

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

IZTAPALAPA

✓ CBS

PRACTICA DE BIOQUIMICA AVANZADA

✓ SEPARACION DE LAS PROTEINAS EXCRETADAS

POR Kluyveromyces marxianus CON ACTIVIDAD DE

ENDO-POLIGALACTURONASA

✓ ALUMNO: OCTAVIO DUBLAN GARCIA

✓ MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

ASESORES

✓ MB ALMA ELIZABETH CRUZ GUERRERO  
MC LORENA DEL CARMEN GOMEZ RUIZ

1999

## SEPARACIÓN DE LAS PROTEÍNAS EXCRETADAS POR *Kluyveromyces marxianus* CON ACTIVIDAD DE ENDO-POLIGALACTURONASA.

### I INTRODUCCIÓN:

Las enzimas pectinolíticas son de gran importancia en la industria alimentaria por los efectos que tiene sobre la textura de los alimentos, ya que muestran actividad macerativa hacia los tejidos de los vegetales, además de su uso en el proceso de vinos y jugos de frutas y vegetales, pues causa la hidrólisis parcial o total de las pectinas suspendidas con lo cual disminuye la turbiedad y viscosidad de éstos, mejorando así su apariencia.

En la actualidad a nivel industrial se utilizan las pectinasas producidas por hongos ya que se producen en forma extracelular, lo cual presenta ventajas para su recuperación del caldo de fermentación, así mismo la mezcla de enzimas pectinolíticas que se tienen en los filtrados libres de células, es capaz de disminuir la viscosidad de jugos de frutas, vinos y almibares (Frances et al, 1990), facilita la maceración de frutas, dando como resultado mayores rendimientos en la obtención de jugos (Saval et al, 1983), eleva el rendimiento de zumos de frutas y mejora la extracción del color de las pieles y de las frutas y vegetales macerados (Owen, 1991)

*Kluyveromyces marxianus*, es productora de varias enzimas, pero bajo condiciones microaerobias o en presencia de pectina solo excreta endo-poligalacturonasa al medio, lo que facilita su recuperación. Esta enzima se podría utilizar en la industria alimentaria ya que se ha demostrado en pruebas de laboratorio, que es capaz de clarificar eficientemente los jugos de manzana (Gómez-Ruiz et al, 1988), pues cataliza la despolimerización de sustancias pécticas (Takuo et al, 1983) atacando los enlaces internos dando como resultado una rápida reducción de la viscosidad (Suckling, 1990), además de que es efectiva en la maceración de tejidos de papa y zanahoria (Lim et al, 1980).

En estudios previos se ha demostrado que algunos factores ambientales tales como el oxígeno disuelto, temperatura, así como Tween-80, pueden ser capaces de inducir o reprimir la excreción de la pectinasa en *K. marxianus*. Se sabe que bajo condiciones

óptimas de crecimiento, la presencia de Tween-80 en concentraciones de 0.1% se induce la producción de la endo-poligalacturonasa, Martínez-Monroy 1997.

Al realizarse un análisis electroforético de la endo-poligalacturonasa excretada por *Kluyveromyces marxianus* se observó una banda muy ancha correspondiente al medio con Tween-80 lo cual concuerda con su peso molecular, el cual fue de 94,723 Daltons (Dublán 1998).

En este trabajo se pretende separar las proteínas excretadas por *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-278 con actividad de endo-poligalacturonasa, en un medio que contiene Tween-80 comparándolo con un medio control que solo contiene glucosa.

## II. ANTECEDENTES:

Las levaduras son microhongos que se encuentran generalmente en forma de células únicas y que se producen por gemación. Algunas levaduras se encuentran únicamente como células individuales y a veces forman cadenas cortas, mientras que otras pueden formar diversos tipos de filamentos. Una característica de la población en crecimiento de las células de la levadura es la presencia de yemas, producidas cuando la célula se divide. En las levaduras, la envoltura celular incluye la membrana citoplásmica, constituida por lípidos, proteínas y mananos, el espacio periplásmico y la pared celular, que contiene algunas proteínas y gran cantidad de glucano y manano (Owen, 1991).

De acuerdo a la clasificación de las levaduras, *Kluyveromyces marxianus* es una levadura ascospórogena, pertenece al grupo de las Eumycota del tipo Hemiascomycetes que se encuentran dentro de la clase Ascomicotina. Es del orden Endomycetales; de la familia Saccharomycetaceae y subfamilia Saccharomycetoideae; del género *Kluyveromyces* y de la especie *marxianus*. Produce de 1 a 4 ascosporas, su forma va de reniforme a media luna, puede fermentar glucosa, galactosa, lactosa, sacarosa, rafinosa, D-xilosa e inulina. No asimila nitrato. Crece a 37°C (Cruz-Guerrero, 1995).

Por otro lado *Kluyveromyces marxianus* es productora de enzimas como  $\beta$ -fructofuranosidasa,  $\beta$ -galactosidasa y la endo-poligalacturonasa entre otras (Cruz-Guerrero, 1995). Estas se podrían utilizar en la industria alimentaria, por lo que dicha levadura se considera de gran potencial económico (Espinoza et al. 1992).

En el caso particular de la pectinasa de *K. marxianus* se ha demostrado su uso en la maceración en tejidos de papa y zanahoria. (Lim et al. 1980, Takuo et al. 1983). Gómez-Ruiz et al. (1988), reportaron que la endo-poligalacturonasa de esta levadura es tan efectiva en la clarificación de jugo de manzana como la pectinasa comercial.

