

## Artículos originales cortos

### Diferentes técnicas de purificación de la inulinasa extracelular de un mutante de *Kluyveromyces marxianus*

D. CAMPOS, R. RIKIR y P. THONART

C.W.B.I., Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux, Passage des déportés, 2, 5030 Gembloux - Belgica

Recibido en agosto de 1991

Aprobado en abril de 1992

#### RESUMEN

Se emplearon diversas técnicas en la purificación de la inulinasa de *Kluyveromyces marxianus* ATCC (12424). La filtración en gel no fue suficiente para purificar la enzima, la cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrofóbica e isoelectrofocalización dieron buenos resultados. Altos rendimientos fueron obtenidos con el intercambio iónico y la cromatografía de interacción hidrofóbica (superior a 90%), mientras que con la isoelectrofocalización solamente 60% de la actividad fue recuperada.

#### SUMMARY

Several purification techniques have been used in order to purify the inulinase of *Kluyveromyces marxianus* (ATCC 12424). The gel filtration was not sufficient to purify the enzyme but ion exchange chromatography, hydrophobic interaction chromatography and isoelectric focussing led to good results. High yields of purification (>90%) have been reached with ion exchange and hydrophobic interaction chromatography, while only 60% of the activity have been recovered with isoelectric focussing.

#### INTRODUCCION

La inulinasa de *Kluyveromyces marxianus* es de gran importancia industrial en la elaboración de fructosa a partir de

productos vegetales que contienen inulina (Thonart y Artois, 1985). Esta enzima hidroliza principalmente la inulina; pero su actividad se extiende a otros carbohidratos como la sacarosa y rafinosa. La relación S/I (actividad sobre la sacarosa/actividad sobre la inulina) igual a 25, permite diferenciarla de la invertasa, S/I igual a 14 000 (Snyder y Phaff, 1960).

Anteriormente hemos publicado los resultados de nuestros estudios sobre la producción de fructosa por medio de células permeabilizadas e inmovilizadas de *Kluyveromyces marxianus* (ATCC 12424) y de su mutante hiperproductor (KF28) (Thonart y Artois, 1985; Thonart *et al.*, 1988). KF28 produce entre tres y cuatro veces más inulinasa que la levadura nativa; este incremento en la producción de enzima depende de la fuente de carbono y de ciertas condiciones de cultivo como la aereación (Rikir, 1991).

Se han publicado diversos trabajos sobre la purificación de la inulinasa de *Kluyveromyces marxianus*. Snyder y Phaff (1960), emplearon la cromatografía de intercambio iónico; Workman y Day (1983)

utilizaron diversas técnicas en la purificación de la enzima intracelular; Rouwenhorst *et al.* (1990) encontraron que la cromatografía de intercambio iónico fue suficiente para purificar la enzima intracelular, pero una etapa adicional de filtración en gel fue necesaria para la purificación de la enzima extracelular. Nosotros empleamos diversas técnicas: filtración en gel, intercambio iónico, interacción hidrofóbica e isoelectrofocalización, en la purificación de la inulinasa de KF28. La pureza obtenida se analizó mediante electroforesis (SDS-PAGE).

## MATERIALES Y METODOS

### Microorganismo

*Kluyveromyces marxianus* mutante (KF28), descrito por Thonart *et al.* (1988).

### Producción de la enzima

El precultivo fue preparado en erlenmeyers de 250 mL, que contenía 50 mL de medio compuesto de: 1% de extracto de levadura, 1% de peptona y 2% de glucosa; la incubación se realizó durante 16 horas a 30°C en un incubador orbital a 100 rpm. Este precultivo se empleó para inocular erlenmeyers de dos litros conteniendo 800 mL de medio compuesto de: 1% de peptona y 2% de sacarosa. La fermentación se realizó a 30°C y 100 rpm; después de 72 horas de incubación las células fueron separadas por centrifugación (10 000 g x 15 min) y el sobrenadante empleado en las diferentes etapas de purificación.

Todos los componentes utilizados en la preparación de los medios de cultivo fueron de calidad técnica.

### Purificación

#### *Adsorción en polipectato de calcio y filtración en gel*

El polipectato de calcio se obtuvo a partir de pectina Fluka (63-66% de esterificación) de acuerdo al método descrito por Rexová-Benková y Tibensky (1972). El gel se obtuvo como lo describen Hatanaka y Ozawa (1964).

La adsorción y desorción de la enzima en el gel de polipectato de calcio se estudió en función del pH. Tubos de ensayo con 1 mL de gel, fueron equilibrados con tampón acetato de sodio 0,1 M a diferentes pH (entre 3,0 y 6,0 con incrementos de 0,5 unidades); luego se adicionaron 10 mL de líquido conteniendo la enzima (pH igual al del gel, regulado con ácido acético 0,1 M); después de 15 minutos de adsorción bajo agitación constante y a temperatura ambiente, el líquido fue separado del gel por centrifugación y las proteínas no adsorbidas fueron separadas por lavado con el tampón utilizado para equilibrar el gel. La actividad enzimática no adsorbida se determinó en los sobrenadantes obtenidos y la actividad adsorbida se estimó por diferencia entre la actividad empleada en la adsorción y la actividad no adsorbida.

Una vez determinado el pH óptimo de adsorción, la elución fue hecha incrementando el pH del gel con tampón acetato de sodio 0,1 M. Distintos tubos conteniendo gel y enzima fueron tratados cada uno a diferente pH; después de 15 minutos los tubos se sometieron a centrifugación y la actividad fue determinada en el sobrenadante.

La solución enzimática concentrada, obtenida en la etapa anterior, fue sometida a cromatografía de filtración en gel Sephadex G100 (Pharmacia). Una columna (1,5 x 30 cm) se equilibró con tres volúmenes de tampón acetato de sodio 50 mM, pH 5,0 y 3 mL de solución enzimática fueron aplicados; la elución se hizo con el mismo tampón a un flujo constante de 25 mL/h y una temperatura de 20°C.

