

Producción de fructooligosacáridos (FOS) por tecnología de enzimas. Parte I: Evaluación de aislados nativos de hongos para la producción de FOS

Julio C. Gómez, Maritza Zúñiga, Edelberto Silva¹ y Sonia A. Ospina^{1,2}

Resumen

En este trabajo se estudió la influencia de la concentración de sacarosa, extracto de levadura y carbonato de calcio en la producción de FOS y la actividad fructosiltransferasa (FTF) en fermentaciones de 24, 36 y 48 horas usando *Aspergillus niger* AN166 como modelo biológico. La actividad FTF más alta de *A. niger* fue obtenida con 20% de sacarosa y 0.2% de extracto de levadura. El carbonato de calcio no tiene un efecto significativo en la producción de FOS. Adicionalmente, el medio de cultivo derivado del trabajo anterior fue usado para el aislamiento de hongos nativos de diferentes regiones de Cundinamarca (Colombia). Los aislados fueron evaluados con relación a la producción de FOS y actividad FTF. Solamente cinco aislados mostraron una mayor producción de FOS y actividad FTF que el *A. niger* AN166.

Palabras clave: Fructooligosacáridos - Fructosiltransferasa - *Aspergillus*

Summary

Production of fructooligosaccharides (FOS) by enzymatic technology. Part I: Evaluation of native isolates obtained from fungi for production of FOS

The influence of sucrose, yeast extract and calcium carbonate concentration on fructooligosaccharides (FOS) and fructosyltransferase (FTF) activity, in fermentations of 24, 36 and 48 hours, by *Aspergillus niger* AN 166 as biological model was studied. The higher FTF activity was gotten with 20% of sucrose and 0.2% of yeast extract. The Calcium carbonate has no effect on FOS production. The culture medium was used to isolate native molds from different regions of Cundinamarca (Colombia). The isolates were evaluated in relation to FOS production and FTF activity. Only five isolates show a higher production of FOS and FTF activity than *A. niger* AN 166.

Key words: Fructooligosaccharides - Fructosyltransferase - *Aspergillus*.

Recibido para evaluación:

junio 3 de 2005

Aceptado para publicación:

julio 29 de 2005

1 Departamento de Farmacia. Universidad Nacional de Colombia. A.A. 14490, Bogotá D.C., Colombia.

2 Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia. A.A. 14490, Bogotá D.C., Colombia.
E-mail: esilvag@unal.edu.co

Introducción

Los FOS son estructuralmente un grupo de oligosacáridos formados por la unión de un monómero de glucosa (G) y dos o más unidades fructosil (F). Esta unión se lleva a cabo por enlaces -1,2 α (glucosa-fructosa) y enlaces α -2,1 (fructosa-fructosa) dando origen a 1-ketosa (GF2), nistosa (GF3) y 1F-fructofuranosil nistosa (GF4) (YUN).

Los FOS pueden ser producidos por varias bacterias, hongos y algunas especies de plantas donde cumplen diferentes funciones. En plantas los fructanos son sintetizados para el almacenamiento de carbohidratos a largo y a corto plazo. En bacterias, los fructanos son producidos como parte de los exopolisacáridos, tienen una alta masa molecular y son casi en todos los casos de tipo levana (1-17). Estos al igual que los hongos son sintetizados por la secreción de enzimas que usan sacarosa como sustrato para realizar la transferencia fructosil aumentando el tamaño de las cadenas, siendo su función la protección de las células a la desecación y la adherencia a las superficies, o en algunos casos de bacterias patógenas los fructanos demoran el reconocimiento del patógeno por el sistema de defensa del huésped (11).