De acuerdo con Lim et al. (1980) y Frances et al. (1990) la pectinasa de *K. marxianus* es un sistema multienzimático formado por cuatro endo-poligalacturonasas, a las que se denominan enzima I, enzima II, enzima III y enzima IV. Las propiedades de estas enzimas se encuentran en la tabla 1.

**Tabla 1 PROPIEDADES DE ENDO-POLIGALACTURONASA DE *Kluyveromyces marxianus***

	ENZIMA I	ENZIMA II	ENZIMA III	ENZIMA IV
pI (Punto isoelectrico)	6.3	6.0	6.3	5.7
Peso molecular M(Daltons)	49600	49600	46700	49600
pH (óptimo)	4-5	4-5	4-5	4-6
T °C (óptima)	50	50	50	50

(Lim, J. et al. 1980, Frances, M. et al. 1990)

Las cuatro enzimas son glicoproteínas, cuyo principal carbohidrato es la manosa, las cuatro son estables entre valores de pH de 3.5 a 6.0 y a temperaturas mayores que 50 °C, pero pierden la mayoría de su actividad a 70°C.

Por otro lado Smith y Pyle (1990), encontraron que existen nueve endopoligalacturonasas producidas por *K. marxianus* con un punto isoelectrico en el intervalo de 5.6-6.5, así como un peso molecular en la región de 43000 Da.

### III. OBJETIVOS:

#### OBJETIVO GENERAL:

Separar las diferentes proteínas con actividad de endo-poligalacturonasa producidas por *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-278 en un medio que contiene Tween-80 y medio control que contiene glucosa, por medio de técnicas básicas de bioquímica.

#### OBJETIVO PARTICULAR:

Aprender técnicas de bioquímica tales como:

- Ultrafiltración
- Determinación de actividad enzimática por aumento de azúcares reductores por el método de Nelson-Somogyi.
- Determinación de proteína por el método de Lowry.
- Electroforesis en geles de poliacrilamida.
- Separación de proteína por punto isoeléctrico (utilizando rotofor. Bio Rad)

#### IV. PLAN DE TRABAJO:

Se llevó a cabo la producción de la endo-poligalacturonasa en presencia de glucosa (medio control) y Tween-80 a 30 °C, con agitación constante en condiciones microaerobias.

Una vez obtenida la endo-poligalacturonasa, por medio de centrifugación a 3500 r.p.m. durante 30 min., se separará de la biomasa, y el sobrenadante del caldo de fermentación se le llamará extracto crudo, se le determinará actividad enzimática por medio del método de Nelson-Somogyi (1944) y proteína por medio de Lowry (1951).

Parte del extracto crudo se concentró por medio de ultrafiltración con membranas de corte de 10,000 Da a este concentrado se le denominó extracto enzimático, al cual se le determinó actividad enzimática y proteína por los métodos de Nelson-Somogyi y Lowry respectivamente. La concentración de este extracto es con el fin de tener la concentración adecuada para llevar a cabo el análisis electroforético en un sistema no desnaturizante.

La otra parte del extracto crudo se pasó a través del rotofor para poder llevar a cabo la separación de las diferentes proteínas por punto isoelectrico. Una vez obtenidas las fracciones se les determinó actividad enzimática y proteína.

Finalmente, se realizó nuevamente el análisis electroforético de las muestras que presentaron actividad para saber cuantas proteínas endo-pligalacturonasa excreta *Kluyveromyces marxianus* bajo las condiciones de fermentación establecidas.

## V METODOLOGÍA

### V.1 PRODUCCIÓN DE LA ENDO-POLIGALACTURONASA

#### V.1.1. MICROORGANISMO

Este estudio se llevó a cabo utilizando la cepa *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-278 que proviene del cepario del Departamento de Bioingeniería y Biotecnología del Centro de Investigaciones de Estudios Avanzados, Instituto Politécnico Nacional, México.

#### V.1.2. MEDIOS DE CULTIVO

Para la producción de la endo-poligalacturonasa se utilizaron los medios de cultivo que presentan la siguiente composición:

Medio con glucosa (control):

0.1% Sulfato de amonio ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ )

0.05% Sulfato de magnesio ( $\text{MgSO}_4$ )

0.05% fosfato de potasio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )

1.0% Glucosa

0.67% Base libre de nitrógeno para levaduras (YNB)

Medio con Tween-80

Este medio se preparó igual que el medio glucosa, pero adicionándole 0.1% de Tween-80

Una vez adicionados todos los componentes de cada medio, se esterilizaron a  $121^\circ\text{C}$  ( $15 \text{ lb/pg}^2$ ), durante 15 minutos.



La base libre de nitrógeno para levaduras, se usó con la finalidad de asegurar que el único compuesto nitrogenado que se encontraba en el medio además del sulfato de amonio, era el correspondiente a las proteínas producidas por *Kluyveromyces marxianus*.

### V.1.3. CONDICIONES DE CULTIVO

Las fermentaciones se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer de 500 mL, con un volumen de trabajo de 100 mL, tapados con algodón, éstos se incubaron a 30°C, con una agitación de 200 r.p.m. en un agitador con incubadora ambiental New Brunswick modelo G 24.

Al cabo de 48 horas se separó la biomasa mediante centrifugación a 3,500 r.p.m. durante 30 min. a 4°C en una centrífuga refrigerada Beckman J2-M1, y el sobrenadante se utilizó como extracto enzimático crudo.

## V.2. ACTIVIDAD ENZIMATICA DE ENDO-POLIGALACTURONASA

La determinación de la actividad enzimática se llevó a cabo midiendo el aumento de azúcares reductores por el método de Nelson-Somogyi (1944), debido a la acción de la endo-poligalacturonasa en una disolución de ácido poligalacturónico.