Se determinó la actividad enzimática (sobre inulina y sacarosa) y la concentración de proteína en cada una de las fracciones (5 mL). La pureza se evaluó en un gel de poli(acrilamida) (SDS-PAGE).

#### *Cromatografía de intercambio iónico*

Se utilizó la cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC) con una columna monoQ, HR 5/5 (Pharmacia). La solución enzimática (líquido de cultivo) se concentró por ultrafiltración, utilizando unidades Millipore (PTGC inmersible CX<sup>TM</sup> PMNL, 10 000) y se dializó contra 100 volúmenes de tampón Tris-HCl 20 mM, pH 7,5 (tampón A), durante 24 horas a 4°C.

Se inyectaron 250 µL de esta solución y la elución de proteínas fue hecha con un gradiente de NaCl, formado por tampón A y tampón B (tampón A + NaCl, 1 M). El flujo fue constante durante la operación (1 mL/min) y la detección de proteínas se realizó midiendo la absorbancia del eluato a 280 nm.

La actividad enzimática (sobre la inulina y sobre la sacarosa) se determinó en cada fracción (0,5 mL) y las fracciones con actividad enzimática se mezclaron. La mezcla fue analizada por su contenido en proteína y por electroforesis, en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y en condiciones no desnaturalizantes (PAGE).

### ***Cromatografía de interacción hidrofóbica***

La cromatografía FPLC, columna Phenyl Superosa HR 5/5 (Pharmacia) fue utilizada. La solución concentrada por ultrafiltración se dializó contra 100 volúmenes de tampón fosfato 50 mM, pH 6,5 (tampón C) durante 24 horas a 4°C y se le adicionó  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  en cantidad suficiente para obtener una concentración 1,7 M.

Inmediatamente después 200  $\mu\text{L}$  de la solución fueron inyectados y la elución hecha con un gradiente de sulfato de amonio formado por dos tampones: tampón C y tampón D (tampón C +  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,7 M), el flujo fue constante (0,5 mL/min) y la detección de proteínas se realizó a 280 nm.

Las fracciones obtenidas (0,5 mL) fueron analizadas como en el intercambio iónico.

### ***Isoelectrofocalización preparativa***

La isoelectrofocalización se realizó empleando el Rotofor (Bio-Rad) que permite un trabajo a escala preparativa y en medio líquido. La solución enzimática concentrada por ultrafiltración (50 mL) se mezcló con 2 mL de amfolitas (Bio-Lyte, pH 3 a 10, 40% w/v); la mezcla fue aplicada al Rotofor sin tratamiento posterior.

Durante la operación la potencia (12 W) se mantuvo constante, el voltaje aumentó de 250 a 1200 V, según las características de la muestra (ver resultados) y la temperatura fue de 4°C. Las fracciones se recolectaron 30 minutos después de haber alcanzado el voltaje máximo y se determinó el pH de cada una de ellas.

A cada una de las fracciones se le adicionó un volumen suficiente de solución concentrada de NaCl para obtener una concentración de sal 0,5 M y posteriormente se dializaron contra 100 volúmenes de tampón acetato de sodio 50 mM, pH 5,0 durante 24 horas a 4°C. La presencia de sal facilita la separación de amfolitas que podrían estar unidas a las proteínas.

Las fracciones fueron analizadas como en el intercambio iónico.

### **Determinación de proteína y actividad enzimática**

En FPLC la detección de proteínas fue hecha midiendo la absorbancia a 280 nm. En los otros casos se empleó el reactivo Bio-Rad; este análisis es basado en el método de Bradford (1976); una solución de albúmina de suero de bovinos (Sigma) sirvió como estándar.

La actividad enzimática se determinó sobre dos sustratos: inulina (Sigma) y sacarosa (Merck); 100  $\mu\text{L}$  de solución enzimática y 400  $\mu\text{L}$  de sustrato (inulina o sacarosa al 5% en tampón acetato de sodio 50 mM, pH 5,0) fueron incubados 15 minutos a 37°C. La reacción fue detenida por inactivación térmica (5 min a 100°C) y los azúcares reductores determinados por el método de Miller (1959); una solución de fructosa (Merck) se utilizó como estándar.

Una unidad de actividad enzimática (U) fue definida como la cantidad de enzima que produce un micromol de azúcares reductores por minuto.

### **Electroforesis**

La electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) se empleó para evaluar la pureza de la enzima obtenida con las diferentes técnicas de purificación. Se empleó el método de Laemmli (1970) con 10% de poliacrilamida en el gel de separación, la coloración se realizó con azul de Coomassie R250 (Merck).

La electroforesis en condiciones no desnaturalizantes (PAGE) nos permitió visualizar la actividad inulinasa en el gel (método de Beck y Praznik, 1986); la separación se realizó en un gel con 7,5% de poliacrilamida y 6% de inulina.

## **RESULTADOS**

### **Adsorción en polipectato de calcio y filtración en gel**

La adsorción y elución en el gel polipectato de calcio se estudió en función del pH (figura 1). A valores de pH de 3,0 a 3,5, aproximadamente 90% de la actividad enzimática fue adsorbida en el gel. Considerando que a pH 3,5 obtuvimos

el máximo de adsorción, la separación de la enzima adsorbida se obtuvo fácilmente aumentando el pH del gel, así resultó que a pH 6,0, 95% de la actividad enzimática adsorbida fue recuperada.

De esta primera etapa resultó una solución enzimática concentrada y prepurificada, el volumen de la solución final fue reducido a un décimo del inicial y la actividad específica aumentó tres veces.

La solución enzimática obtenida fue sometida a cromatografía de filtración en gel Sephadex G-100 (figura 2.A). La proteína fue separada en dos picos y la actividad enzimática (sobre inulina y sobre sacarosa) se encontró en las fracciones

correspondientes al primer pico de proteínas (figura 2.B). La actividad específica sobre la sacarosa aumentó de 670 U/mg a 3690 U/mg y el rendimiento fue de 70%.