Los FOS son azúcares naturales prebióticos de sabor dulce, con ventajas adicionales como su bajo contenido calórico y no son cariogénicos (3, 13). El consumo de estos carbohidratos tiene las siguientes propiedades fisiológicas: No se incrementa la concentración de glucosa en sangre, no estimula la secreción de insulina, ni influye sobre la secreción del glucagón; incrementa la frecuencia y peso de las deposiciones; disminuye los niveles de triglicéridos en el suero y de colesterol en sangre en pacientes hipercolesterolemicos; estimula la población bifidobacteriana; suprime la población patogénica (*E. coli*, *Clostridium*); mejora la absorción de calcio;

puede tener un papel importante en la preventión e inhibición de cáncer de colon y de mama; y se le atribuyen propiedades inmunoestimulantes (13, 18).

Las fructosiltransferasas (FTF) son las enzimas responsables de la producción de polímeros de fructosa en plantas, hongos y bacterios. Un grupo esta conformado por las FTFs de plantas y el otro por las de microorganismos (19-22). En el caso de las plantas se acepta ampliamente la presencia de dos tipos de enzimas, una sacarosa:sacarosa 1-fructosiltransferasa (1-SST) (EC 2.4.1.99) que cataliza la transferencia de residuo fructosil de una molécula de sacarosa a otra que da lugar a la formación de 1-kestosa (glucosil-1,2-fructosil-1,2-fructosa), y 1,2 β -fructan 1-fructosiltransferasa (FFT) (EC 2.4.1.100) que se encarga de la elongación de la cadena para producir inulina; o también, sucrose-fructan 6-fructosiltransferasa (FFT) (EC 2.4.1.10) produciendo una levana (19-21).

En los bacterios las fructosiltransferasas se caracterizan por ser una enzima capas de producir fructooligosacáridos de hasta un grado de polimerización de 3 a 10 unidades o polímeros de fructosa (inulina y levanas). Estas enzimas se han encontrado en especies de los géneros *Bacillus*, *Gluconoacetobacter*, *Streptococcus*, *Acetobacter*, *Pseudomonas*, *Zymomonas*, *Actinomyces*, entre otras. Las fructosyltransferasas corresponden a levansacarosas, 1,2 β -fructan 1-fructosiltransferasa (FFT) (EC 2.4.1.10) reportadas en *Streptococcus salivarius*, *Gluconoacetobacter diazotrophicus*, *Acetobacter diazotrophicus*, *Actinomyces naeslundi*. En el caso de *Streptococcus*, *Acetobacter* y *Gluconoacetobacter* produce oligómeros y polímeros tipo inulina o fructanos, mientras que *Actinomyces* produce fundamentalmente levanas (1, 2, 11, 14, 16, 17, 22).

De los hongos se han identificado varias cepas capaces de producir fructanos de alto y bajo peso molecular (Tabla 1). Se ha logrado

clonar una fructosiltransferasa de *Aspergillus foetidus* que produce 1-kestosa al igual que de *Aspergillus niger*, *A. sydowi*, *A. japonicus*, *A. oryzae* y *Fusarium oxysporum*. En el caso de *A. sydowi*, la fructosiltransferasa es capaz de producir diferente tipo de fructanos dependiendo de las condiciones experimentales. Los fructanos producidos pueden ser de alto grado de polimerización –DP 40 o más- o de bajo grado –DP 3 a 7- (4, 5, 6, 12, 22).

En el Departamento de Farmacia y el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia se ha iniciado un proyecto encaminado a producir los FOS por tecnología de enzimas y este trabajo orientado hacia la obtención de aislados nativos de hongos productores de FOS. Para desarrollar este trabajo primero se formuló un medio de cultivo que estimulara la producción de FOS con la presencia de una alta actividad FTF en los aislados a evaluar, usando como modelo de trabajo el *A. niger* AN 166. Luego se procedió a evaluar la producción de FOS y la actividad FTF de los aislados obtenidos.

