

MECANISMO DE EXCRECIÓN DE ENDO-POLIGALACTURONASA DE *Kluyveromyces marxianus*

Alma Cruz-Guerrero, Nidia Abud-Gómez, Angélica Flores-Najera, Lorena Gómez-Ruiz, Mariano García-Garibay
Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
AP 55-535, C.P. 09340, Fax: 58-04-47-12, e-mail:aec@xanum.uam.mx

Palabras clave: pectinasa, *Kluyveromyces*, excreción proteica

Introducción. La cepa *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-278 ha sido reportada como una excelente productora de endo-poligalacturonasa extracelular (1). Hasta la fecha, no se había reportado la presencia de pectinasa intracelular, considerándose por lo tanto, que la actividad pectinolítica de esta levadura era exclusivamente extracelular.

En este trabajo se determinó la existencia de una enzima intracelular y se estudiaron las diferencias en el patrón electroforético entre ésta y la extracelular. Un cambio en este patrón electroforético podría dar alguna luz en el mecanismo de excreción de la enzima.

Metodología. Se utilizó la cepa *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-278. El medio de cultivo contenía 0.2% de (NH₄)₂SO₄, 0.05% de KH₂PO₄, 0.05% de MgSO₄, 0.67% de base libre de nitrógeno para levaduras y 1% de glucosa. El caldo de fermentación se centrifugó (3500 rpm por 30 min) y el sobrenadante se usó como endo-poligalacturonasa (endo-PG) extracelular. Las células se enjuagaron con solución amortiguadora de acetatos y se permeabilizaron con alcohol isoamílico para extraer la pectinasa intracelular. La actividad enzimática se determinó por hidrólisis de ác. poligalacturónico midiendo aumento de reductores por la técnica de Somogyi-Nelson (2). El análisis electroforético se realizó en condiciones no desnaturalizantes en geles de poliacrilamida (T=7.5%). Para la detección de actividad enzimática se usaron geles de poliacrilamida/ác. poligalacturónico y se tiñeron con rojo de rutenio.

Resultados y Discusión. En el análisis electroforético (Figura 1), se observó que el extracto intracelular presenta 8 bandas de proteína de las cuales solo tres tiene actividad enzimática. Mientras que el sobrenadante extracelular solo presenta tres bandas de proteína y todas mostraron actividad enzimática con lo que se corrobora que *Kluyveromyces marxianus* sólo excreta al medio la endo-PG.

Tabla 1. Pesos moleculares de las diferentes endo-PG

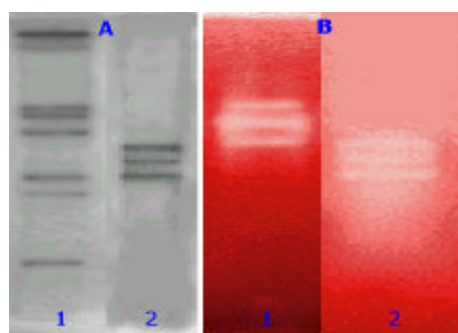
Proteína	PM ₁ * (kDa)	PM ₂ * (kDa)	PM ₃ * (kDa)
Pectinasa			
Extracelular	38.6	35.7	31.8
Intracelular	80.6	70.5	57.7

*Pesos moleculares

Por otra parte, se determinaron los pesos moleculares de las bandas de proteína con actividad enzimática (Tabla 1). Estos resultados nos sugieren que probablemente las enzimas

intracelulares son dímeros, que al ser excretados se separan para entonces encontrarlos como monómeros. Dicho proceso se ha reportado para *Kluyveromyces marxianus* en la síntesis de inulinasa intra y extracelular, en donde la inulinasa intracelular esta como tetrámero mientras que la extracelular como dímero (3). El punto isoeléctrico encontrado para las endo-PG intracelulares fue de 6.0 y para las extracelulares fue 5.0.

Figura 1. Electroforesis en gel de poliacrilamida de endo-poligalacturonas producidas por *Kluyveromyces marxianus*. A. Detección de proteína. B. Detección de actividad enzimática.



Carriles: 1.- endo-PG intracelular, 2.- endo-PG extracelular.

Conclusiones. Se demostró la existencia de endo-PG intracelular en *Kluyveromyces marxianus*, lo cual no había sido reportado previamente. Dado que las bandas con actividad del sobrenadante extracelular, son de la mitad del peso molecular que el de las encontradas en el extracto intracelular, se puede pensar que el mecanismo de excreción es similar al reportado para la inulinasa (3).

Bibliografía. 1. Espinoza P., Bárzana E., García-Garibay M. y Gómez-Ruiz L. (1992). Evaluation of *Kluyveromyces marxianus* for the production of lactase simultaneously to pectinase or inulinase. *Biotechnol. Lett.* 14(11):1053-1058.
2. Cruz-Guerrero A., Bárzana E., García-Garibay M. y Gómez-Ruiz L. (1999). Dissolved oxygen threshold for the repression of endo-polygalacturonase production by *Kluyveromyces marxianus*. *Process Biochem.* 34(6-7):621-624.
3. Rouwenhorst R., Hensing M., Verbakel J. (1990). Structure and properties of the extracellular inulinase of *Kluyveromyces marxianus* CBS6556. *App. Environm. Microbiol.* 56(11):3373-3345