El análisis en gel de poliacrilamida, SDS-PAGE (figura 2.C), muestra la presencia de por lo menos dos bandas proteicas de pesos moleculares muy cercanos después de la filtración en gel. La proteína de mayor peso molecular, banda ampliamente más importante, corresponde a inulinasa, lo cual se confirma por los resultados obtenidos en las otras técnicas de purificación.

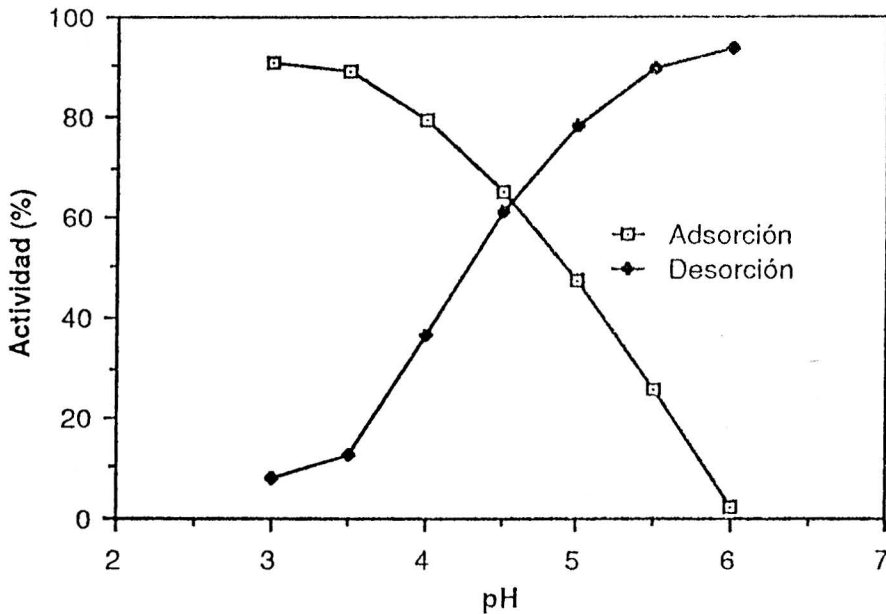


FIG. 1. Influencia del pH en la adsorción y desorción de la inulinasa en un gel de polipeptato de calcio. La actividad enzimática fue determinada sobre sacarosa (ver detalles en texto).