Materiales y métodos

Ajuste del medio de cultivo empleado para la evaluación de los aislados

Con el medio base reportado por La Rotta (1997) (sacarosa 400g/L, NaNO_3 0.72g/L, KH_2PO_4 0.25g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25g/L, KCl 0.25g/L, FeSO_4 0.01g/L; pH final 5.5.), se estudió la influencia de la concentración de sacarosa (10%, 20% y 40% p/v), extracto de levadura (0.2%, 0.5% y 1.0% p/v) y carbonato de calcio (0.05%, 0.1% 0.15% p/v) sobre la producción de FOS y FTF, realizando fermentaciones de 24, 36 y 48 horas, donde se evaluó: biomasa, pH, sustrato residual, producción de FOS y

actividad enzimática. Se empleó como modelo biológico *Aspergillus niger* AN 166. Cada fermentación se llevó a cabo en un matraz de 250 mL con un volumen de 100 mL de medio de fermentación, inoculado con un stock de esporas de *A. niger* AN 166 a una población final de 1×10^6 esporas/mL. Se colocó en un baño termostatado (New Brunswick C76) a 180 r.p.m. de agitación y 30°C.

Aislamiento y evaluación de hongos nativos para la producción de FOS

Recolección de muestras. Las muestras se tomaron de cultivos de caña de azúcar y trapiches artesanales de la región de Cundinamarca en los municipios de Pacho, Villeta, Nocaima, Nimaima, Quebrada Negra, La Peña, El peñón, Topaipí, Yacopí, La Palma, Caparrapí y Guaduas.

Aislamiento. Se empleó el medio diseñado en el proceso de ajuste gelificado con agar - agar. Se realizó el aislamiento sembrando la muestra por el método de extensión en superficie y posteriormente repicando las diferentes colonias formadas en cajas de petri con el mismo medio.

Evaluación de los aislados. El tiempo de fermentación y el medio de cultivo fue escogido de acuerdo a los resultados de mayor respuesta obtenidos en la primera fase del estudio. Al final de cada fermentación se evaluaron los parámetros de biomasa, sustrato residual, producción de FOS y actividad enzimática.

Determinación de la actividad enzimática extracelular. Se realizó la reacción enzimática bajo las siguientes condiciones: En un erlenmeyer con 100mL de una solución al 30% de sacarosa en buffer fosfatos (0.05M, pH5.5) previamente esterilizado a 121 °C por 15min, se agregó la biomasa y se mantuvo la reacción en un baño termostatado (New Brunswick C76) a una temperatura de 55°C con agitación a

200rpm. Se tomó 1mL del sobrenadante como muestra de análisis a los 0, 20, 60 y 180 min para cuantificar sustrato residual y productos por HPLC.

Ánalisis por HPLC. Para la cuantificación de los azúcares sacarosa, glucosa, fructosa y FOS totales se empleó una columna Bio-Rad Ami-nex HPX-87H bajo las siguientes condiciones de operación: fase móvil H_2SO_4 0.004M - H_2O , temperatura de la columna 30 °C, temperatura del detector 45 °C y flujo 0.6mL/min. Para la cuantificación de los FOS formados (kestosa, nistosa, fructofuranosilnistosa) y sacarosa se utilizó la columna Shodex SZ 5532 bajo las siguientes condiciones: fase móvil CH_3CN - H_2O (70:30), temperatura de la columna 50 °C, temperatura del detector 45 °C y flujo 1mL/min.

Resultados y discusión

Efecto de la concentración de sacarosa

La producción de esta enzima es inducida por la concentración de sacarosa en el medio (12). Aunque las condiciones para la producción y expresión de enzimas son diferentes en cada microorganismo, se empleó *Aspergillus niger* AN166 como modelo biológico, pues es definido como un microorganismo productor de FOS (8)

Se realizaron fermentaciones con 3 niveles de sacarosa (10, 20 y 30 %) a 24, 36 y 48 horas y se evaluó la producción de biomasa, el cambio de pH, la producción de FOS y el porcentaje de sacarosa residual. Con la biomasa producida se evaluó la actividad fructosiltransferasa (Tabla 1).

