

FUSION TRADUCCIONAL DE LA INVERTASA ZMINVB DE *Zymomonas mobilis* A UN DOMINIO DE UNION A CELULOSA

Alejandro Santiago-Hernández, M. de los Angeles Calixto-Romo y M. Eugenia Hidalgo-Lara. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados. Av. Instituto Politécnico Nacional No. 2508. México, D. F. CP 07360 Fax: 57473313. e-mail: ehidalgo@mail.cinvestav.mx

Palabras clave: *Zymomonas mobilis*, invertasa, inmovilización, CBD

Introducción. La invertasa es una enzima hidrolítica que ataca el enlace *o*-glicosídico de la sacarosa. La invertasa (β -fructofuranosidasa EC: 3.2.1.26), también conocida como sacarasa, tiene un amplio uso en la obtención de jarabes fructosados; los cuales a su vez se emplean en la industria de alimentos, postres, refrescos, etc. Las invertasas son producidas por bacterias, levaduras, hongos y plantas. En *Zymomonas mobilis* se han descrito dos invertasas: una intracelular de 59 kDa (ZINVA) y otra extracelular de 58 kDa (ZINVB), cuyos genes ya han sido clonados. Por otra parte, se sabe que la inmovilización de enzimas por lo general aumenta su estabilidad y permite reutilizarlas, lo cual reduce significativamente costos de producción. En este trabajo nos propusimos generar la proteína de fusión invertasa-CBD, para lo cual subclonamos el marco abierto de lectura del gen que codifica para la invertasa (ZINVB) de *Z. mobilis* en fusión traduccional con la secuencia codificante para el dominio de unión a celulosa (CBD) de la exoglucanasa Cex de *Cellulomonas fimi*, para posteriormente purificar e inmovilizarla enzima a celulosa en solo paso.

Metodología. *Z. mobilis* se creció en medio mineral con sacarosa como fuente de carbono. El DNA genómico de *Z. mobilis*, aislado de acuerdo al método descrito por Kang y col. (1996), se utilizó como molde para amplificar el gen *zminvb* por PCR, utilizando iniciadores específicos que contenían sitios de restricción para las enzimas BamHI (iniciador directo) y HindIII (iniciador reverso). El producto de PCR se purificó y se clonó en vector pDrive (Qiagen) y la mezcla de ligación se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* DH5 α . Las células transformadas se seleccionaron en medio LB-Kanamicina/IPTG/X-gal. El DNA plasmídico de cada una de las clonas obtenidas se purificó y se analizó por digestión con las enzimas de restricción HindIII y BamHI (BioLabs). El inserto de 1.2 kb con extremos cohesivos para BamHI y HindIII se purificó y se ligó al vector pET(38+, Invitrogen) previamente digerido con estas dos enzimas. Posteriormente se transformaron células competentes de *E. coli* BL21 (DE3) y los ensayos de expresión de las clonas seleccionadas se realizaron induciendo con 1mM de IPTG a 37 C por 5h.

Resultados y discusión. El gen *zminvb* se amplificó por PCR a partir de DNA genómico de *Z. mobilis*, utilizando iniciadores específicos, los cuales contenían sitios de restricción para las enzimas BamHI (5') y HindIII (3'). De acuerdo a lo esperado, se amplificó un fragmento de 1.2 kb

(Fig. 1A). El fragmento de 1.2 kb se purificó y se clonó en el vector pDrive. Los productos de ligación se utilizaron para transformar *E. coli* DH5 α y las clonas positivas se analizaron por digestión con las enzimas de restricción BamHI y HindIII (Fig. 1B). La liberación del inserto de 1.2 kb confirmó la funcionalidad de ambos sitios (Fig. 2). El inserto de 1.2 kb con extremos cohesivos BamHI y HindIII se purificó y se clonó direccionalmente en el vector pET(38+), previamente digerido con las enzimas BamHI y HindIII. El plásmido generado, denominado pET-ZMINVB, codifica para una proteína de fusión que contiene en el extremo N-terminal la invertasa B de *Z. mobilis* y en el extremo C-terminal el CBD Cex de *C. fimi*. Actualmente, estamos realizando los ensayos de expresión en *E. coli* BL21 (DE3). Una vez expresada, la proteína de fusión ZMINVB-CBD será purificada e inmovilizada simultáneamente por afinidad a celulosa microcristalina.

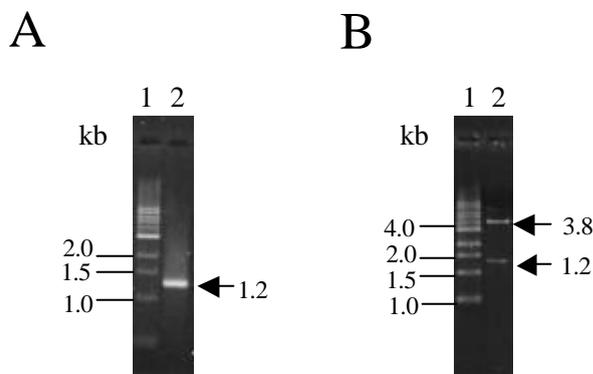


Fig. 1. A. Carril 1, marcadores de tamaño molecular. Carril 2, producto de PCR. B. Carril 1, marcadores de tamaño molecular. Carril 2, liberación del fragmento clonado con las enzimas BamHI y HindIII.

Conclusiones.

La tecnología de PCR nos permitió amplificar el gen *zminvb* que codifica para la invertasa extracelular de *Zymomonas mobilis* y obtener una proteína la fusión INVERTASA-CBD para su purificación e inmovilización simultánea.

Agradecimiento. Este trabajo fue financiado por el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN.

Bibliografía.

Kang, J., Hein, F., Schaffrath, N. Welters, S. (1996) rapid isolation of mycobacterial DNA using QIAamp. QIAGEN News 1996 No. 1, 14.