

PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE LA INVERTASA EXTRACELULAR INV B DE *Zymomonas mobilis* CDBB-B603.

Lourdes Elizabeth Leyva-Castillo, Alejandro Santiago-Hernández, Jazmín M. Vásquez-Bahena, M Carmen Montes-Horcasitas y M. Eugenia Hidalgo-Lara*

*Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. CINVESTAV. Av. IPN No. 2508 San Pedro Zacatenco. CP 07360. México D. F. Fax (55)5061-3313. E-mail: ehidalgo@cinvestav.mx

Palabras claves: *Zymomonas mobilis*, invertasa, purificación.

Introducción. Los jarabes invertidos son una mezcla de glucosa y fructosa que se utilizan de forma extensiva en la elaboración de confitería, conservas y bebidas carbonatadas. Los jarabes invertidos más ampliamente utilizados en la actualidad son producidos a partir de almidón de maíz. En este proceso participan 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 involucra una sola enzima, y 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). La invertasa (β -D-fructofuranosidasa EC 3.2.1.26) hidroliza la sacarosa produciendo una mezcla equimolar de glucosa y fructosa. Esta enzima ha sido encontrada en bacterias, hongos y plantas. *Zymomonas mobilis*, bacteria utilizada en la elaboración del pulque, sintetiza dos invertasas: una intracelular (INVA) y una extracelular (INV B). La invertasa INV B podría ser utilizada para implementar un sistema para producir jarabes invertidos a partir de sacarosa.

El objetivo de este trabajo fue la purificación y caracterización de la invertasa INV B de la bacteria *Z. mobilis*.

Metodología. *Z. mobilis* CDBB-B603, de la Colección de Cultivos Microbianos del CINVESTAV se creció en medio mineral (2) a 30°C durante 24 horas sin agitación. El sobrenadante de cultivo, separado de la biomasa por centrifugación, se llevó a un 85% de saturación con sulfato de amonio. La invertasa INV B se purificó a partir del precipitado proteico por cromatografía de intercambio iónico. El grado de pureza y el PM se estimaron por SDS-PAGE. La enzima purificada se trató con el reactivo de Schiff para evidenciar la presencia de carbohidratos. En el ensayo para determinar la temperatura y pH óptimos, se utilizó buffer de acetatos 0.1 M adicionado con sacarosa al 5 %. Para determinar los parámetros cinéticos, se utilizó el mismo buffer adicionado con sacarosa (0-0.292 M) a 55°C por el método de Lineweaver-Burk. La proteína se determinó por el método de Lowry y la actividad de invertasa por la liberación de azúcares reductores por el método del DNS.

Resultados y discusión. La enzima INV B purificada presentó un PM de 46 kDa (Fig. 1) y no se detectó glicosilación por el método de Schiff. INV B mostró óptimos de temperatura y pH de 55°C y 5.5,

respectivamente. La K_m fue de 208 mM de sacarosa y la V_{max} de 33.63 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína.

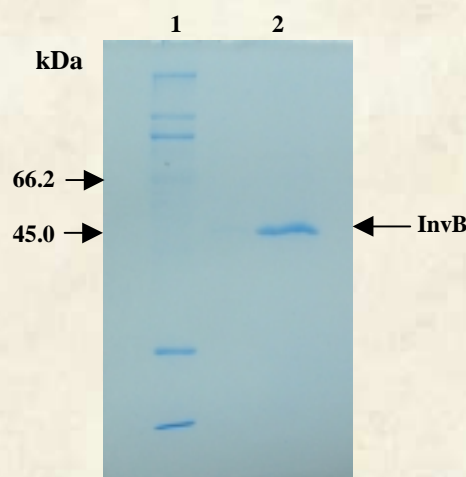


Fig.1 Análisis electroforético de la invertasa INV B de *Z. mobilis* purificada. Carriles: 1, Estándares de PM; 2, invertasa INV B purificada.

Yanase *et al.* (3) reportaron un PM de 58 kDa para la invertasa INV B de *Z. mobilis* IFO (ATCC 29191), valor 12 kDa superior predicho a partir del gen codificante *invB* (46 kDa), sugiriendo que INV B está glicosilada. Sin embargo, nuestros resultados reproduciblemente indican que INV B tiene un PM de 46 kDa y que no está glicosilada.

Conclusiones y perspectivas. La invertasa INV B de *Z. mobilis* CDBB-B603 tiene un PM de 46 kDa, no está glicosilada y sus características bioquímicas son similares a las reportadas para invertasas de levaduras. Actualmente, se analiza la región codificante del gen *invB* de *Z. mobilis* CDBB-B603 para determinar si existen diferencias a nivel molecular entre ambas enzimas.

Agradecimientos. Este trabajo fue financiado por el CINVESTAV, México D. F. y el CONACYT.

Bibliografía.

1. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México, 2005.
2. Vigants, A., Zikmanis, P. y Bekers, M. 1996. Sucrose medium osmolality as a regulator of anabolic and catabolic parameters in *Zymomonas* culture. *Acta Biotechnol.* 16:321-327.
3. Yanase, H., Iwata, M., Kita, K., Kato, N., Tonomura, K. 1995. Purificación, crystallization, and characterization of the extracellular invertase from *Zymomonas mobilis*. *J. Ferment. Bioeng.* 79(4):367-369.