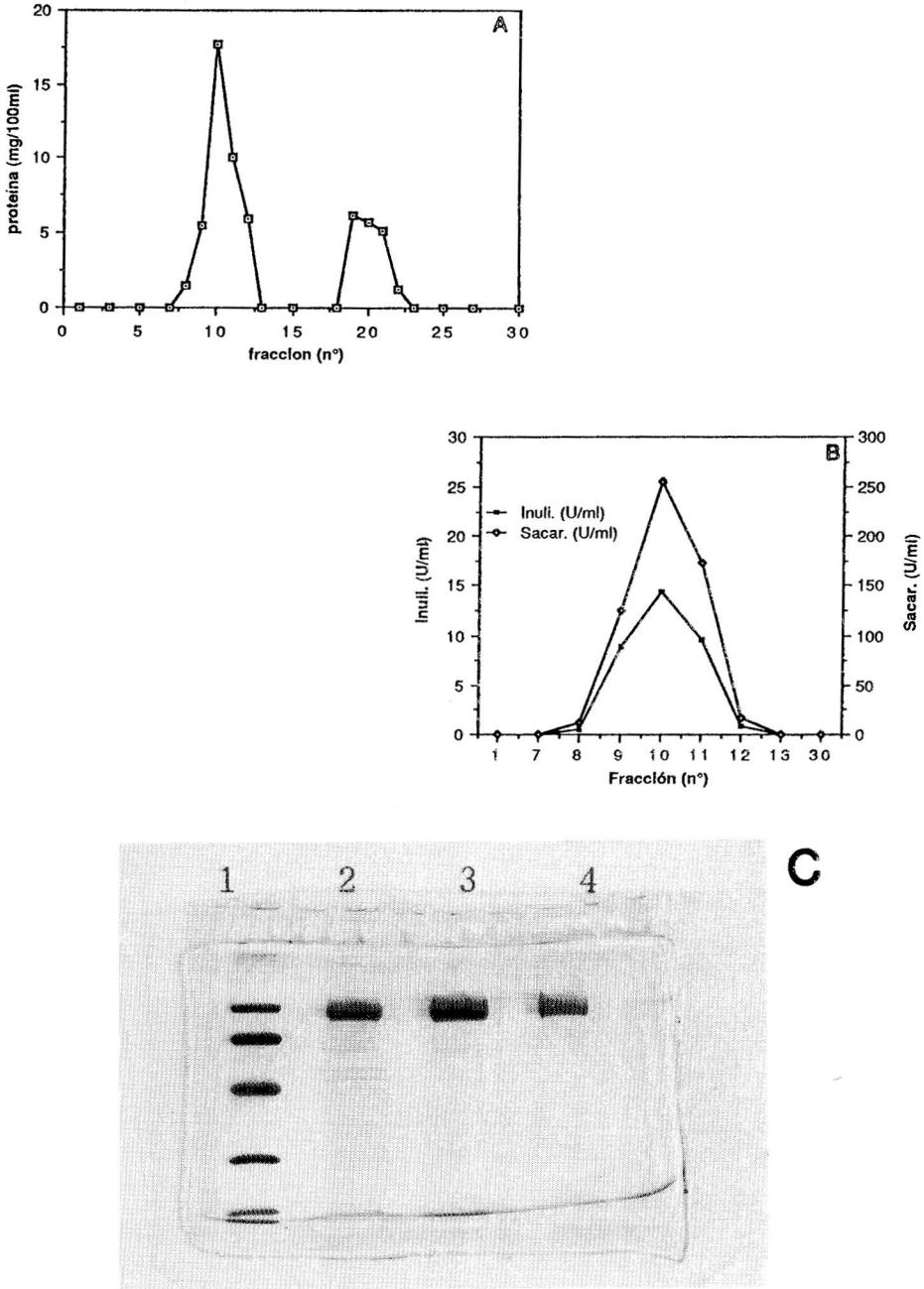


FIG. 2. Cromatografía de filtración en gel. A. Perfil de elución de proteínas. B. Actividad enzimática sobre inulina y sobre sacarosa. C. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Línea 1, proteínas patrones de peso molecular: fosforilasa B (94 kDa), albúmina (67 kDa), ovoalbúmina (43 kDa), anhidrasa carbónica (30 kDa), inhibidor de tripsina (20,1 kDa),  $\beta$ -lactoalbúmina (14,4 kDa); línea 2, sobrenadante bruto; línea 3, después de adsorción en polipectato de calcio y línea 4, después de filtración en gel.

## Cromatografía de intercambio iónico

Los resultados de la cromatografía realizada en la columna mono Q se muestran en la figura 3.A; los diferentes picos de proteínas fueron separados y la actividad enzimática (sobre inulina y sobre sacarosa)

se encontró en las fracciones correspondientes al cuarto pico de proteínas (figura 3.B); el aumento de la actividad específica fue de 670 U/mg a 5025 U/mg y el rendimiento de 79,8%.

El análisis SDS-PAGE de las fracciones conteniendo la enzima dio como resultado una banda única de proteínas (figura 3.C).

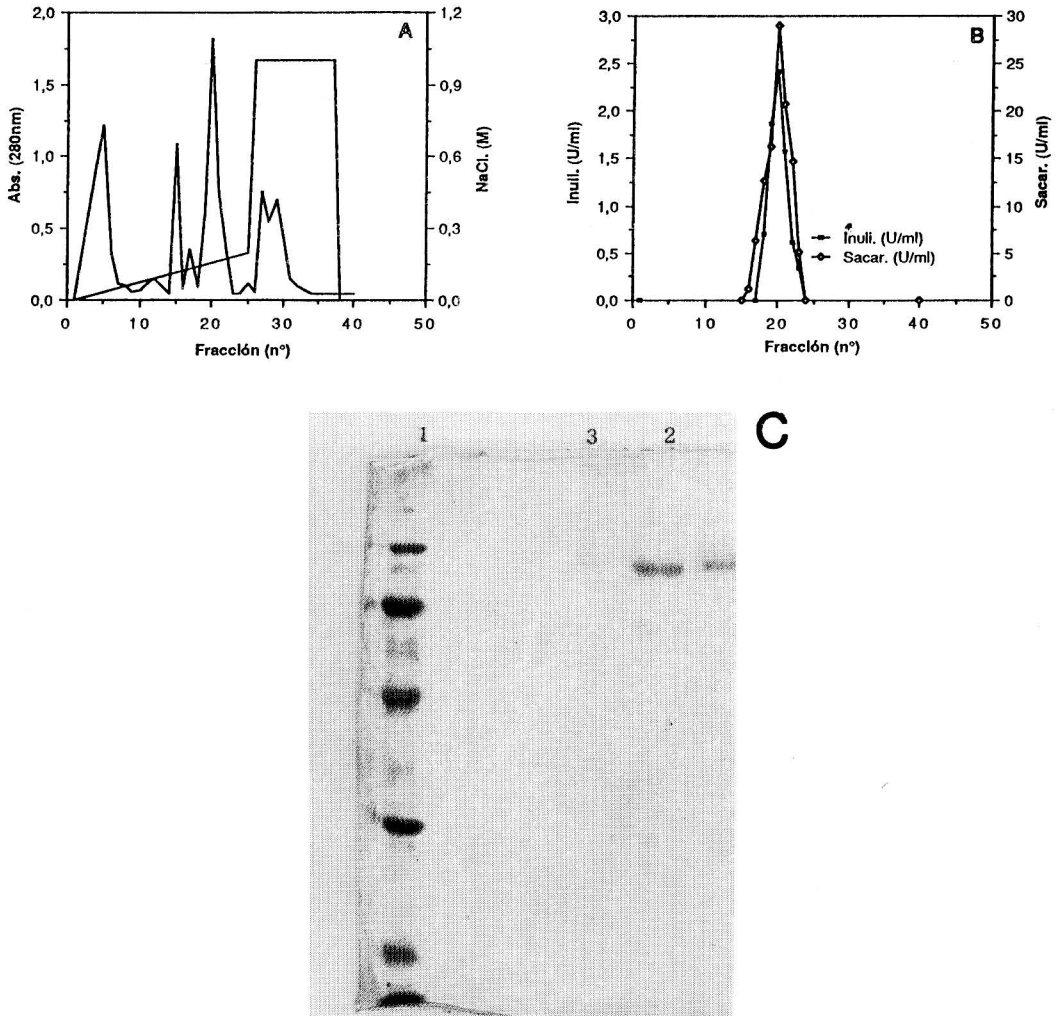


FIG. 3. Cromatografía de intercambio iónico (FPLC, mono Q). *A*. Perfil de elución de proteínas en gradiente de NaCl: de 0 a 0,2 M en 12,5 min; de 0,2 a 1 M en 1 min; 1 M durante 6 min; de 1 a 0 M en 1 min. Dos fracciones por min. *B*. Actividad enzimática sobre inulina y sobre sacarosa. *C*. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE): Línea 1, proteínas patrones de peso molecular (igual a fig. 2.C); líneas 2 y 3 proteína purificada (20 y 10 µg respectivamente).

## Cromatografía de interacción hidrofóbica

Los resultados de purificación en la columna Phenyl Superosa (FPLC) se muestran en la figura 4.A; los diferentes picos de proteínas fueron separados. La determinación de actividad enzimática directamente en las fracciones obtenidas a alta concentración de sulfato de amonio no fue posible probablemente a causa de interferencia entre esta sal y el método empleado en la determinación de azúcares reductores; por esta razón la separación de sales de las fracciones fue necesaria; para esto se utilizó el sistema Baker-10, SK<sup>TM</sup> (columna Sephadex G-25).

