

CARACTERIZACION DE INULINASAS DE *Kluyveromyces marxianus*

Alma Cruz-Guerrero, Anabel Mosco-Rocha, 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: *inulinasa, Kluyveromyces, excreción proteica*

Introducción. La levadura *Kluyveromyces marxianus* ha sido estudiada para la producción de inulinasa, con el interés fundamental de producir fructosa a partir de inulina. La cepa *K. marxianus* CDBB-L-278 ha sido previamente reportada por nuestro grupo como una cepa hiperproductora de inulinasa, produciendo mas de 3 veces la cantidad de enzima de otras cepas productoras (1). Dicha levadura, produce inulinasa intra y extracelularmente. En este trabajo se estudiaron las diferencias en el patrón electroforético entre la inulinasa intracelular y la inulinasa extracelular, con el fin de obtener hechos que nos lleven a entender el mecanismo de excreción de la enzima.

Metodología. Se utilizó la cepa *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-278. El medio de cultivo contenía 0.1% de (NH₄)₂SO₄, 0.67% de base libre de nitrógeno para levaduras y 1% de inulina. El caldo de fermentación se centrifugó (3500 rpm por 30 min) y el sobrenadante se usó como inulinasa extracelular. Las células se enjuagaron con solución amortiguadora de fosfatos y se permeabilizaron con alcohol isoamílico para extraer la inulinasa intracelular. La actividad enzimática se determinó por hidrólisis de sacarosa midiendo aumento de reductores por la técnica de Somogyi-Nelson. El análisis electroforético se realizó en condiciones no desnaturalizantes en geles de acrilamida (T=7.5%). La detección de actividad enzimática en gel se realizó según lo reportado por Gabriel and Wang (2)

Resultados y Discusión. En el análisis electroforético (Figura 1), se observó que el extracto con la inulinasa intracelular presentó 6 bandas de proteína de las cuales solo una tiene actividad enzimática. Mientras que el sobrenadante con la inulinasa extracelular presentó cuatro bandas de proteína y también solo una mostró actividad enzimática.

Se determinaron los pesos moleculares de las bandas de proteína con actividad enzimática, encontrándose que para la inulinasa intracelular fue de 143 kDa mientras que para la inulinasa extracelular fue 114.8 kDa. Es interesante notar que las otras 3 bandas observadas tienen pesos moleculares similares a los encontrados para bandas con actividad pectinolítica en otro cultivo. El pH isoelectrico para la enzima intracelular fue de 4.0, mientras que para la extracelular fue 3.0-3.5.

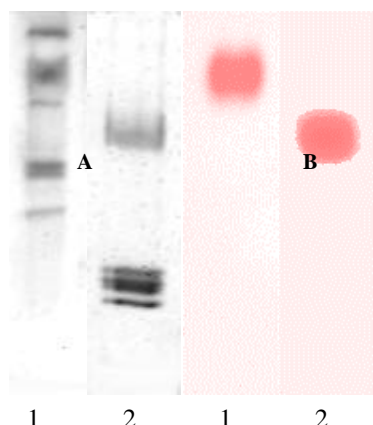


Figura 1. Electroforesis en gel de poli-acrilamida de inulasas producidas por *Kluyveromyces marxianus*. **A.** Detección de proteína. **B.** Detección de actividad enzimática. Carriles: 1.- Inulinasa intracelular, 2.- Inulinasa extracelular.

Conclusiones. Dado que los pesos moleculares obtenidos para las inulasas intra y extracelular son muy cercanos y que la actividad enzimática se conservó podemos decir que probablemente la diferencia este ocasionada por un distinto grado de glicosilación, el cual se ha reportado que puede oscilar entre un 26 a 37% de peso total de la inulinasa (3). Además, esta levadura ha sido

previamente reportada por nuestro grupo como una cepa hiperproductora de inulinasa y desreprimida, lo cual puede tener como consecuencia que la enzima producida y excretada al medio sea muy semejante a la enzima intracelular, a diferencia de lo que sucede en otras cepas como lo reportado por Rouwenhorst et al (3). Aunque debemos comprobar la actividad pectinolítica de las otras tres bandas observadas en el extracto extracelular, podemos suponer que la levadura produce ambas enzimas en estas condiciones de cultivo.

Bibliografía. 1. Cruz-Guerrero A., García-Peña I., Bárzana E., García-Garibay M. y Gómez-Ruiz L. (1995). *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L278: A Wild Inulinase Hiperproducing Strain. *J. Ferment. Bioeng.* 80(2):159-163.
2. Gabriel Othmar, Wang Shu-Fong. (1969). Determination of Enzymatic Activity in Polyacrylamide Gels. *Analytical Biochemistry* 27: 545-554
3. Rouwenhorst R., Ritmeester W.S., Scheffers A., VanDijken J.P. (1990). Localization of Inulinase and Invertase in *Kluyveromyces* species. *App. Environm. Microbiol.* 56(11):3329-3336