En las fermentaciones de 24 y 36 horas se observó que la cantidad de biomasa producida no está influenciada con la concentración de sacarosa (Tabla 1), sin embargo, los resultados que se observan a las 48 horas de fermentación muestran que se presenta una relación inversa en donde a una menor concentración de sacarosa se obtiene una mayor cantidad de biomasa (Tabla 1).

Con relación al pH se observó que este valor decrece durante el curso de las fermentaciones. No se observa una relación directa entre la concentración de sustrato utilizado y este parámetro. El pH más bajo se presentó con la utilización de un 40% de sacarosa siendo de 3,29 en un tiempo de fermentación de 48 horas (Tabla 1). Los resultados observados nos indican que durante el proceso de crecimiento del microorganismo la formación de ácido glucónico es también llevada a cabo ya que el medio es igualmente apto para su producción.

La mayor producción de FOS se obtuvo a las 48 horas de tiempo de fermentación con la utilización de concentraciones del 20% y 40% de

Tabla 1. Efecto de la concentración de Sacarosa sobre los parámetros de fermentación con *Aspergillus niger* AN 166.

%	Biomasa (g/L)			pH			FOS (g/L)			% Sacarosa residual		
	24 h	36 h	48 h	24 h	36 h	48 h	24 h	36 h	48 h	24 h	36 h	48 h
10	0.21	0.20	1.11	4.68	3.87	3.67	0.50	6.69	4.16	93.10	71.45	22.37
20	0.21	0.45	0.95	4.86	3.81	3.59	0.55	4.61	16.18	86.28	68.85	38.12
40	0.24	0.43	0.98	4.63	4.17	3.29	0.12	4.15	14.86	97.77	81.37	66.00

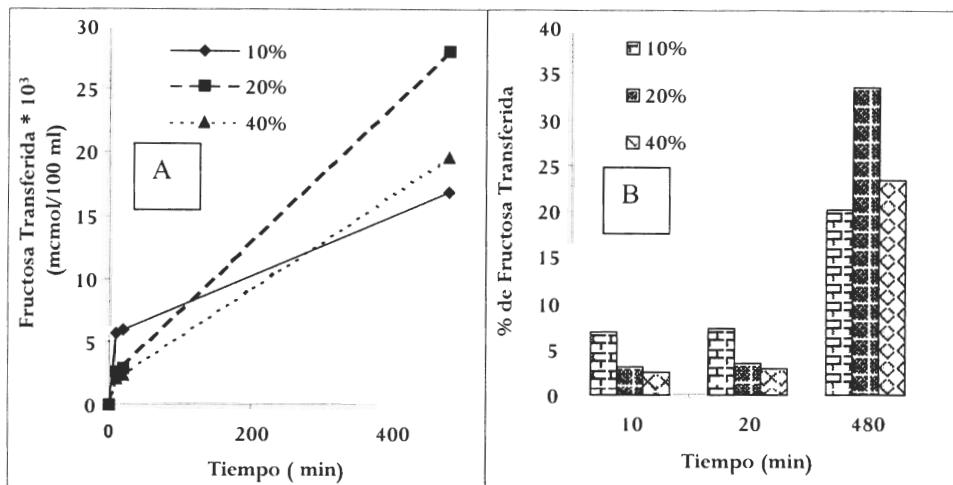


Figura 1. Efecto del porcentaje de sacarosa en (A) actividad fructosil transferasa y (B) el % de Fructosa Transferida.

sustrato. Con el uso del 10 % de sacarosa a las 48 horas de fermentación se presenta la hidrólisis de los productos (Tabla 1). El proceso de producción de FOS fue más eficiente con el empleo de una concentración de sacarosa del 20% alcanzando una cantidad de 16,1g/L distribuidos en kestosa, nistosa y fructofuranosilnistosa.