A 9.9 mL de disolución de ácido poligalacturónico 0.1% (preparado en una disolución amortiguadora de acetatos 0.1 M, pH 5.0), que se utilizó como sustrato, se le adicionó 0.1 mL de disolución de enzima, esto se incubó a 30°C, tomándose alícuotas de 1 mL a los minutos 1, 5, 10 y 15, considerando estos tiempos como el transcurrido desde el momento en que la enzima entra en contacto con el ácido poligalacturónico hasta que se mezcla con el reactivo I de Nelson-Somogyi, contenido en la serie de tubos, con lo cual se detiene la reacción, y se procede según la técnica de Nelson-Somogyi.

### V.2.1. Técnica para la determinación de reductores (Nelson-Somogyi, 1944)

En un tubo de ensaye se colocó 1 mL de muestra más 1 mL de reactivo I. Se Incubó 20 min. en baño de agua hirviendo, se enfrió, se agregó 1 mL de reactivo II, se agitó vigorosamente, se agregó 17 mL de agua destilada. se agitó y leyó en espectrofotómetro (Shimadzu UV-160A) a 520 nm.

### V.2.2. Curva patrón

Los datos obtenidos se correlacionaron en una curva patrón de ácido galacturónico de concentración de 0-0.0004g/mL en agua, y se leyó a 520 nm. Posteriormente se determinaron las unidades de actividad de endo-poligalacturonasa (UPg) considerándose como la cantidad de enzima necesaria para liberar un micromol de azúcar reductor por minuto a 30°C y pH 5.0.

Para llevar a cabo la determinación de azúcares reductores fue necesario elaborar los reactivos que a continuación se mencionan:

#### Reactivo I

##### Disolución A:

En 500 mL de agua se disolvieron: 25g de carbonato de sodio anhidro ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), 25g de tartrato de sodio y potasio ( $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ), 20g de bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ) y 200g de sulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), y se aforó a 1 litro.

##### Disolución B:

En 200 mL de agua destilada se agregaron 4 gotas de ácido sulfúrico concentrado ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), y se disolvieron 30g de sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ).

Para preparar el reactivo, se mezcló 1 mL de disolución B más 25 mL de disolución A.

## Reactivo II

### Disolución A:

En 450 mL de agua destilada se disolvieron 21 mL de ácido sulfúrico concentrado ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) y 25 g de molibdato de amonio ( $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ).

### Disolución B:

Se disolvió en 25 mL de agua destilada 3g de arseniato de sodio ( $\text{Na}_2\text{HAsO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ).

Se mezcló lentamente con agitación las disoluciones A y B. se aforó a 500 mL y se calentó a  $55^\circ\text{C}$  por 30 min.

## V.3. DETERMINACION DE PROTEÍNA

El método de Lowry, (1951) se basa en la formación del complejo cobre-proteína en condiciones alcalinas, seguida de una reacción óxido-reducción con el reactivo de Folin.

Para esta determinación se requirió la preparación de los siguientes reactivos:

- A) Carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) al 2% en NaOH 0.1 N
- B) Sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) al 1%
- C) Tartrato de sodio y potasio ( $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) al 2%
- D) Reactivo de Folin 1:1 con agua (preparado al momento de usarlo).

### V.3.1. Técnica:

- 1) Se mezclaron 50 mL del reactivo A mas 1 mL del reactivo B y 1 mL del reactivo C
- 2) Se tomaron 5 mL de lo anterior y se adicionó 1 mL de muestra problema

- 3) Se dejó reposar 10 min. en la oscuridad
- 4) Posteriormente se agregaron 0.5 mL de la disolución D
- 5) Se dejó reposar 30 min. en la oscuridad.
- 6) Las muestras se leyeron en espectrofotómetro (Shimadzu UV-160A) a  $\lambda = 590$  nm. contra un blanco de reactivos y agua.
- 7) Los datos obtenidos se correlacionaron con una curva patrón de seroalbúmina-bovina de concentración de 0-500  $\mu\text{g/mL}$

#### **V.4. CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA**

Se llevó a cabo la concentración del extracto enzimático crudo por medio de un filtro de corte de 10 kDa. por medio de centrifugación, hasta obtener un concentrado adecuado (aproximadamente 260  $\mu\text{g/mL}$ ) para llevar a cabo el análisis electroforético.

#### **V.5. ANALISIS ELECTROFORETICO DE ENDO-POLIGALACTURONASA**

Una vez obtenido los concentrados enzimáticos de cada uno de los medios, se llevó a cabo la caracterización electroforética de éstos, para determinar la diferencia existente entre los medios.

Las muestras de endo-poligalacturonasa previamente concentradas, se sometieron a la técnica de electroforesis no desnaturizante, para la cual requiere de los reactivos que se mencionan a continuación:

1) Disolución de acrilamida/bis (T=30% C= 2.67%). Se pesaron 14.6g de acrilamida, 0.4g de N'N'-bis-metilen-acrilamida, se disolvieron en 35 mL de agua y se aforó a 50 mL.

2) Amortiguador Tris-HCl 1.5M, pH 8.8 (para gel de separación). Se pesaron 18.15g de base-Tris y se aforó a 100 mL, se ajustó a pH 8.8 con HCl 6N.

3) Amortiguador Tris-HCl 0.5M, pH 6.8 (para gel de concentración). Se pesaron 6.0g de base-tris y se aforó a 100 mL, se ajustó a pH 6.8 con HCl 6N.

4) Amortiguador 5X, pH 8.3 (para corrida). Se pesaron 9.0g base-tris, 43.2g de glicina y se adicionaron a 600 mL. Para una corrida electroforética se diluyeron 60 mL de amortiguador 5X con 240 mL de agua desionizada.