Las fracciones con actividad enzimática (sobre inulina y sobre sacarosa) corresponden al primer pico de proteínas (figura 4.B), estas fracciones no fueron adsorbidas en la columna. Aun a altas concentraciones de sulfato de amonio (saturación), la inulinasa no fue adsorbida en la columna lo que da una idea del carácter hidrofílico de esta proteína. La actividad específica obtenida fue de 5290 U/mg (sacarosa) y el rendimiento global en la operación fue superior a 90%.

El análisis en el gel de poliacrilamida de las fracciones con actividad inulinasa (figura 4.C) demuestra la presencia de una banda única similar a aquella obtenida después del intercambio iónico.

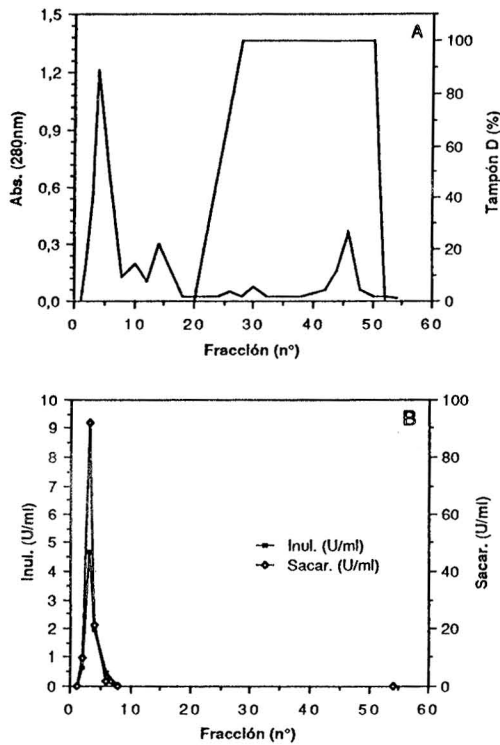


FIG. 4. Cromatografía de interacción hidrofóbica (FPLC, phenyl superosa). A. Perfil de elución de proteínas en gradiente de sulfato de amonio: De 100 a 0% de tampón D en 5 min; 0% de tampón D durante 25 min y de 0 a 100% de tampón D en 1 min. B. Actividad enzimática sobre inulina y sobre sacarosa.

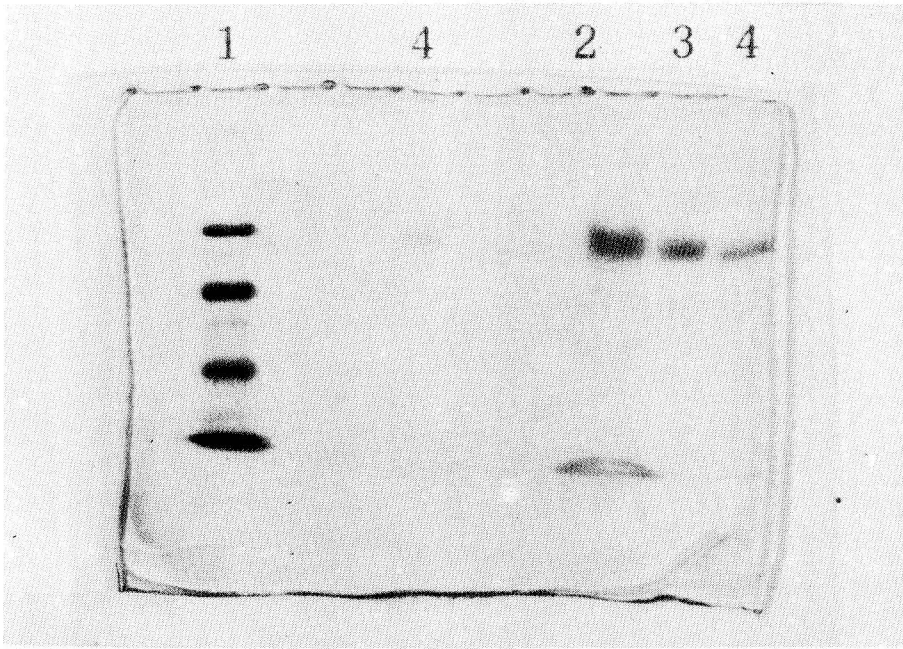


FIG. 4. C. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE): Línea 1, proteínas patrones de peso molecular (igual a fig. 2.C); línea 2, sobrenadante bruto y líneas 3 y 4 proteína purificada (20 y 5  $\mu\text{g}$  respectivamente).

### Isoelectrofocalización preparativa

La isoelectrofocalización del líquido de cultivo ultrafiltrado fue realizado a una potencia constante de 12 W con las condiciones eléctricas siguientes: iniciales 100 V y 39 mA y finales de 400 a 450 V y 30 mA, las que se alcanzaron después de 3 a 3,5 horas de operación. Al cabo de esta primera operación la actividad enzimática se encontró en 12 fracciones (5 a 16) y el pH correspondiente a estas fracciones se encontró entre 3,0 y 8,0 (resultados no mostrados); esta amplia zona de pH en la cual se encuentra distribuida la actividad enzimática es causada por el bajo voltaje obtenido durante la operación, a causa de la alta concentración en sales de la muestra

tratada; en este caso una nueva focalización de las fracciones que contienen la enzima es recomendada.

Las fracciones conteniendo la enzima fueron mezcladas y se les adicionó agua destilada en cantidad suficiente para obtener un volumen de 50 mL. La muestra fue sometida a una nueva focalización; en efecto al inicio de la operación el voltaje se situó alrededor de 650 V y aumentó progresivamente hasta un valor de 950 a 1000 V, después de tres horas de operación. Las fracciones fueron recolectadas 30 minutos después de haber alcanzado el voltaje máximo.

