



XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE LAS INVERTASAS INVA E INV B DE *Zymomonas mobilis* EN LA LEVADURA *Pichia pastoris*

María de los Ángeles Calixto Romo, José Alejandro Santiago Hernández, María Eugenia Hidalgo Lara. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, CINVESTAV. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. México D. F. CP 07360. angeles_calixto@yahoo.com.mx; ehidalgo@cinvestav.mx

Palabras clave: invertasa, Pichia pastoris, Zymomonas mobilis

Introducción: La invertasa es una enzima de interés industrial utilizada en la hidrólisis de sacarosa para la obtención de jarabes fructosados (JF), los cuales son empleados en la industria refresquera. La invertasa de *Saccharomyces cerevisiae* es la más empleada para la obtención de JF y ésta presenta algunas desventajas como: 1) inhibición por sustrato a concentraciones bajas de sacarosa, 5% y 2) baja estabilidad operacional (1). Es por ello que es necesario el empleo de diferentes técnicas para la obtención de mejores biocatalizadores que hidrolicen sacarosa. El objetivo de este trabajo consistió en obtener una invertasa con mejores propiedades catalíticas mediante la expresión heteróloga de las invertasa intracelular INVA y de la invertasa extracelular de *Z. mobilis* en la levadura *P. pastoris*.

Metodología. Los ORF's *invA* e *invB* de *Z. mobilis* se clonaron en el vector *pGAPZ α -A*. Las construcciones obtenidas (*invA-pGAPZ α -A* e *invB-pGAPZ α -A*) se linealizaron con la enzima de restricción *Avr II* para transformar *P. pastoris* X-33 por electroporación (3). Las clonas transformantes se seleccionaron por crecimiento en medio YPD con Zeocina 100 mg/ml. Las clonas positivas se caracterizaron enzimáticamente. Adicionalmente, se estudio del efecto de diferentes metales (1 mM) sobre la actividad de invertasa. La determinación de actividad de invertasa se realizó mediante el método del DNS descrito por Miller (2).

Resultados. En la figura 1 se muestra el análisis de digestión del vector de expresión *pGAPZ α -A* y de las construcciones *invA-pGAPZ α -A* e *invB-pGAPZ α -A* con la enzima *Avr II*.

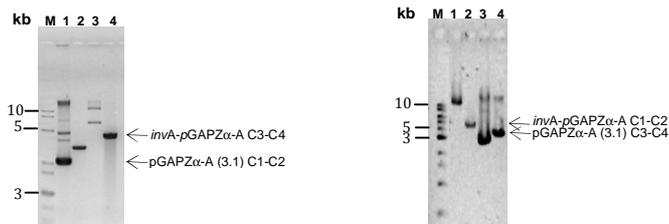


Fig. 1. Análisis de digestión con la enzima *Avr II*.

La invertasa INVA expresada en *P. pastoris* mostró una actividad específica (AE) tres veces mayor que la invertasa INV B (4). INVA presentó una temperatura óptima de 20 °C mayor que la observada para INVA nativa. Además, se evaluó el efecto de algunos metales sobre la AE de INVA y se comparó con el efecto de los metales sobre INV B. Se observó que el Cu^{2+} y el Zn^{2+} inhibieron totalmente la actividad de ambas invertasas; mientras que, el Fe^{2+} la inhibió casi en su totalidad. Los iones Ca^{2+} , Mg^{2+} y Ni^{2+} disminuyeron 50% la AE de INV B pero sólo el 12% 30% y 45%, respectivamente, de la AE de INVA (Fig. 2). Por otro lado, se observó que el Mn^{2+} es un potenciador de la actividad de ambas invertasas, ya que se observó un aumento del 35% y 98% en la AE de las invertasas INVA e INV B, respectivamente (Fig. 2).

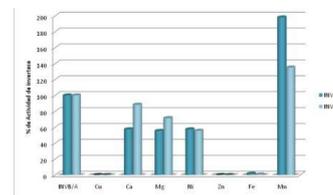


Fig. 2 Efecto de los metales sobre la actividad de invertasa

Conclusiones. La invertasa INVA expresada en *P. pastoris* mostró una mejor AE que la enzima nativa (1). El Mn^{2+} tuvo un efecto potenciador en la AE de las invertasas recombinantes INVA e INV B de *Z. mobilis*. Se concluye que la expresión heteróloga de INVA e INV B en *P. pastoris* permitió obtener una invertasa con mejores propiedades catalíticas que la enzima nativa.

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

Bibliografía.

- <http://www.brenda-enzymes.org>
- Miller GL (1959). Anal Chem (31):426-428
- EasySelect *Pichia* Expression Kit A Manual of Methods for Expression of Recombinant Proteins Using pPICZ and pPICZ α in *Pichia pastoris* from INVITROGEN, (2001)
- Calixto-Romo MA. Mejoramiento de las propiedades catalíticas de las invertasas INVA e INV B de *Zymomonas mobilis* por métodos bioquímicos y moleculares. Tesis de doctorado. CINVESTAV, Dic. 2009