



XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



PURIFICACIÓN, INMOVILIZACIÓN Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE UNA PECTATO LIASA ALCALINA TERMOTOLERANTE DE *Paenibacillus popilliae*

Vanessa Vallejo-Becerra, Sandra Contreras-Lorenzo, Alejandro Santiago-Hernández, María Eugenia Hidalgo-Lara.

Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV-IPN. Av. Instituto Politécnico Nacional No. 2508, D.F. CP 07360, México. E-mail: ehidalgo@cinvestav.mx

Palabras clave: Paenibacillus popilliae, polygalacturonic, pectin, lyases

Introducción. La pectina es un polisacárido que se encuentra en la lámina media de la pared celular de las plantas. La degradación de las pectinas involucra una compleja combinación de enzimas pectinolíticas, dentro de las cuales se distinguen dos grupos: las pectinesterasas y las despolimerasas (hidrolasas y liasas). Las pectinasas son enzimas de interés industrial ya que son ampliamente utilizadas para la clarificación de jugos y vinos. Las pectinasas alcalinas son usadas en la industria textilera para el enriado del lino y el decrudado del algodón. La inmovilización de enzimas permite una mejora significativa de su estabilidad, lo que hace posible su empleo en diversos sectores industriales.

El objetivo de este trabajo fue purificar e inmovilizar de una pectinasa de *P. popilliae*, con la finalidad de obtener un biocatalizador con mejor termoestabilidad; además de tener la posibilidad de reusar la enzima inmovilizada.

Metodología. *P. popilliae* se creció a 30°C por 24 h a 200 rpm, en caldo nutritivo (Difco) suplementado con 1% (w/v) de pectina de cítricos (Sigma). La pectinasa se purificó a partir del sobrenadante de cultivo de *P. popilliae* por cromatografía de intercambio aniónico (CIA). Posteriormente, la enzima se inmovilizó covalentemente a Nylon-6. La actividad de la enzima se determinó por la medida en el incremento de la absorbancia a 235nm midiendo la formación de productos insaturados de la reacción [1]. La cantidad de enzima inmovilizada se estimó por la diferencia entre la proteína inicial y final en el sobrenadante.

Resultados. Se purificó una pectinasa de 31 kDa por CIA. Las fracciones que presentaron actividad de pectinasa se analizó por PAGE-SDS (**Fig. 1**). La pectinasa de 31 kDa se inmovilizó covalentemente a Nylon-6 previamente activado, utilizando diferentes concentraciones de glutaraldehído. Las proteínas libre e inmovilizada fueron caracterizadas bioquímicamente (**Tabla 1**). Por su dependencia de calcio para su

actividad, se considera que la pectinasa de 31 kDa corresponde a una pectato liasa.

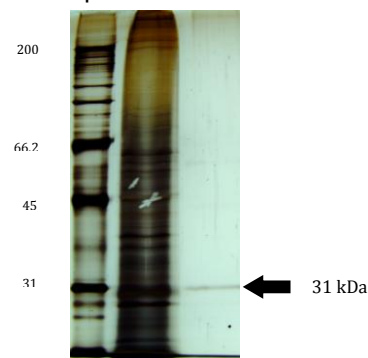


Fig. 1. Gel de poliacrilamida con tinción en plata. Carril 1: Marcador de PM; Carril 2: Sobrenadante de cultivo; Carril 3: Pectinasa pura.

Tabla 1. Caracterización bioquímica de la pectato liasa libre e inmovilizada.

Parámetros	PECTINASA LIBRE	PECTINASA INMOVILIZADA
Temperatura óptima	70°C	80°C
pH óptimo	9	10
Km (g/l)	$3.1E^{-2}$	$2.74E^{-4}$
V_{max} (U/mg)	0.777	0.548
Termoestabilidad	50% actividad 55 °C 6 días 65 °C 90 min 75 °C 80 min	29 días 100 h 80 min
Reutilización	ND	49 ciclos (50% actividad original)

Conclusiones. La inmovilización de la pectato liasa de 31 kDa de *P. popilliae* a Nylon-6 favoreció las características de la enzima, tales como la termoestabilidad, y la estabilidad operacional.

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

Bibliografía:

1.-Collmer A, Ried JL, Mount MS (1988) Assay methods for pectic enzymes. *Methods Enzymol* 161:329-335.