5) Persulfato de amonio al 10%. Se disolvió 0.1 g en 1 mL de agua. Este reactivo se preparó al momento de su utilización.

6) Colorante azul de bromofenol. Se agregó 0.01 g de azul de bromofenol en 172.5 mL de NaOH 0.1 M y se aforó a 25 mL

7) Colorante para corrida de muestras. Se mezclaron 3.8 mL de agua desionizada, 1.0 mL de Tris-HCl pH 6.8, 0.8 mL de glicerol y 0.4 mL de azul de bromofenol (1%).

### V.5.1. Preparación de los geles

#### a) GEL DE SEPARACIÓN

Se prepararon 10 mL de gel de separación utilizando una T= 10% como se indica en la tabla 2

**Tabla 2. Preparación del gel de separación con T= 10%**

REACTIVOS	CANTIDAD
Agua desionizada	4.012 mL
Disolución amortiguadora pH 8.8	2.5 mL
Acilamida/bis	3.33 mL
Persulfato de amonio 10%	50 $\mu$ L
N, N, N', N'-Tetrametilendiamina (TEMED)	5 $\mu$ L

Esta mezcla se deairó durante 15 minutos utilizando vacío, transcurrido este tiempo se adicionó persulfato de amonio (10%) y TEMED. Se colocó inmediatamente esta mezcla entre las placas de vidrio previamente montadas. Después de transcurrido unos minutos se le adicionó gotas de agua para evitar la resequedad de los geles. Se dejaron reposar durante una hora para asegurar la gelificación total.

## b) GEL DE CONCENTRACION

Se prepararon 5 mL de gel de concentración con una T= 3%. utilizando las proporciones indicadas en la tabla 3

Tabla 3. Preparación del gel de concentración con T= 3%.

REACTIVOS	CANTIDAD
Agua desionizada	3.22 mL
Disolución amortiguadora pH 6.8	1.25 mL
Acilamida/bis	0.5 mL
Persulfato de amonio 10%	25 $\mu$ L
N, N, N', N'-Tetrametilendiamina TEMED	5 $\mu$ L

La disolución se dejó durante 15 minutos utilizando vacío, transcurrido este tiempo se adicionó persulfato de amonio (10%) y TEMED. Se eliminó el agua de los geles anteriores e inmediatamente se colocó esta mezcla en las placas de vidrio, acto seguido, se colocaron los peines para marcar los carriles, en los cuales se inyectan las muestras.

### V.5.2. Preparación de las muestras

La preparación de las muestras (Tween-80 y Glucosa) para la corrida de los geles de electroforesis se realizó de la siguiente manera: Se mezclaron 10 $\mu$ L de colorante y 15 $\mu$ L de muestra.

Finalmente, se tomaron 20  $\mu$ L de cada una de las muestras para ser inyectados en los geles.

### V.5.3. Condiciones de electroforesis

Se montó el equipo de electroforesis, el cual consta de una cámara de electroforesis (BIO-RAD Mini-PROTEAN II Cell). Los geles se prepararon entre dos placas de vidrio cuyas dimensiones fueron de 72 x 101 mm, utilizando separadores de 0.75 mm y un peine

del mismo espesor. Para el corrimiento electroforético se utilizó una fuente de poder (BIO-RAD Power Pak 300), la cual se colocó bajo las condiciones óptimas para la corrida ( 4°C. 200 V).

Una vez colocado los geles e inyectadas las muestras se dejó correr durante 55 min. tiempo aproximado para que el colorante azul de bromofenol alcanzara la parte final del gel.

#### **V.6.4. Tinción de los geles**

La tinción de los geles se llevó a cabo con Sypro de la siguiente manera: Una vez terminado el corrimiento electroforético el gel se colocó en una disolución de ácido acético al 7.5% durante 30 minutos, con el fin de fijar la proteína al gel, así como eliminar el colorante del frente de corrimiento, azul de bromofenol, transcurrido el tiempo el gel se colocó en una disolución de SDS al 0.05% en ácido acético al 7.5%, con agitación por 30 minutos; finalmente se colocó el gel en una disolución de Sypro (5 mL en 25 mL de ácido acético al 7.5%) durante 30 minutos.

### **V.6. ANÁLISIS DEL PUNTO ISOELÉCTRICO POR MEDIO DE ROTOFOR**

El extracto crudo de Tween-80 se sometió al rotofor para tratar de separar a la(s) proteínas por su punto isoelectrico.

Se prepararon 60 mL de extracto crudo (243.45µg/ml) en adición con 1.5 mL de anfolito, esta disolución se inyectó al rotofor previamente montado

#### **V.7.1. Condiciones de rotofor**

Se montó el equipo de rotofor (Bio-Rad Cleaning Concentrate, 161-0722), el cual consta de dos membranas de intercambio (aniónica y catiónica), una cámara de intercambio en la cual se encuentra una membrana con 20 carriles. Para evitar un calentamiento excesivo el cual podría desnaturizar a las proteínas se utilizó una fuente de refrigeración

(VWR Scientific products PolySciencie 1160-A) para mantener una temperatura de 4°C. Para el corrimiento de isoelectroenfoque se utilizó una fuente de poder (Power Pac 3000 power supply), con las condiciones óptimas para la corrida (12 W).

Una vez inyectada la muestra se dejó correr durante un intervalo de 3-5 hr para la estabilización del voltaje. Transcurrido el tiempo se colectaron las veinte fracciones en tubos de ensayo de 12 x 75 mm los cuales estaban contenidos en una cámara de recolección conectada al vacío.