Con lo anterior podemos decir en primer lugar que a altas concentraciones de sacarosa el *Aspergillus niger* AN 166 disminuye su crecimiento, posiblemente por el efecto de deshidratación que muchos microorganismos pueden sufrir a altas concentraciones de sustrato (15). El crecimiento del microorganismo no tiene influencia sobre la producción de FOS, lo que confirma que la FTF no es una enzima constitutiva, sino inducible por la presencia de sustrato.

Como se puede observar en la Tabla 1 la concentración de sacarosa en el medio también tiene influencia sobre la cantidad de sustrato utilizado, a menor concentración de sacarosa se observa la menor cantidad de sustrato residual. Con una concentración del 10% el sustrato residual fue de 22,37%, indicando que el microorganismo usó la

sacarosa para su crecimiento y mantenimiento energético principalmente, y no para la producción de FOS como sería lo esperado. Al comparar el porcentaje de sustrato residual con la producción de FOS y la biomasa se observa que con el uso de sacarosa al 40% la mayor cantidad de sustrato fue utilizada para la producción de FOS

En cuanto a la actividad enzimática, esta solo fue evaluada para las fermentaciones realizadas a 48 horas, pues a este tiempo se presentaron los mayores resultados en cuanto a producción de FOS.

La mayor actividad de transferencia ($28130\mu\text{mol}/100\text{mL}$) se observó con el 20 % de sacarosa del 20%. El porcentaje de fructosa transferida fue de 33,45% en relación con la concentración de sustrato presente en el medio de reacción (Figura 1).

Finalmente, sobre el efecto que tiene la concentración de sacarosa en el medio se puede afirmar que, tanto en la fermentación como en la reacción de actividad con un 20% de sacarosa la actividad de transferencia y la producción de FOS es mayor.

Efecto de la concentración de extracto de levadura

La fuente de nitrógeno fue un factor de gran importancia en el proceso de ajuste del medio de cultivo, ya que colabora en la síntesis de metabolitos nitrogenados primarios y secundarios, y estructuras proteicas en cualquier microorganismo (15). En este caso se utilizó como fuente inorgánica de nitrógeno nitrato de sodio (0,72 g/L) y como fuente orgánica el extracto de levadura. El extracto de levadura, que fue objeto de evaluación, se ha trabajado a concentraciones de 0,5 g/L y 10 g/L en el medio de fermentación para la producción de FOS (9).

Se decidió hacer la evaluación de tres niveles de extracto de levadura (0,2%, 0,5% y 1,0%) con 20% de sacarosa en el medio de cultivo.

El microorganismo creció en mayor proporción con la utilización de extracto de levadura al 1,0% a 48 horas de fermentación presentando un valor de 1,5 g/100 mL (Tabla 2). En la evaluación de pH se observó una relación directa con las concentraciones de extracto de levadura usadas (Tabla 2). Entre menor es la concentración de extracto de levadura el descenso en el pH fue mayor. El pH más bajo (3,15) se obtuvo con una concentración de extracto de levadura 0,2%.

En relación a la producción de FOS, se observó que alcanza su máxima respuesta a las 36 horas independientemente de la concentración de extracto de levadura utilizada (Tabla 2). Luego a las 48 horas se evidencia un fenómeno de hidrólisis que es más notoria con extracto de levadura al 1%

Con una concentración de 0,2% en un tiempo de fermentación de 36 horas se presentó la mayor producción de FOS con un valor 32,6 g/L, como se muestra en la Tabla 2. Aunque a estas condiciones se produjo la mayor cantidad de FOS, los valores de sustrato residual nos muestran que con un 1,0% de extracto de levadura se presenta una cantidad mucho menor.

La cantidad de FOS formados con la adición de una concentración de 0,2% de extracto de levadura en una fermentación a 36 horas, supera en casi tres veces la cantidad de FOS formadas con simplemente la utilización de un 20% de sacarosa en un tiempo de 48 horas como se evidenció en la primera etapa del proceso de ajuste.