La figura 5 muestra los resultados obtenidos en la segunda operación de focalización; diferentes picos de proteínas fueron separados (figura 5.A). La actividad enzimática (figura 5.B) se separó en dos picos; un primer pico donde las fracciones



son focalizadas entre pH 4,0 a 4,8 y un segundo pico, de menor actividad, cuyas fracciones se sitúan en un rango de pH de 5,3 a 5,8.

El análisis en gel de poliacrilamida (figura 5.C) muestra resultados similares a los obtenidos con las otras técnicas de purificación estudiadas.

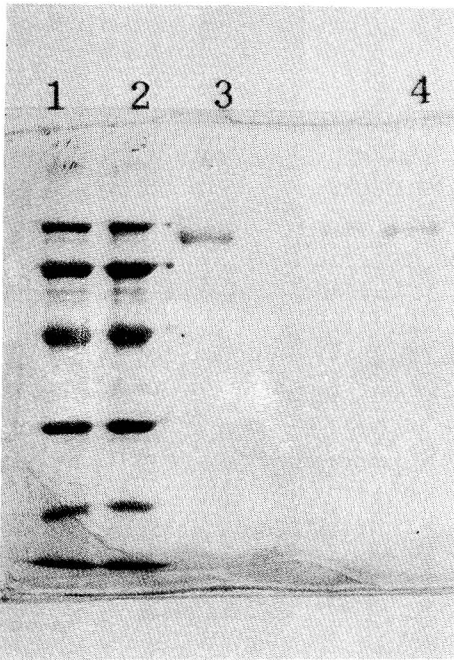
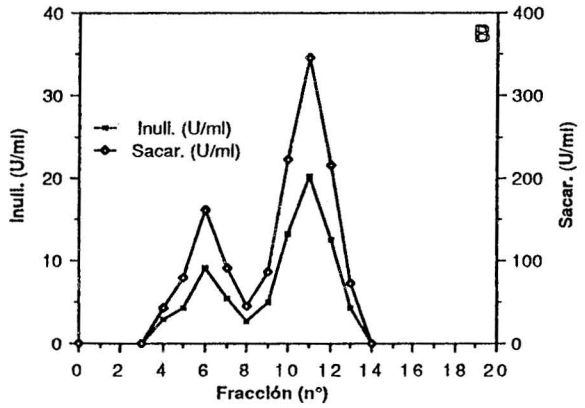
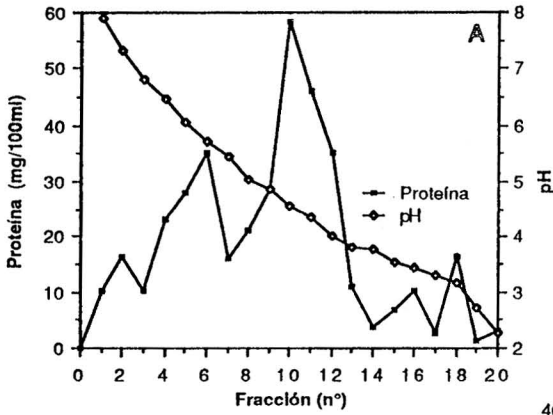


FIG. 5. Isoelectrofocalización. A. Perfil de elución de proteínas y pH de las fracciones. B. Actividad enzimática sobre inulina y sobre sacarosa. C. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE): Líneas 1 y 2 proteínas patrones de peso molecular (igual a fig. 2.C); línea 3, proteína purificada (segundo pico) y línea 4, proteína purificada (primer pico).

## Detección de la actividad inulinasa en gel de poliacrilamida (PAGE)

La electroforesis en condiciones no desnaturizantes en gel de poliacrilamida conteniendo inulina permite visualizar las zonas de actividad inulinasa en forma de bandas transparentes (Beck y Praznick, 1986). La proteína purificada por cromatografía de intercambio iónico e interacción hidrofóbica fue analizada en gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes; la figura 6 muestra los resultados obtenidos, la actividad inulinasa es detectada a nivel de la banda única encontrada en SDS-PAGE.

## DISCUSION

Las principales técnicas utilizadas en la purificación de la inulinasa de *Kluyveromyces marxianus* son la cromatografía de intercambio iónico (Snyder y Phaff, 1960), cromatografía de afinidad e intercambio iónico (Workman y Day, 1983). En este trabajo utilizamos diversas técnicas: filtración en gel, intercambio iónico, interacción hidrofóbica e isoelectrofocalización en la purificación de la inulinasa extracelular de KF28.

La primera técnica estudiada consistió en la concentración de la enzima en un gel de polipectato de calcio seguida de filtración en gel. El uso de geles de ácido

