

INMOVILIZACIÓN DE LA INVERTASA INV B RECOMBINANTE DE *ZYMOMONA MOBILIS* EN NYLON – 6.

Vanessa Vallejo-Becerra, Jazmín M. Vásquez-Bahena, Alejandro Santiago-Hernández, Ma. Eugenia Hidalgo-Lara.

Palabras clave: Inmovilización, Nylon-6, Invertasa

Introducción. En la actualidad se están llevando a cabo diversos avances en los campos de investigación referentes a tecnología enzimática y biocatálisis, en particular el estudio del metabolismo y mejoramiento genético de levaduras industriales, así como la expresión de enzimas específicas mediante cepas microbianas recombinantes.

Dentro de los campos de investigación de biocatálisis que están teniendo gran importancia se encuentra la inmovilización de enzimas, la cual permite una mejora significativa de su estabilidad, lo que hace posible su empleo en la producción industrial de productos químicos, farmacéuticos, alimentos; en el tratamiento de residuos; en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades, y otras muchas aplicaciones.

Las enzimas a menudo son lábiles y no son fácilmente reutilizables, de modo que el concepto de enzimas inmovilizadas en cuanto a los catalizadores reusables estabilizados tiene un gran atractivo en la intensificación del proceso y, por lo tanto, afecta la economía de éste. La inmovilización por unión covalente a soporte sólidos, es uno de los métodos más utilizados y de los que se dispone de una mayor información. Se ha usado una gran variedad de soportes los cuales resultan determinantes en el comportamiento posterior del biocatalizador.

Metodología. La enzima recombinante INV B petK BL21, fué expresada en células de *E. coli* y posteriormente purificada por cromatografía de afinidad en un soporte de níquel. Posteriormente fue inmovilizada covalentemente a microesferas de Nylon-6, el cual fue previamente activado con glutaraldehído, usando PEI como espaciador (Salleh, 1982). El procedimiento fue adaptado y optimizado para esta enzima. El acoplamiento de la proteína al soporte se estimó por la diferencia entre la proteína inicial y final en el sobrenadante y fue determinada por el método de Lowry (Lowry, *et al.*, 1951).

Resultados y Discusión. La enzima se expresó y purificó exitosamente en una columna de níquel. En la figura 1 se muestra el SDS-PAGE de estos pasos.

Posteriormente ya una vez obteniendo una enzima con un 95% de pureza se prosiguió con la inmovilización. El procedimiento de inmovilización aporta grandes beneficios a la enzima. El tiempo de acoplamiento de la enzima al soporte se muestra en la figura 2.

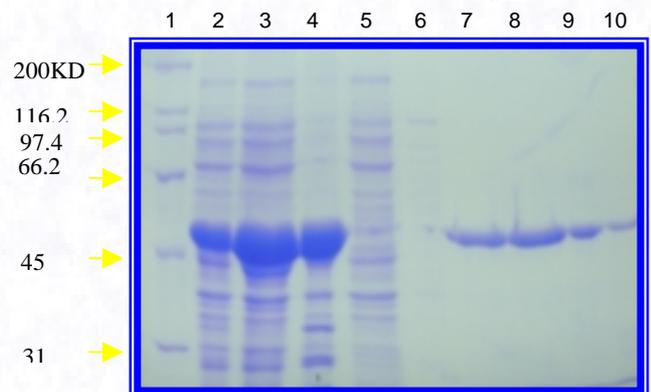


Fig. 1. Carril 2 proteína total, 3 material soluble, 4 material insoluble, 5 lo que no se unió, 6 primer pico detectado en la cromatografía, 7-10 fracciones de cromatografía.

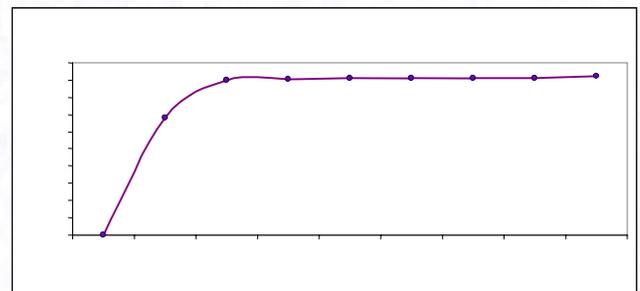


Fig. 2. Cinética de acoplamiento de la INV B recombinante de *Z. mobilis* a microesferas de nylon-6 a pH 5.5 y 4°C.

La estabilidad que presenta la enzima a 30°C comparada con la misma enzima en su forma libre aumentó a lo largo del tiempo como se observa en la figura 3.

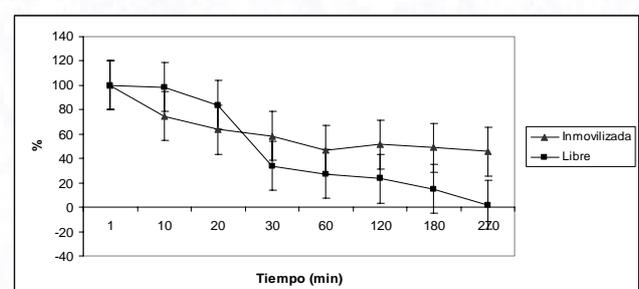


Fig. 3. Termoestabilidad de la enzima libre e inmovilizada a 30°C.