Al finalizar el corrimiento se midió pH y actividad enzimática de las fracciones obtenidas.



## VI RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizaron fermentaciones en medio de cultivo en presencia de glucosa y Tween-80 (0.1%) con la cepa de *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-278.

Los resultados de actividad enzimática y proteína en los extractos crudos se presentan en la tabla 4.

Tabla 4. Comparación de la endo-poligalacturonasa excretada por *Kluyveromyces marxianus* en diferentes medios.

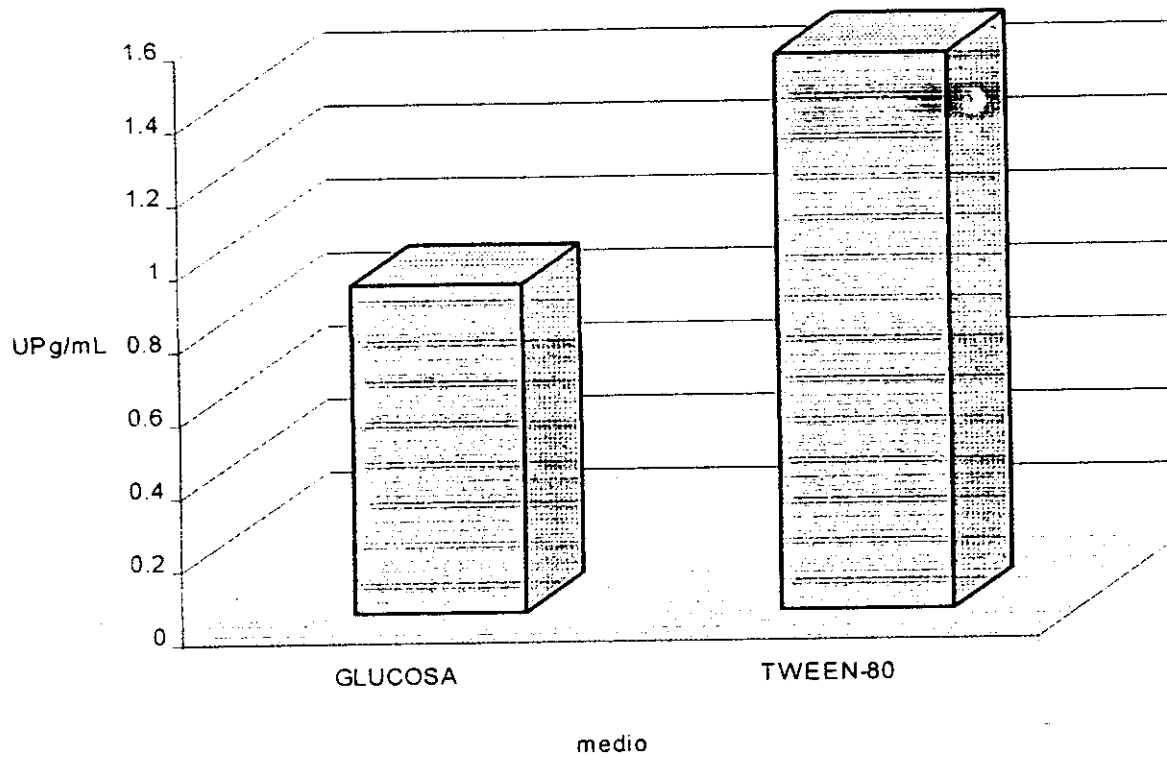
MEDIO DE CULTIVO	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA (UPg/mL)	PROTEÍNA ( $\mu\text{g/mL}$ )	ACTIVIDAD ESPECÍFICA (UPg/mg prot.)
GLUCOSA	0.9647	135.34	7.128
TWEEN-80	1.5247	243.45	6.503

En presencia de Tween-80, el aumento de proteína fue evidente, esto puede deberse a que estos surfactantes actúan sobre la pared celular incrementando la permeabilidad de ésta en la levadura liberándose así una mayor cantidad de proteína, como teportan Resse y Maguire (1968) y Lestan et al. (1994).

Mientras que la actividad enzimática en presencia de Tween-80 también se observó un aumento significativo, el cual puede deberse al efecto causado por el surfactante.

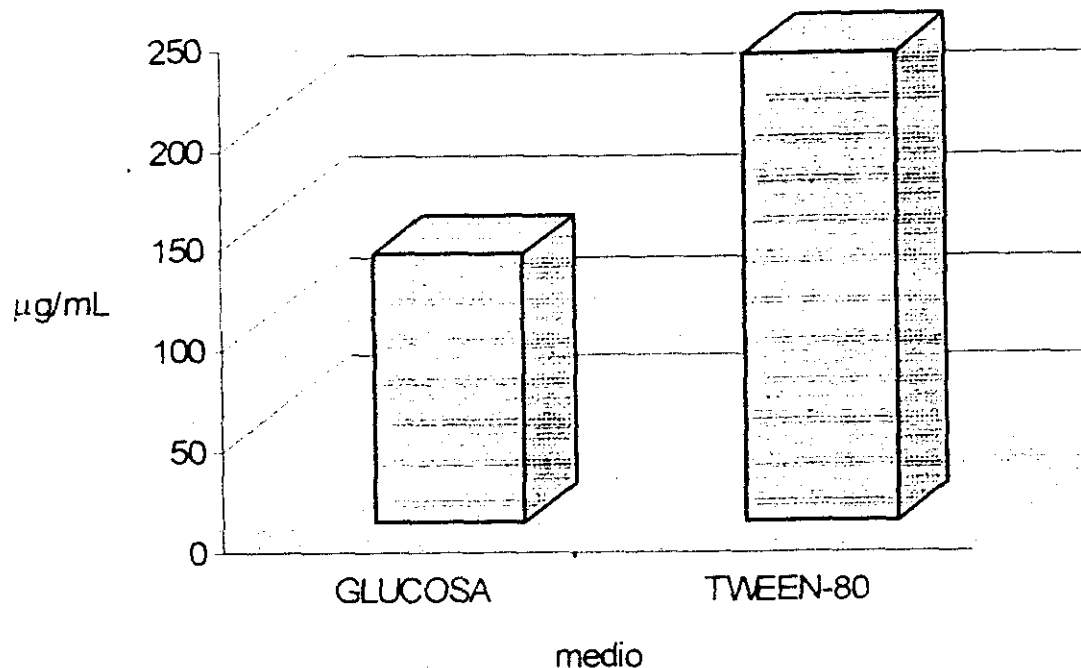
En la gráfica 1 se hace una comparación de la actividad enzimática de la endo-poligalacturonasa entre los dos diferentes medios.