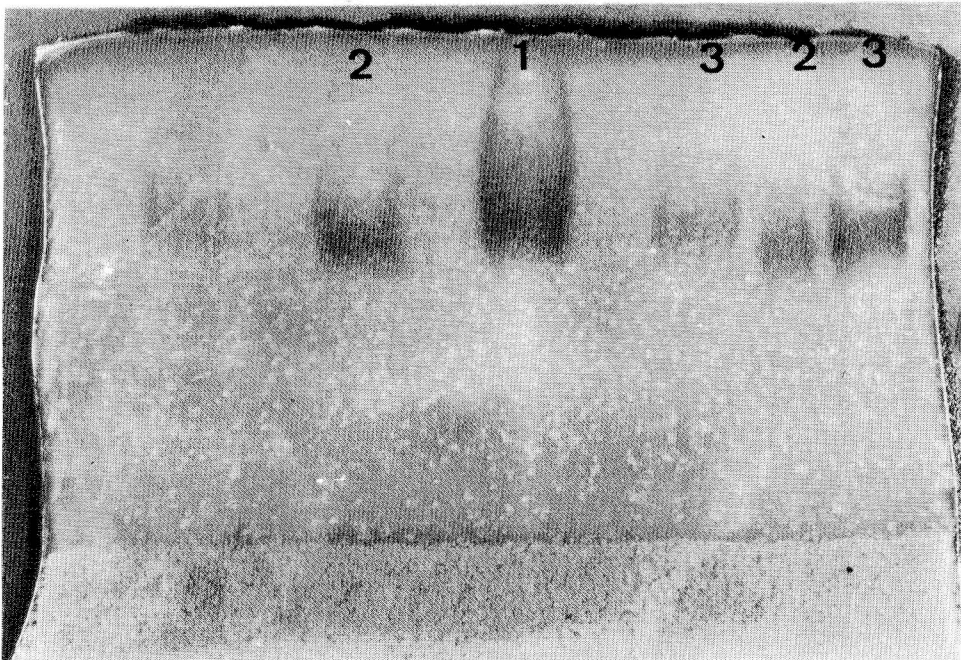


FIG. 6. Detección de la actividad inulinasa en gel poliacrilamida (PAGE). Línea 1, sobrenadante bruto, y líneas 2 y 3, inulinasa purificada por intercambio iónico e interacción hidrofóbica respectivamente.

péctico y polipeptato de calcio ha sido reportado por Phaff y Demain (1956), Patel y Phaff (1960), Hatanaka y Ozawa (1964) en la concentración y purificación de poligalacturonasas; nuestros resultados muestran que este tipo de gel puede emplearse en la concentración y purificación de enzimas diferentes a las poligalacturonasas.

La inulinasa de KF28 fue adsorbida en el gel de polipeptato de calcio a pH 3,5 y fácilmente separada del gel a pH 6,0; resultados similares fueron reportados por Phaff y Demain (1956) para la poligalacturonasa de *Kluyveromyces fragilis* (adsorción a pH 3,0 y separación a pH 5,0).

La purificación de pectinasas en geles de ácido péctico se debe a la afinidad entre la enzima y su sustrato insoluble [Rexová-Benková y Tibensky (1972), Inoue *et al.* (1984) y Rombouts *et al.* (1979)]; sin embargo, el ácido péctico contiene grupos ionizables y el intercambio iónico desempeña un rol importante en el proceso de separación (Rexová-Benková *et al.*, 1977). La adsorción de la inulinasa, a pH 3,5 podría deberse a intercambio catiónico, puesto que a este pH la enzima se encuentra cargada positivamente, según los resultados obtenidos en la isoelectrofocalización. El empleo de geles de ácido péctico es una alternativa interesante en la concentración y purificación parcial de la inulinasa de KF28.

La enzima concentrada y parcialmente purificada fue aplicada a una columna de filtración en gel. Esta técnica no resultó eficaz en la purificación de la enzima, el análisis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) muestra la presencia de por lo menos una banda contaminante. La actividad específica obtenida (3690 U/mg) representa 70 a 75% de la encontrada con las otras técnicas de purificación.

La cromatografía de intercambio iónico fue utilizada en la purificación de la inulinasa intracelular (periplásmica) por Workman y Day (1983), y por Rouwenhorst *et al.* (1990); mediante columnas de DEAE celulosa y DEAE Sephadex A-50 respectivamente. Nosotros utilizamos esta técnica empleando la cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC) que se caracteriza por su rapidez, resolución y rendimiento; en efecto, se optimizó un proceso de purificación rápido (20 min), el rendimiento obtenido fue alto (80%) y la actividad específica (5025 U/mg) mayor que la encontrada después de la filtración en gel. El análisis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) revela sólo una banda de proteína, lo que demuestra que esta técnica resultó eficaz en la purificación de la inulinasa.

Rouwenhorst *et al.* (1990) indicaron que la purificación en una columna de DEAE Sephadex A-50 resultó eficaz en la purificación de la inulinasa intracelular (periplásmica), pero ineficaz en la purificación de la enzima extracelular; en este caso fue necesaria una etapa posterior de cromatografía de filtración en gel. En nuestro caso una etapa de purificación fue suficiente; esto podría explicarse por una mayor resolución obtenida empleando FPLC, o por diferencias a causa de la especie de levadura utilizada.

La cromatografía de interacción hidrofóbica es frecuentemente utilizada en la purificación de proteínas después de una precipitación con sulfato de amonio. La purificación de enzimas empleando esta técnica ha sido reportada por Keller *et al.* (1982), Sessa y Anderson (1981); en ambos casos fue necesario el uso de otras técnicas de purificación. Se empleó esta técnica como etapa única en la purificación de la inulinasa.

Se realizaron diversos ensayos a diferentes concentraciones de sulfato de amonio; los resultados reportados son los obtenidos a una concentración 1,7 M, se separaron tres picos de proteínas no adsorbidas en la columna, la actividad inulinasa se encontró en el primer pico de proteínas; concentraciones mayores de sulfato de amonio no afectaron el perfil de elución de las proteínas no adsorbidas.

La adición de sulfato de amonio al líquido de cultivo concentrado por ultrafiltración (pH 5,0 y 4°C), permitió precipitar parte de las proteínas, sin embargo la inulinasa permaneció en solución; Snyder y Phaff (1960) señalan que esta enzima no precipita en solución saturada de sulfato de amonio. La cromatografía de interacción hidrofóbica realizada en el sobrenadante obtenido después de precipitación con sulfato de amonio (resultados no mostrados) permitió, igualmente, separar tres picos de proteínas no adsorbidos en la columna.

Después de la cromatografía de interacción hidrofóbica, el análisis en gel de poliacrilamida dio como resultado una banda de proteína, similar a aquella obtenida con el intercambio iónico. La actividad específica y el rendimiento fueron altos: 5450 U/mg y 90%, respectivamente.

La isoelectrofocalización es una técnica de purificación que permite separar proteínas en función de su punto isoeléctrico (PI); esta técnica se caracteriza por su poder de resolución. La ventaja del empleo del Rotofor en la isoelectrofocalización es que las proteínas son focalizadas en medio líquido, evitando así la elución a partir de una matriz sólida.

