



Zymomonas mobilis: Purificación y caracterización de la invertasa INVA inmovilizada a celulosa mediante un dominio de unión a celulosa

M. Ángeles Calixto-Romo, Alejandro Santiago-Hernández, M. Carmen Montes-Horcasitas, M. Eugenia Hidalgo-Lara*

*Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV. Av. IPN No. 2508 San Pedro Zacatenco. CP 07360. México D. F. Fax (55)5061-3313. E-mail: ehidalgo@cinvestav.mx

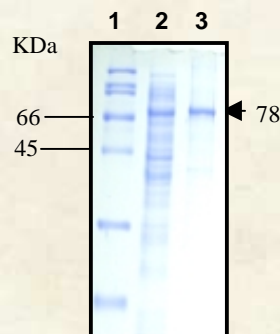
Palabras clave: *Zymomonas mobilis*, invertasa, proteína de fusión, CBD

Introducción. La invertasa es una enzima hidroliza el enlace O-glicosídico de la sacarosa dando lugar a una relación equimolar de glucosa y fructosa (1). A este producto de hidrólisis se le denomina jarabe invertido o jarabe fructosado. Por otro lado, se ha reportado la inmovilización exitosa de enzimas a celulosa mediante un dominio de unión a celulosa (CBD), dominios que se encuentran de manera natural en celulasas y xilanasas de hongos y bacterias. La alta afinidad y especificidad de unión del CBD a celulosa, hace atractiva el empleo de proteínas fusionadas a CBD en diversas aplicaciones biotecnológicas (2). En este trabajo nos propusimos construir una proteína de fusión invertasa-CBD, con la finalidad de utilizar el CBD como vía para la purificación e inmovilización simultánea de la invertasa intracelular INVA de *Zymomonas mobilis* a celulosa.

Metodología. La región codificante (ORF) del gen *invA* de *Z. mobilis* se amplificó por PCR a partir de: 1) ADN genómico del microorganismo, 2) un par de oligonucleótidos diseñados a partir de los extremos 5' y 3' del ORF *invB*, y 3) Taq ADN polimerasa. El fragmento amplificado se clonó direccionalmente en los sitios *BamH* I y *Xho* I del vector de expresión pET38b(+) (Novagene), que contiene secuencias codificantes para el CBD_{Cex} de *Cellulomonas fimi*, dando lugar al plásmido pET38b(+)-*invA*-CBD. Esta construcción se transfirió a *E. coli* BL21(DE3) para la expresión de la proteína de fusión INVA-CBD, en presencia de IPTG 1 mM. La proteína INVA-CBD se inmovilizó a Avicel (celulosa cristalina) y se caracterizó bioquímicamente, tanto en forma libre como inmovilizada, por lo siguiente: 1) Actividad de invertasa, por el método de Miller, 2) PM, por SDS-PAGE, 3) Temperatura y pH óptimos, y 4) Parámetros cinéticos (Km, Vmax y Ki).

Resultados y discusión. La región codificante (aprox. 1.56 kpb) del gen *invA* de *Z. mobilis* se clonó en el vector de expresión pET38b(+), dando lugar a la construcción pET38b(+)-*invA*-CBD. La proteína de fusión INVA-CBD se detectó en la

fracción soluble del extracto crudo de células *E. coli* que portaban el plásmido pET38b(+)-*invA*-CBD. Sin embargo, la mayor parte de la proteína expresada se acumuló formando cuerpos de inclusión. En este trabajo, se utilizó la proteína de la fracción soluble para la purificación e inmovilización simultánea a Avicel. La proteína de fusión INVA-CBD se caracterizó tanto en forma libre como en forma inmovilizada. De acuerdo a lo esperado, la proteína de fusión INVA-CBD presentó un PM de 78 kDa, 58 kDa corresponden a INVA y 20 kDa al CBD, ubicado en el extremo C-terminal de la proteína de fusión.



Electroforesis por SDS-PAGE al 15%. de la purificación e inmovilización de la proteína INVA-CBD a Celulosa Carril 1: Marcadores de PM. Carril 2: Extracto crudo, fracción soluble antes de la interacción con Avicel. Carril 3: INVA-CBD inmovilizada a Avicel.

Conclusiones. Se logró la purificación e inmovilización simultánea de la invertasa INVA-CBD en celulosa. La proteína de fusión INVA-CBD inmovilizada a celulosa fue menos susceptible a la inhibición por sustrato comparada con la INVA-CBD libre, ya que presentó una meseta de actividad máxima en el intervalo de concentraciones de 0.15-0.45 M de sacarosa, La Vmax disminuyó considerablemente después del proceso de inmovilización, y los valores de de pH y T óptimos no se vieron afectados conservándose de 5.5 y 30 °C, respectivamente.

Bibliografía.

1. Brenda. <http://www.brenda.uni-koeln.de>
2. Levy I. Shoseyov O. Cellulose-binding domains Biotechnological applications; Biotechnol Adv 20 (2002) 191-213.
3. Miller, G. L. (1959) Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chem.* Vol. 31:426-428.