Gráfica 1. Comparación de la actividad enzimática de la endo-poligalacturonasa excretada por *Kluyveromyces marxianus*.



En la gráfica .2, se hace una comparación de la proteína obtenida en los diferentes medios, observándose una mayor producción en el medio con Tween-80.

Gráfica 2. Comparación de proteína excretada por *Kluyveromyces marxianus*.



Posteriormente se llevó a cabo la concentración de la enzima por medio de un filtro con poro de corte de 10 kDa, con esto se obtuvo la enzima concentrada en los diferentes medios con el objeto de tener la concentración adecuada para la electroforesis

#### VI.1. ANÁLISIS DEL ISOELECTROENFOQUE DE LA ENDO-POLIGALACTURONASA

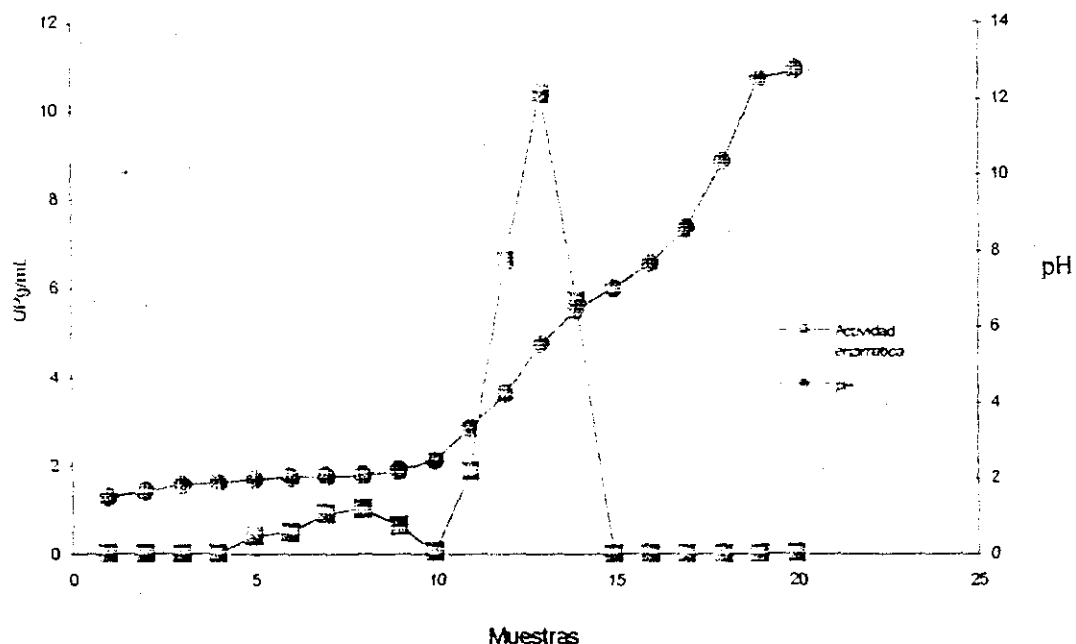
Al realizar el corrimiento para lograr la separación de la endo-poligalacturonasa por medio del rotófor se obtuvieron veinte fracciones con sus respectivos pH, así mismo se determinó actividad enzimática de cada una de las muestras para poder determinar que fracción(es) contiene(n) actividad enzimática, datos que se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Actividad enzimática y pH obtenidos en las diferentes fracciones

Muestra	pH	Actividad enzimática ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ )	Muestra	pH	Actividad enzimática ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ )
1	1.51	0.00	11	3.34	1.8785
2	1.66	0.00	12	4.23	6.6447
3	1.83	0.00	13	5.53	10.39781
4	1.88	0.00	14	6.46	5.7138
5	1.96	0.3872	15	7.02	0.00
6	2.02	0.49007	16	7.66	0.00
7	2.05	0.90982	17	8.58	0.00
8	2.06	1.0232	18	10.33	0.00
9	2.20	0.63709	19	12.52	0.00
10	2.47	0.05489	20	12.78	0.00

Con los resultados obtenidos se realizó la gráfica 3 con cada una de las muestras observándose dos picos de actividad en donde el mayor se encuentra comprendido entre las fracciones 12-14, muestras que contienen un pH 4.23, 5.53 y 6.46 respectivamente y el pico menor comprendido en las fracciones 7-9, las cuales presentaron un pH de 2.05, 2.06 y 2.20

Gráfica 3. Comparación de Actividad de la endo-poligalacturonasa en las diferentes fracciones obtenidas con respecto al pH.