La formación de ácidos también permite el descenso del pH independientemente de la concentración de extracto utilizada, siendo el fenómeno más acentuado con extracto de levadura al 0,2%. Si asociamos este fenómeno a la formación de FOS, podríamos pensar que FOS implica acumulación de glucosa, y esta a su vez

Tabla 2. Efecto del extracto de levadura sobre los parámetros de fermentación con *Aspergillus niger* AN 166.

E.L. %	Biomasa (g/L)			pH			FOS (g/L)			% Sacarosa residual		
	24 h	36 h	48 h	24 h	36 h	48 h	24 h	36 h	48 h	24 h	36 h	48 h
0.2	0.45	1.13	1.20	5.08	3.47	3.15	3.29	32.63	14.71	87.44	19.96	7.97
0.5	0.53	1.16	1.19	5.30	4.66	3.36	7.54	28.32	21.41	84.8	27.50	8.70
1.0	0.45	1.32	1.53	5.41	5.04	4.51	8.78	26.15	1.68	71.78	11.75	3.45

mayor formación de sustancia ácida y en consecuencia mayor descenso en el pH del medio. Correlación que se ve en la Tabla 2, mayor producción de FOS mayor descenso de pH.

El ensayo de actividad se realizó para las fermentaciones de 36 horas, observándose una clara influencia de la concentración de extracto de levadura sobre la actividad de transferencia después de 480 minutos de reacción.

En la Figura 2 se observa que la fructosa transferida (Figura 2) con una concentración de 0,20% de extracto de levadura es de 34938 mol/100mL que representan el 31% del total del sustrato presente en la reacción (Figura 2B).

Figura 2. Efecto del porcentaje de extracto de levadura sobre (A) la actividad FTF y sobre (B) el porcentaje de fructosa transferida

En la reacción enzimática el sustrato residual presente fue menor con una concentración de extracto de levadura del 1,0% (24,7%). En relación con las demás concentraciones utilizadas sus valores son similares, por lo tanto la concentración de extracto de levadura no

influye en la hidrólisis del sustrato pero sí en el proceso de transfructosilación.

En esta etapa del proceso de ajuste del medio de cultivo se eligió trabajar como se mencionó anteriormente con 20% de sacarosa y adicionalmente 0,2% de extracto de levadura para llevar a cabo el siguiente paso de la metodología planteada.

Efecto de la concentración de carbonato de calcio

La utilización de los iones calcio como cofactor o activador de sistemas enzimáticos es un hecho común en la elaboración de medios de cultivo. Con una concentración de 1mM del ión se presenta un aumento en la actividad de transferencia de fructosa en microorganismos productores de FOS (17).

Generalmente el aporte de estos iones al medio se realiza con la utilización de CaCl_2 . De la misma manera, la teoría acerca de la enzima reporta que en el intervalo de pH de 3,5 a 6,0

