



XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



PROPIEDADES CATALITICAS DE LA INVERTASA DE LA LEVADURA OSMOTOLERANTE *CANDIDA LACTIS-CONDENSI* MPIIIA

Plascencia-Espinosa Miguel Angel^{1,2}, Trejo-Estrada Sergio Rubén², Santiago-Hernández José Alejandro¹, Hidalgo-Lara María Eugenia¹. CINVESTAV – IPN¹, Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. Av. IPN 2508, San Pedro Zacatenco, México D.F. CP 07360. CIBA – IPN², Carr. Est. Sta. Inés Tecuexcomac Km 1.5. Ladrizábal. Tlaxcala, México. CP 90700. mplascencia@cinvestav.mx; ehidalgo@cinvestav.mx

Palabras clave: invertasa, levadura, Candida lactis-condensi

Introducción. *Candida lactis condensis* MplIIa es una levadura que produce una invertasa (INVMplIIa) asociada al paquete celular. La cepa MplIIa y la invertasa INVMplIIa han sido objeto de diversos estudios biotecnológicos, como inmovilización celular para la producción de jarabes invertidos y mejoramiento de rendimientos en destilerías¹. Sin embargo, no se han realizado estudios bioquímicos detallados de la enzima ni de sus propiedades catalíticas.

El objetivo del presente trabajo es el de llevar a cabo la caracterización bioquímica de la invertasa INVMplIIa.

Metodología. La invertasa INVMplIIa se purificó por un proceso de lisis celular, enriquecimiento por ultrafiltración y un paso final de cromatografía de intercambio iónico empleando la resina UNOSphere Q (BioRad)^{2,3}. Para el análisis de la enzima se emplearon geles de poliacrilamida con SDS, de acuerdo al método descrito por Laemmli⁴. La actividad de invertasa se determinó mediante una modificación del método descrito por Chávez *et al.*, 1997. El PM de la enzima se estimó por cromatografía de filtración en gel usando una columna HiPrep 16/60 Sephacryl S-300 HR (GE). Para estimar el PM de la proteína desglicosilada, se empleó Endoglicosidasa H (Roche), de acuerdo a las indicaciones del fabricante⁵.

Resultados. El PM de INVMplIIa fue estimado en 463 kDa (Fig. 1) y en 63 kDa (Fig. 2.) por SDS-PAGE, después del tratamiento con Endoglicosidasa H.

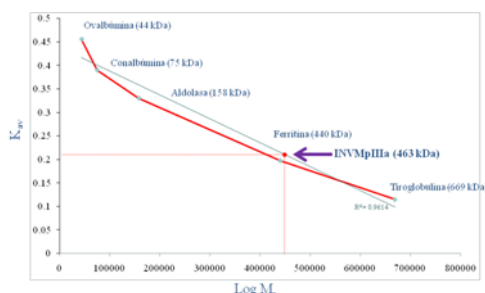


Fig. 1. Estimación del PM de INVMplIIa por cromatografía de filtración en gel.

En la siguiente tabla se presentan los parámetros bioquímicos determinados para INVMplIIa.

Tabla 1. Propiedades catalíticas y bioquímicas de INVMplIIa.

Propiedades	INVMplIIa
PM	463 kDa
PM desglicosilada	63 kDa
pI	3.7
pH ÓPTIMO	5.0
ESTABILIDAD (pH)	4.0 – 5.5 (4 h)
TEMPERATURA ÓPTIMA	65 °C
TERMOESTABILIDAD	t½ a 50°C de 168 h (7 días)
K _m (mM)	0.104
V _{max} (mM/min)	10.1
Inhibición por sustrato	400 mM

Conclusiones. INVMplIIa es una enzima oligomérica altamente glicosilada cuyo PM aproximado es de 463 kDa y su PM de la subunidad desglicosilada es de aprox. 63 kDa, similar al reportado para otras invertasas de levaduras^{6,7,8}. El pH óptimo de la enzima es de 5.0 y es estable en un rango de pH de 4.0 a 5.5, por lo que se considera una invertasa ácida. La vida media de la invertasa a 50 °C es de 7 días, por lo que se considera una enzima termotolerante.

Agradecimiento. Al CINVESTAV por el financiamiento de esta investigación y al CONACYT por la beca otorgada a MAPE para realizar estudios de doctorado.

Bibliografía.

- Plascencia, M. (2002). Análisis de las invertasas de levaduras osmotolerantes y sus aplicaciones en Biotecnología. Tesis de Maestría, CICATA – IPN U. Puebla, Puebla, Pue.
- Mullan, P, M. Szakacs-Dobozi y D. Eveleigh (1991). *Biotechnology Letters* 13(2): 137-142.
- Halász, A. y R. Lásztity (1991). Use of yeast biomass in food production. CRC Press. EUA. Pag. 11.
- Laemmli, U. (1970). *Nature*. 227:680-683.
- Linde D., I. Macías, L. Fernández-Arrojo, F. Palu, A. Jiménez, M. Fernández Lobato (2009). *Applied and Environmental Microbiology* 75(4):1065-1073
- Chávez, F., L. Rodríguez, J. Díaz, J. Delgado y J. Cremata (1997). *Journal of Biotechnology* 53:67-74.
- Moreno S., Y. Sánchez y L. Rodríguez (1990). *Achieves Microbiological* 142:370-374.
- Oda, Y. y K. Tonomura (1994). *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 58(6):1155-1157