En las muestras en que observó el pico de mayor actividad presentaron un pH cercano al punto isoelectrico de la endo-poligalacturonasa, el cual se encuentra en un intervalo de 5.7-6.3 (Lim, J. et al. 1980, Frances, M. et al. 1990). Con estos resultados podemos decir que se logró separar a las isoenzimas por su punto isoelectrico.

Dado que en las fracciones 12 a 14 se encontró la mayor actividad y un pI cercano al que nos reporta la literatura se decidió someterlas a un análisis de electroforesis.

## VI.2. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO DE LA ENDO-POLIGALACTURONASA

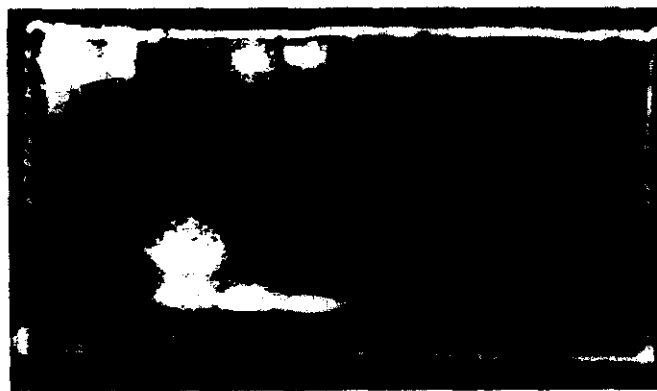
Para evaluar si existía alguna diferencia en las obtenidas de la endo-poligalacturonasa, se realizó la electroforesis utilizando una proporción en los geles de acrilamida-bisacrilamida de T=10%.

En la figura 1, se observó que para el concentrado enzimático de Tween-80, hay un pequeño barrido, es decir se tienen otras bandas con diferente peso molecular, las cuales están tan unidas que solo se logra ver una banda ancha, por esta razón da un patrón

electroforético diferente al de la endo-PG producida en medio con glucosa. A pesar de que la banda mayoritaria en este medio está al mismo nivel de la otra banda, con solo este análisis electroforético no se puede afirmar que ésta sea similar y además actúe de la misma manera que la del medio control, pues al momento de su excreción ésta pudo haber cambiado en su estructura.

Con respecto a las fracciones obtenidas (13 y 14), se observa un patrón electroforético similar de una de sus bandas en cuanto a la muestra control (glucosa) y tween-80, sin embargo a la altura del frene de color se observa que hay otra banda (proteína de bajo peso molecular) en cada una de esta muestras. Por otro lado podemos observar que la fracción 12 obtuvo un patrón electroforético diferente tanto del medio control y a Tween-80, como de las fracciones 13 y 14, ya que se observaron dos bandas de peso molecular bajo. Con estos resultados se observa que se tuvo una separación de las isoenzimas de la endo-poligalacturonasa.

**Fig. 1 Electroforesis en gel de poliacrilamida de la endo-poligalacturonasa excretada por *Kluyveromyces marxianus* (no desnaturalizante T=10%)**



En los carriles I y II se muestran la endo-Pg obtenida con medio Tween-80 y glucosa respectivamente, en los carriles III, IV y V se observan las muestras 12, 13 y 14 respectivamente.

## VII. CONCLUSIONES:

-Se observó un aumento de proteína así como de actividad enzimática en el medio con Tween-80 debido a que probablemente este surfactante actúa sobre la pared celular incrementando la permeabilidad de ésta en la levadura, permitiendo así liberación de una mayor cantidad de proteína.

- Se lograron separar diferentes proteínas con actividad de endo-poligalacturonasa producidas por *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-278 en un medio que contiene Tween-80 utilizando un gradiente de pH.

-Las fracciones 12, 13 y 14 obtenidas mediante el análisis de isoelectroenfoque tienen diferente pI, coincidiendo éstos con los reportados (5.7-6.3) para la endo-poligalacturonasa (Lim, J. et al. 1980, Frances, M. et al. 1990), y además en estas fracciones se obtuvo la mayor actividad enzimática.

- El patrón electroforético de las isoenzimas obtenidas mediante isoelectroenfoque es diferente al patrón de la enzima control (Tween-80 y glucosa).

- Se lograron aprender diferentes técnicas básicas de bioquímica tales como:

- Ultrafiltración
- Determinación de actividad enzimática por aumento de azúcares reductores por el método de Nelson-Somogyi.
- Determinación de proteína por el método de Lowry.
- Electroforesis en geles de poliacrilamida.
- Separación de proteína por punto isoelectrónico utilizando rotofor.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA:

- 1) Cruz-Guerrero A. (1995). Regulación de la síntesis y excreción de enzimas extracelulares de *Kluyveromyces marxianus*. Tesis M. en C. Biotecnología. UAM: Iztapalapa.
- 2) Dublán-García O. (1998). Influencia de 2-desoxiglicosa y Tween-80 en la excreción de la endo-poligalacturonasa de *Kluyveromyces marxianus*. Tesis Q. de A.UNAM.
- 3) Espinoza, P., Bárzana, E., García-Garibay, M., Gómez-Ruiz, L. (1992). Evaluation of *Kluyveromyces marxianus* for the production of lactase simultaneously to pectinase or inulinase. *Biotechnology letters*. 14:1053-1058.
- 4) Frances, M., Barnby, F., Morpeth, P. (1990). Endopolygalacturonase production from *Kluyveromyces marxianus*. I. Resolution, purification and partial characterisation of the enzyme. *Enzyme microb. Technol.* 12(Nov.):891-897.
- 5) Gómez-Ruiz, L., García-Garibay, M., Bárzana, E. (1988) Utilisation of endo-poligalacturonase from *Kluyveromyces fragilis* in clarification of apple juice. *J. Food Sci.* 53:1236-1240.
- 6) Lestan, D., Cernilec, M. and Perdih, A. (1993). Determination of ligninase activity in *P. chrysosporium* pellets with diffuse reflectance spectrophotometry. 38:570-573.
- 7) Lim, J. Yamasaki, Y. Suzuki, Y. Ozawa, J. (1980) Multiple forms of endo-poligalacturonase from *Saccharomyces fragilis*. *Agric. Biol. Chem.* 44(3):473-480.
- 8) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem* 193:25-6275.
- 9) Martínez-Monroy, S. (1997). Efecto del Tween-80 en la producción y/o excreción de endo-poligalacturonasa a partir de *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-278. Reporte de servicio social UAM-I.
- 10) Nelson, N. (1944). A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* 153(2):375-380.
- 11) Owen, P.W., 1991. Biotecnología de la fermentación. Principio, Procesos y Productos. Edit. Acribia, S.A. Zaragoza (España).
- 12) Reese, E.T. and Maguire, A. (1969). Surfactants as Stimulants of Enzyme Production by Microorganisms. *Applied Microbiology.* 17(2):242-245.



