

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

Elizabeth Leyva, Alejandro Santiago, Jazmin Vásquez, Carmen Montes y M. Eugenia Hidalgo.
Departamento de Biotecnología, CINVESTAV. Av. IPN 2508 San Pedro Zacatenco. CP 07360. México D.F.
Tel. 50 61 38 00 ext 4309, Fax 50 61 33 13. E-mail: ehidalgo@cinvestav.mx.

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

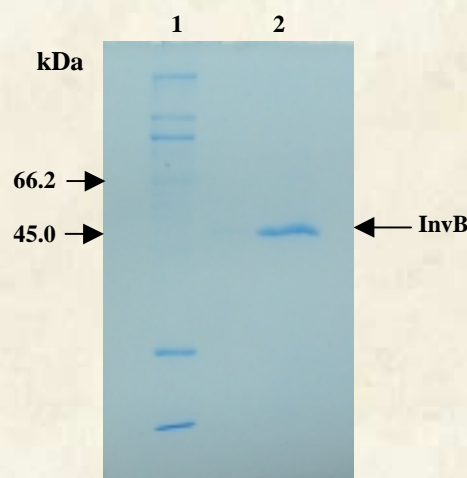
Introducción. Los jarabes invertidos son una mezcla de glucosa y fructosa que se utilizan de forma extensiva en la elaboración de confitería, conservas y bebidas carbonatadas. Los jarabes invertidos más ampliamente utilizados en la actualidad, generalmente importados de los EU, son producidos a partir 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), cuando crece en sacarosa como fuente de carbono. 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 (CII). El grado de pureza y el peso molecular se estimaron por SDS-PAGE. Se determinó si la enzima purificada presenta residuos de carbohidratos por el método del reactivo de Schiff. 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. Las proteínas en el sobrenadante de cultivo de *Z. mobilis* se precipitaron con sulfato de amonio al 85%. El precipitado se disolvió y se dializó en buffer de acetatos 0.05 M. Posteriormente, la invertasa INV B se purificó por cromatografía de intercambio iónico.

INV B no presentó glicosilación, se determinó un PM de aprox. 46 kDa (Fig. 1), y sus óptimos de temperatura y pH fueron 55°C y 5.5, respectivamente. Los parámetros cinéticos fueron 208 mM de sacarosa para la K_m y 33.63 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína para la V_{max} .



*Fig.1 Determinación del PM de la invertasa INV B de *Z. mobilis*. Carriles: 1, Estándares de PM; 2, invertasa extracelular INV B purificada.*

Yanase *et al.* (3) reportaron un peso molecular de 58 kDa para la invertasa extracelular de *Z. mobilis* IFO (ATCC 29191). Este valor es de aproximadamente 10 kDa más alto al reportado en este trabajo. Esto se debe a que la invertasa reportada por Yanase está glicosilada y nuestros resultados indican que la INV B no lo está.

Conclusiones. La invertasa INV B de *Z. mobilis* purificada presentó un PM aprox. de 46 kDa, y sus características bioquímicas son similares a las reportadas para invertasas de levaduras.

Agradecimientos. Este trabajo fue financiado por el CINVESTAV. Leyva-Castillo LE recibe beca de CONACYT-México.

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. Purificación, cristallization, and characterization of the extracellular invertase from *Zymomonas mobilis*. *J. of ferment. and bioeng.* 1995;79(4):367-369.