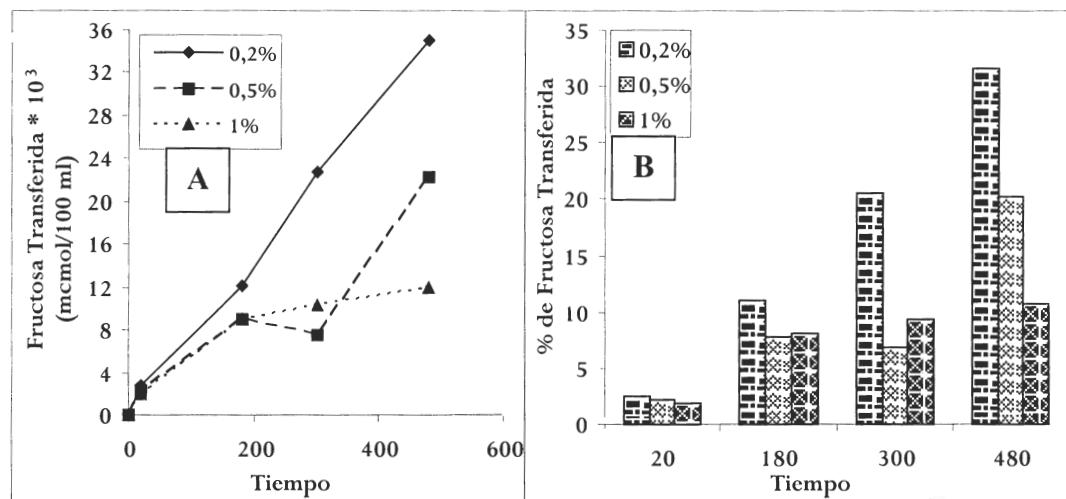


Figura 2. Efecto del porcentaje de carbonato de calcio sobre (A) la actividad FTF y sobre (B) el porcentaje de fructosa transferida.

Tabla 3. Efecto del carbonato de calcio sobre los parámetros de fermentación con *Aspergillus niger* AN 166.

% CaCO ₃	Biomasa (g/L)			pH			FOS (g/L)			% Sacarosa residual		
	24 h	36 h	48 h	24 h	36 h	48 h	24 h	36 h	48 h	24 h	36 h	48 h
0.05	0.334	0.821	1.07	6.78	3.78	3.18	1.87	21.94	4.75	91.23	40.15	8.14
0.10	0.4326	1.018	1.143	6.92	4.42	4.18	3.93	25.68	4.07	90.06	25.36	5.26
0.15	0.5374	1.042	1.201	6.68	5.93	5.23	4.32	32.74	8.61	85.37	15.86	4.35
0.20	-	-	-	-	-	-	3.29	32.63	14.71	87.54	20.48	3.56

esta es estable y presenta una máxima actividad de transferencia en 5,5. En la metodología propuesta para este trabajo se eligió usar CaCO₃ a tres niveles (0,05%, 0,1% y 0,15%) con el fin de adicionar al medio los iones calcio necesarios y además mantener el pH en el rango de estabilidad (8).

En la Tabla 3 vemos que a mayor concentración de carbonato utilizada (0,15%) se presenta la mayor cantidad de biomasa (1,2g/100mL). Paralelamente a este hecho el descenso en el pH también es influenciado por la concentración de carbonato en el medio, por lo que a una concentración de 0,05% de carbonato el descenso en el pH fue mayor, mostrando un valor de 3,18. Entre mayor cantidad de carbonato hay, mayor es la capacidad de neutralización del medio de cultivo.

En cuanto a la producción de FOS, se logró su mayor valor (32.7 g/L) con 0,15% de carbonato a las 36 horas al igual que con 0,2% de carbonato. Por lo tanto, el incremento en la concentración de carbonato aumenta la producción de FOS, dentro de las condiciones establecidas en el ensayo. Sin embargo, estos resultados muestran que el uso de carbonato en estas cantidades no representa ninguna ventaja frente al medio con 0,2% de extracto de levadura sin

carbonato, como se observa en los resultados del ensayo anterior (Tabla 1).

La hidrólisis de los productos fue detectada a las 48 horas de fermentación, este fenómeno se presentó en mayor grado que en los ensayos realizados con solamente extracto de levadura en el medio.

Los resultados también muestran que a una mayor concentración de carbonato de calcio existe una mayor utilización de sacarosa. El sustrato residual se presentó en menor proporción a la concentración de carbonato de calcio de 0,15% alcanzando un valor de 4,68% (Tabla 2).

La mayor actividad de transferencia se observó a las 36 horas de fermentación con el uso de 0,05% de carbonato de calcio, reportando un valor de 16500mol/100mL de fructosa transferida que corresponde a un 15,23% con relación al sustrato del medio (Figura 2).

El sustrato consumido durante la reacción enzimática comparado con el sustrato consumido durante el proceso de fermentación, muestra la posibilidad que durante este último la cantidad consumida por el microorganismo en gran proporción fue utilizada para su mantenimiento energético y aumento de su masa celular y en una más baja proporción para la producción de FOS.