- 13) Saval, S., Solórzano, R.M., Alpizar, L., Cea, A. y Huitrón, C. (1983). Producción de Pectinasas Microbiana a partir de la Pulpa del Henequén., Biotecnología de Enzimas. Depto. de Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.
- 14) Smith, A. and Pyle, D. (1990). Two-dimensional electrophoretic analysis of endopoligalacturonases produced by *Kluyveromyces marxianus*. *J. Food Biochem.* 14:273-281.
- 15) Suckling, C. (1990). *Enzyme chemistry. Impact and applications.* 2<sup>a</sup> edition. Chapman and Hall. London.
- 16) Takuo, S. Okushima, M. Yoshitake, S. (1983). Purification. Crystallisation and some properties of endo-poligalacturonase from *Kluyveromyces fragilis*. *Agric. Biol. Chem.*, 48(8), 1951-1961.

CALENDARIO DE TRABAJO:

SEMANA	ACTIVIDADES A REALIZAR
5ª	<ul style="list-style-type: none"> <li>• INICIAR FERMENTACIÓN PARA LA PRODUCCIÓN DE LA ENDO-POLIGALACTURONASA A PARTIR DE <i>Kluyveromyces marxianus</i> CDBB-L-278. Y SEPARAR LA BIOMASA DE LA ENZIMA POR MEDIO DE CENTRIFUGACIÓN.</li> </ul>
6ª	<ul style="list-style-type: none"> <li>• MEDIR ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA ENDO-POLIGALACTURONASA CON EL MÉTODO DE NELSON-SOMOGYI (medición de azúcares reductores)</li> <li>• MEDIR PROTEÍNA PRODUCIDA UTILIZANDO EL MÉTODO DE LOWRY.</li> </ul>
7ª	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CONCENTRAR UNA PEQUEÑA PORCIÓN DEL EXTRACTO CRUDO POR MEDIO DE ULTRAFILTRO CON MEMBRANA DE CORTE DE 5,000 Da. POSTERIORMENTE LLEVAR A CABO ELECTROFORESIS EN MEDIO NO DESNATURALIZANTE, CON EL FIN DE PODER OBSERVAR A LA PROTEÍNA EN ESTUDIO.</li> </ul>
8ª	<ul style="list-style-type: none"> <li>• LLEVAR A CABO LA SEPARACIÓN DE LA PROTEÍNA POR SU PUNTO ISOELÉCTRICO UTILIZANDO ROTOFOR.</li> </ul>
9ª	<ul style="list-style-type: none"> <li>• UNA VEZ OBTENIDO LAS DISTINTAS FRACCIONES DE LA PROTEÍNA MEDIR ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA ENDO-POLIGALACTURONASA CON EL MÉTODO DE NELSON-SOMOGYI (medición de azúcares reductores)</li> <li>• MEDIR PROTEÍNA PRODUCIDA UTILIZANDO EL MÉTODO DE LOWRY.</li> </ul>

10ª	<ul style="list-style-type: none"><li>• CON LAS DISTINTAS FRACCIONES OBTENIDAS LLEVAR A CABO ELECTROFORESIS EN UN SISTEMA NO DESNATURALIZANTE PARA OBSERVAR A LAS FRACCIONES OBTENIDAS DE LA PROTEÍNA EN ESTUDIO.</li></ul>
11ª	<ul style="list-style-type: none"><li>• ANALIZAR RESULTADOS Y REALIZAR REPORTE</li></ul>

54



Casa abierta al tiempo

# UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

Posgrado en Biotecnología

Febrero 25, 1999.

[REDACTED]  
**P R E S E N T E .**

Por este conducto, la Comisión del Posgrado en Biotecnología a través del Dpto. en Biotecnología, [REDACTED]

[REDACTED]  
realizado por el alumno Octavio Dublán García en el trimestre 98-O de la Maestría en Biotecnología, como parte del laboratorio de Bioquímica Avanzada.

Le reitero el reconocimiento y esperamos seguir contando con su valiosa colaboración.

**A T E N T A M E N T E .**  
**"CASA ABIERTA AL TIEMPO"**

**DR. JAVIER BARRIOS GONZALEZ**

**UNIDAD IZTAPALAPA**

Av. Michoacán y La Purísima, Col. Vicentina, México, D.F. 09340, Tels: (5) 723-63-51 (5) 724-49-99, Fax: (5) 724-47-12,  
e-mail: psgbt@xanum.uam.mx internet: <http://v.ww.iztapalapa.uam.mx/iztapala.www/division.cbs/biotecnolo/inicio.htm>