La isoelectrofocalización realizada en el sobrenadante concentrado por ultrafiltración no dio buenos resultados a causa de la alta

concentración de sales, por lo que fue necesario una nueva operación de focalización de las fracciones que contiene la enzima; en efecto, gran parte de sales fue eliminada en las fracciones próximas a los electrodos. Una alternativa para evitar la doble operación de isoelectrofocalización es dializar el líquido ultrafiltrado contra agua destilada o una solución salina de fuerza iónica débil; la inulinasa es estable a fuerzas iónicas bajas.

El empleo de esta técnica permitió separar la enzima en dos picos, que podrían corresponder a dos isoenzimas de diferente punto isoeléctrico, los valores aproximados de PI de cada una de ellas serían de 4,5 y 5,3. Al respecto, Laloux (1990), reportó la separación de dos isoenzimas de inulinasa intracelular de *Kluyveromyces marxianus* mediante una columna de intercambio iónico; ambas formas presentan una parte glicosídica y una parte proteica de igual peso molecular. El análisis en gel de poliacrilamida dio resultados similares a los obtenidos con la cromatografía de intercambio iónico y la cromatografía de interacción hidrofóbica, una sola banda de proteína de peso molecular aproximado 92 kDa; un valor de peso molecular similar (87 a 102 kDa) es reportado por Rouwenhorst *et al.* (1990).

El rendimiento de la isoelectrofocalización fue inferior al obtenido en la cromatografía de intercambio iónico y en la cromatografía de interacción hidrofóbica; solamente 60% de la actividad fue recuperada.

La relación S/I en todas las técnicas de purificación varió entre 13 y 17; valores inferiores a 13 fueron obtenidos en las primeras o últimas fracciones de los picos, lo que se debe a la baja concentración

de inulinasa en estas fracciones (Rouwenhorst *et al.*, 1990). La relación S/I aproximadamente constante durante la purificación permite afirmar que ambas, actividad inulinasa e invertasa, son propiedades de la misma enzima (Snyder y Phaff, 1960).

Diferentes técnicas pueden ser utilizadas en la purificación de la inulinasa extracelular de *Kluyveromyces marxianus* mutante (KF28); particularmente, la cromatografía de intercambio iónico y la cromatografía de interacción hidrofóbica resultaron interesantes por los altos rendimientos obtenidos.

## REFERENCIAS

- BECK, R.H.F. y W. PRAZNIK (1986). Determination of inulinase isoenzymes on polyacrylamide gels by activity staining. *J. Chromatogr.* **369**: 240-243.
- BRADFORD, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- HATANAKA, C. y J. OZAWA (1964). "Enzymic degradation of pectic acid". *Part I. Limited hydrolysis of pectic acids by carrot exopolysaccharuronase*. *Agric. Biol. Chem.* **28**(9): 627-632.
- INOUE, S.; NAGAMATSU, Y. y Ch. HATANAKA (1984). Preparation of cross-linked pectate and its application to the purification of endopolysaccharuronase of *Kluyveromyces fragilis*. *Agric. Biol. Chem.* **48**(3): 633-640.
- KELLER, S.E.; JEN, J.J. y J.R. BRUNNER (1982). Purification of commercial pectinase by hydrophobic chromatography. *J. Food Sci.* **47**: 2076-2079.
- LALOIX, O. (1990). Comunicación personal.
- LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature (Lond.)* **227**: 680-685.
- MILLER, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
- PATEL, D.S. y H.J. PHAFF (1959). Studies on the purification of tomato polygalacturonase. *Food Res.* **25**: 37-46.
- PHAFF, H.J. y A.L. DEMAIN (1956). The unienzymatic nature of yeast polygalacturonase. *J. Biol. Chem.* **218**: 875-884.
- REXOVÁ-BENKOVÁ, L. y V. TIBENSKY (1972). Selective purification of *Aspergillus niger* endopolysaccharuronase by affinity chromatography on cross-linked pectic acid. *Biochim. Biophys. Acta.* **268**: 187-193.
- REXOVÁ-BENKOVÁ, L.; O. MARKOVIC y M.J. FOGLIETTI (1977). Separation of pectic enzymes from tomatoes by affinity chromatography on cross-linked pectic acid. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **42**: 1736-1741.
- RIKIR, R. (1991). *Contribution à l'étude de l'excrétion de l'invertase et du métabolisme respiratoire chez différentes levures, en particulier Kluyveromyces marxianus*. Tesis, Doctorado; Faculté des Sciences Agronomiques-Unité de Bioindustries; Gembloux-Belgique.
- ROMBOUTS, F.M.; A.K. WISENBURG y W. PILNIK (1979). Chromatographic separation of orange pectinesterase isoenzymes on pectates with different degrees of cross-linking. *J. Chromatogr.* **168**: 151-161.
- ROUWENHORST, R.J.; M. HENSING; J. VERBAKEL; W.A. SCHEFFERS y J.P. VAN DIJKEN (1990). Structure and properties of the extracellular inulinase of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 3337-3345.
- SESSA, D.J. y R.L. ANDERSON (1981). Soybean peroxidase: purification and some properties. *J. Agric. Food Chem.* **29**: 960-965.
- SNYDER, H.E. y H.J. PHAFF (1960). Studies on a beta-fructosidase (inulinase) produced by *Saccharomyces fragilis*. *Antonie van Leeuwenhoek. J. Microbiol. Serol.* **26**: 443-452.
- THONART, Ph.; D. ROBLAIN y R. RIKIR (1988). Improvement of inulin hydrolysis yeast cell reactor by mutants selection. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **17**: 193-202.
- THONART, Ph. y C. ARTOIS (1985). Inulin hydrolysis by an immobilized yeast cell reactor. *Biotechnol. Bioeng Symp.* **15**: 409-418.
- WORKMAN, W.E. y D.F. DAY (1983). Purification and properties of the  $\beta$ -fructofuranosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *FEBS Lett.* **160**: 16-20.