA-CBD e INVA-6xHis. INVA-CBD fue purificada e inmovilizada en un paso a Avicel (celulosa cristalina) (Fig. 1). INVA-6xHis fue purificada por cromatografía de afinidad a Níquel (Fig. 2) y por último ésta fue inmovilizada a Nylon-6. La enzima inmovilizada en Nylon-6 mostró una V_{max} de 2.07 U; mientras que la inmovilizada en Avicel fue de 1.75 U (2).

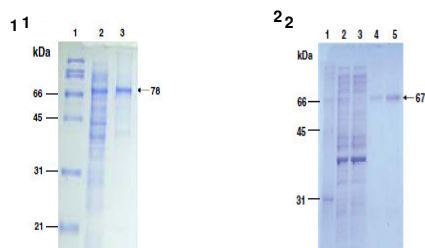
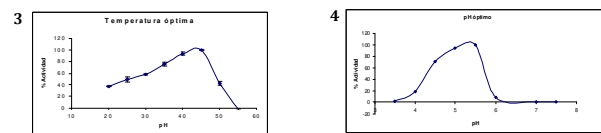


Figura 1 y 2: Purificación e inmovilización de INVA en Avicel, y Purificación de INVA por cromatografía de afinidad a níquel, respectivamente.

Expresión de INVB en *P. pastoris* X-33: La Invertasa Extracelular INVB de *Z. mobilis* fue clonada en el vector

de clonación pGAPZ α -A para la obtención de la construcción invB-pGAPZ α -A, la cual fue linearizada con la enzima de restricción Avr II para transformar a *Pichia pastoris* X-33 por electroporación, el ORF de invB se integró al genoma de *P. pastoris* mediante recombinación homóloga. INVB se expresó en *P. pastoris* X-33 y se caracterizó bioquímicamente presentando una actividad de 200 U/mL mayor a la actividad presentada por la INVB nativa la cual está reportada con una actividad de 33 U/mg (3). Además también se evaluó la vida de anaquel de INVB expresada en *P. pastoris* y esta fue mayor a INVB expresada en *E. coli*.



Figuras 3 y 4: Caracterización bioquímica de INVB expresada en *P. pastoris*.

Conclusiones: La inmovilización de la invertasa intracelular INVA a Nylon-6 y la expresión de la invertasa extracelular INVB de *Z. mobilis* en el sistema eucariótico de *P. pastoris* permitió la obtención de dos invertasas mejoradas en sus propiedades bioquímicas.

Bibliografía:

- 1) (<http://www.brenda.uni-koeln.de>)
- 2) Calixto Romo MÁ; Santiago-Hernández JA; Vallejo-Becerra V; Amaya-Delgado L; Montes-Horcasitas MC; Hidalgo-Lara ME. (2008) Expresión, purificación and immobilization of the intracellular invertase INVA, from *Zymomonas mobilis* on crystalline cellulose and Nylon-6. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 35:1455-1463.
- 3) Santiago-Hernández JA, Vásquez-Bahena JM, Calixto-Romo MA, Xoconostle-Cázares B, Ortega-López J, Ruiz-Medrano R, Montes-Horcasitas MC, Hidalgo-Lara ME. (2006). Direct immobilization of a recombinant invertase to Avicel by *E. coli* overexpression of a fusion protein containing the extracellular invertase from *Zymomonas mobilis* and the carbohydrate-binding domain CBDcex from *Cellulomonas fimi*. *Enzyme Microb Technol* 40: 172-176.