



**ENDOPOLIGALACTURONASA DE *Kluyveromyces marxianus*: ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN CONDICIONES DE OXÍGENO CONTROLADAS**

Rivera Noriega Alicia<sup>1</sup>, Alma Cruz Guerrero<sup>1</sup>, Marcos López Pérez<sup>2</sup>, Lorena Gómez Ruíz<sup>1</sup>, Mariano García Garibay<sup>1,3</sup>  
 Universidad Autónoma Metropolitana/Unidad Iztapalapa, Departamento de Biotecnología<sup>1</sup> Distrito Federal C.P.09640;  
 Unidad Lerma, Departamento de Ciencias Ambientales<sup>2</sup> y Departamento de Ciencias de la Alimentación<sup>3</sup>, Estado de México C.P. 52006. alixia\_rn@yahoo.com

*Palabras clave: endopoligalacturonasa, Kluyveromyces marxianus, expresión genética.*

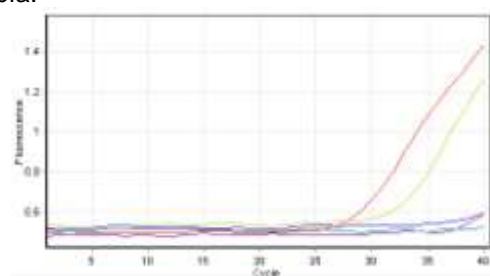
**Introducción.** *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*, es una levadura capaz de producir varias enzimas de interés biotecnológico como lactasa, pectinasa e inulinasa. La producción de pectinasas es una capacidad constitutiva en algunas levaduras, en otras se ha descrito como inducible y en algunas es parcialmente constitutiva (1). Se ha descrito que la actividad poligalacturonasa (PG) en *K. marxianus* var. *marxianus* está relacionada con la cantidad de oxígeno disuelto en el medio. Distintas cepas presentan capacidad pectinolítica cuando crecen sin agitación y bajo condiciones anaerobias y no presentan actividad cuando hay niveles altos de aireación. Cruz Guerrero y col. (2) demostraron que la producción de la enzima endopoligalacturonasa (EPG) es constitutiva bajo condiciones anaerobias con una concentración umbral de oxígeno disuelto de 3.3 mg/ml, mientras que en condiciones aerobias la producción de la enzima es inducida por su sustrato.

El presente trabajo tiene como objetivo elucidar la influencia del oxígeno disuelto en la expresión y actividad de la enzima endopoligalacturonasa en la levadura *K. marxianus* CDBB-L-278.

**Metodología.** Se realizaron fermentaciones aerobias y anaerobias durante 10 horas. Se tomaron muestras de la fermentación en este tiempo para cuantificar la actividad enzimática mediante el método de Nelson-Somogyi (3). Para los análisis de expresión del gen, se extrajo ARN total utilizando el Purelink RNA minikit (Ambion), posteriormente se hizo un tratamiento con DNAsa (promega) y la transcripción inversa con el kit quantitect reverse transcription (Qiagen). Se realizó el PCR cuantitativo en el equipo Rotor-Gene 3000. Para la detección del gen de la enzima endopoligalacturonasa (EPG) se utilizó una sonda de hidrólisis marcada con el fluoróforo FAM y el apagador TAMRA.

**Resultados.** Los experimentos de RT-qPCR demuestran que en la fermentación anaerobia hay una mayor expresión del gen de la EPG, comparado con la fermentación aerobia, ya que el valor de Ct en la fermentación anaerobia es menor. Como se sabe, el valor de Ct es inversamente proporcional a la concentración inicial de ADN o en nuestro caso de ARNm presente en la muestra. Esto se corrobora con los datos de actividad específica observados en la Tabla 2,

donde se obtuvo mayor actividad en la fermentación anaerobia.



**Figura 1.** Cuantificación por PCR tiempo real del gen de EPG

**Tabla 1.** Valores de Ct obtenidos en las fermentaciones

No.	Color	Muestra	Ct
1	■	cDNA 10 h anaerobia	27.83
2	■	cDNA 10 h aerobia	31.51
3	■	Control transcripción de fermentación aerobia	
4	■	Control transcripción de fermentación anaerobia	
5	■	Control negativo de reactivos	

**Tabla 2.** Actividad enzimática de fermentaciones.

	Fermentación aerobia	Fermentación anaerobia
Actividad enzimática (UPg/ml)	1.054x10 <sup>-5</sup>	9.02x10 <sup>-6</sup>
Actividad enzimática específica (UPg/mg)	4.42x 10 <sup>-6</sup>	1.62x10 <sup>-5</sup>

**Conclusiones.** El método de RT-qPCR permitió demostrar que en la fermentación anaerobia con *K. marxianus* CDBB-L-278 hay una mayor expresión del gen y actividad enzimática comparado con una fermentación aerobia realizada con la misma cepa.

**Agradecimiento.** Al Dr. Guillermo Aguilar de la Facultad de Química de la UNAM por el apoyo para la realización de las fermentaciones. Al CONACyT por la beca.

**Bibliografía.**

1. Blanco P., Sieiro C., G. Villa T. (1999). *FEMS Microbiol. Lett.*(175):1-9
2. Cruz G. A., Barzana E., García G. M., Gómez R. L.(1999). *Process Biochemistry.*(34):621-624.
3. Norton N.,(1944). www.jbc.org