



## AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA FRUCTANASA DE *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Verónica Morales Álvarez, Luis Gerardo Treviño Quintanilla, Jesús Hernández Romano y Sandra Morales Arrieta. Universidad Politécnica del Estado de Morelos (UPEMOR), Maestría en Ciencias Biotecnológicas (MCBT), Jiutepec Morelos, código postal 62550, email:17070050@upemor.edu.mx

*Palabras clave:* Fructana, fructanasa, fructooligosacáridos.

**Introducción.** Los fructooligosacáridos son hidratos de carbono con una propiedad edulcorante baja en calorías, que es de 33 % con respecto al de la sacarosa, sin embargo se les atribuyen otras propiedades (1). Actualmente, en estudios de nanotecnología se ha evaluado la influencia que tienen los fructooligosacáridos al adicionarlos a una matriz biopolimérica constituida por alginato/gelatina para producir estructuras con efectos funcionales de administración bioactiva, sustitutos de grasas, películas y recubrimientos comestibles en las industrias alimentarias y farmacéuticas; se caracterizaron microgeles por su distribución de tamaño de partícula y morfología; y macrogeles con respecto a su microestructura y propiedades mecánicas, obteniendo como resultado geles de mayor calidad que los elaborados únicamente de alginato/gelatina; geles más fuertes con poros pequeños que forman perlas de tamaño pequeño, lo que da indicio del uso potencial de estos sistemas como mejoradores de textura y encapsuladores (2). Por lo que, es importante estudiar métodos de producción de fructooligosacáridos. A este respecto, una alternativa es el uso de enzimas fructanasas, las cuales hidrolizan enlaces glicosídicos  $\beta$ -(2-6) o  $\beta$ -(2-1) de fructanas de alto grado de polimerización, generando fructooligosacáridos (polímeros de cadena corta) (3). En el 2017, Romay Ramírez realizó un análisis bioinformático de la secuencia nucleotídica codificante para una fructanasa de la bacteria fitopatogena del jitomate *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* dicha secuencia tiene un tamaño de 1641 pb y codifica para una fructanasa transmembranal con un peso molecular de 58.2 kD y un punto isoeléctrico de 4.67 (4).

El objetivo del presente trabajo fue aislar y caracterizar el gen de la fructanasa de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

### Metodología.

Se realizó un análisis bioinformático de la fructanasa de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, donde se identificaron los residuos catalíticos, péptido señal y la región transmembranal. Posteriormente, para aislar y clonar el gen codificante para la fructanasa de

*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, se diseñó un par de oligonucleótidos con sitios de restricción NcoI y XhoI. Se amplificó el gen de la fructanasa a partir de DNA genómico. El producto de PCR se clonó en el vector pJET1.2/blunt en *E.coli* DH5 $\alpha$ . La construcción molecular se confirmó por PCR y secuenciación. Para la expresión génica, el fragmento se subclonó en el vector de expresión pET22 en *E.coli* DH5 $\alpha$ .

**Resultados.** El análisis bioinformático mostró que la secuencia nucleotídica codificante para la fructanasa es de 546 aminoácidos, que posee un péptido señal, un dominio transmembranal, y un linker; además contiene un dominio con una identidad del 99% con la familia de la glicosil hidrolasa con estructura de 5 hojas  $\beta$ -propela en el extremo N-terminal, información que coincide con lo reportado por Romay Ramírez en el 2017. A su vez, se logró la amplificación y clonación de la secuencia nucleotídica codificante para la fructanasa de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en el vector de clonación pJET1.2/blunt, la cual tiene un tamaño de 1668 pb aproximadamente, resultado que se confirmó mediante PCR y secuenciación. Así mismo, de la subclonación en el vector de expresión pET22 se ha logrado obtener colonias aisladas que se encuentran en proceso de confirmación del inserto para dar inicio con los ensayos de expresión génica.

**Conclusiones.** Se logró clonar por primera vez el gen codificante para la fructanasa de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, la cual podría ser empleada para la producción de fructooligosacáridos.

### Bibliografía.

Frank A (2002). Br. J. Nutr 87: 287–291. Technological functionality of inulin and oligofructose.

Guedes K, et al (2017) Food Res Int.. 88-95. Biopolymer gels containing fructooligosaccharides.

Jiang R, et al (2019) Appl. Biochem. Biotechnol.116-128. One-Step Bioprocess of inulin to product Inulo-Oligosaccharides Using *Bacillus subtilis* Secreting an extracellular Endo-inulinase.

Romay-Ramirez MR. 2017. Caracterización bioinformática de una fructanasa de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Tesis de licenciatura. UPEMOR Jiutepec Morelos.

