



XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA PROTEÍNA FRUCTAN:FRUCTAN 1-FRUCTOSILTRANSFERASA (1-FFT) RECOMBINANTE DE *Agave tequilana* PRODUCIDA EN *Pichia pastoris*.

Raúl Fajardo-Ochoa¹, J. Gil Munguía-López², Juan Alberto Osuna-Castro¹, Mercedes G. López³, N. Alejandra Mancilla Margalli⁴. ¹ Universidad de Colima, Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Tecomán, Colima, CP. 28100; ² IPICT, Departamento de Biología Molecular, San Luis Potosí, San Luis Potosí, CP. 78210; ³ CINEVESTAV IPN, Unidad de Biotecnología e Ingeniería Genética de Plantas, Irapuato, Guanajuato, CP. 36500; ⁴ Instituto Tecnológico de Tlajomulco Jalisco, División de Estudios de Posgrado e Investigación, Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco, CP. 45640. raul_fajardoochoa@hotmail.com, osuna_juan@hotmail.com.

Palabras clave: Fructosiltransferasas, *Pichia pastoris*, Fructanos.

Introducción. Los agaves son plantas de gran importancia económica y cultural en México debido a la cantidad de productos comerciales que se obtienen de ellos. Su principal carbohidrato de almacén son los fructanos (polímeros de fructosa) con aplicaciones en la industria alimentaria como nutracéuticos y prebióticos (1); además de representar el principal sustrato fermentable para la producción de bebidas como mezcal, pulque y tequila (2). Las fructosiltransferasas (FTs) son las enzimas implicadas en la biosíntesis de fructanos en plantas, y se clasifican en dos grupos: 1) las tipo-S, que prefieren sacarosa como sustrato donador, 2) las tipo-F, utilizan fructanos como donadores de fructosa. Algunas FTs de plantas han sido estudiadas en su forma nativa y otras de manera heteróloga empleando diversos sistemas de expresión. La levadura *Pichia pastoris* ha demostrado ser de gran utilidad en el estudio de FTs de origen vegetal debido a que carece de enzimas sucrolíticas y realiza modificaciones postraduccionales (3). Recientemente se aisló el gen de la 1-FFT de *Agave tequilana* y se expresó en *Pichia pastoris* (4), además, la enzima fue caracterizada molecular y funcionalmente en un extracto de proteínas totales (5), sin lograr su purificación. El objetivo de este trabajo fue purificar la 1-FFT de *A. tequilana* expresada en *P. pastoris* y caracterizarla bioquímicamente.

Metodología. La 1-FFT recombinante se expresó en la cepa X-33 de *P. pastoris* transformada con el vector pGAPZαC-attf. Las células se colectaron por centrifugación y las proteínas del sobrenadante fueron concentradas por ultrafiltración. La 1-FFT secretada se purificó por cromatografía de filtración en gel. La enzima pura se incubó con 1-kestosa (1-kes DP3) como sustrato y los productos de la actividad enzimática se analizaron por cromatografía en capa fina (TLC). Se determinó las formas glicosiladas y punto isoelectrónico (pI) de la proteína pura. Además, se inmunodetectó la proteína mediante Western Blot con los anticuerpos Anti-His y Anti-myc.

Resultados. Se purificó la 1-FFT recombinante, identificándose como una banda de 75 kDa, y una de 70 kDa, de acuerdo al análisis de SDS-PAGE. Esta proteína sintetizó fructanos al producir nistosa (DP4) y

kestopentosa (DP5) cuando se incubó con 1-kes (Fig.1). La 1-FFT resultó ser una proteína glicosilada con un pI de 3.8 para la banda de 75 kDa, y de 4.6 para la de 70 kDa. Por último, se confirmó la identidad inmunoquímica de la proteína al ser reconocida por los anticuerpos Anti-His y Anti-myc.

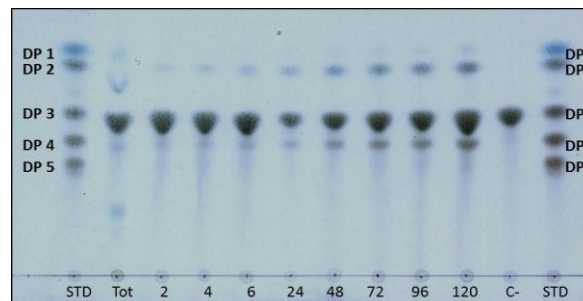


Fig. 1. Patrón de carbohidratos obtenido de la actividad de la 1-FFT con 1-kes 50 mM como sustrato. Tot, proteínas totales; 2-120, tiempos de incubación de la enzima pura (h); C-, sustrato con buffer de reacción; STD, estándar de carbohidratos.

Conclusión. Se logró purificar y caracterizar bioquímicamente la 1-FFT heteróloga de agave como una glicoproteína de 70/75 kDa, con pls ácidos y capaz de producir fructanos de cadena corta.

Agradecimiento. Este proyecto fue parcialmente financiado por FRABA-Universidad de Colima (602/09) y CONACYT-SNI-ESTUDIANTES (00000000101838).

Bibliografía.

- Mancilla-Margalli, N. A. y López, M. G. (2006). *J. Agric. Food Chem.* vol (54): 7832-7839.
- Ávila-Fernández, Á., Rendón-Poujol, X., Olvera, C., González, F., Capella, S., Peña-Álvarez, A., y López-Munguía, A. (2009). *J. Agric. Food Chem.* vol (57): 5578-5585.
- Van den Ende, W., Clerns, S., Vergauwen, R., Boogaerts, D., Le Roy, K., Arckens, L. y Van Leare, A. (2006). *J. Exp. Bot.* vol (57): 775-789.
- Mancilla-Margalli, N. A. 2006. Caracterización molecular de fructanos en *Agave* y *Dasyliiron spp.*, identificación de fructosiltransferasas y su expresión en *Pichia pastoris*. Tesis Doctorado Biotecnología en Plantas. Cinvestav Campus Guanajuato.
- Munguía-López, J. G. 2010. Síntesis *in vitro* de fructooligosacáridos usando la Fructan:Fructan 1-Fructosiltransferasa (1-FFT) de *Agave tequilana* Weber var. azul expresada en *Pichia pastoris* y su caracterización molecular. Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Colima.