Tabla 4. Hongos aislados según el sitio de recolección y tipo de muestra

Municipio	Vereda	Lugar	Tipo de muestra		
			Cachaza	Bagazo	Tierra
La Peña	Mompos	1			1
	Mompos	2	1	5	1
	Terama	3	2	3	1
Yacopí	Chapas	1		1	
	Chapas	2		3	1
	El volador	3		4	1
Caparrapí	Las pilas	1		2	1
	Las pilas	2	1	2	
Guaduas	Sargentó	1		3	2
	El Monte	2	2		1
	Sargentó	3		2	1
Villeta	El Balsal	1		3	
	El Balsal	2	4	4	1
	Llanogrande	3	1	4	
Quebrada Negra	Caleta	1		3	
	Concepción	2	2	3	
	Concepción	3	2	2	1
Nocaima	San Agustín	1	1	2	2
	Las Mercedes	2	1	1	1
	Alto de la cruz	3	1	1	
Nimaima	Pinzaima	1		4	
	Resguardo alto	2	1	4	2
	Resguardo alto	3	4	3	1
Pacho	Las Huertas	1		2	1
	Las Hueras	2		3	2
La Palma	Las Vueltas	1	2	3	1
	Matecaña	1	2	5	2
El Peñón	Potrero largo	2		1	1
	Potrero Largo	3		2	
Topaipí	Centro oriente	1			3
	Centro oriente	2	1	1	2
	Centro oriente	3		2	

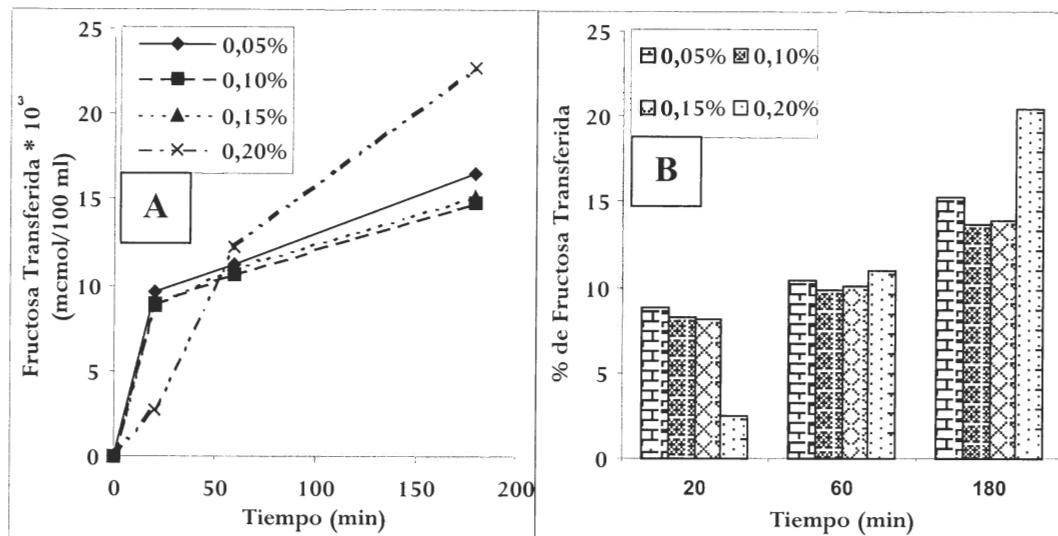


Figura 3. Efecto del porcentaje de carbonato de calcio sobre (A) la actividad FTF y sobre (B) el porcentaje de fructosa transferida.

En general, el estudio de actividad nos muestra que en comparación con la etapa de ajuste anterior el carbonato disminuye la actividad de transferencia de fructosa y el proceso de hidrólisis.

Con la evaluación del efecto de la concentración del carbonato de calcio sobre la producción de FOS, culminó el proceso de ajuste del medio. Finalmente se concluyó que el medio más adecuado para la evaluación de los aislados es el que contiene un 20% de sacarosa como sustrato y 0.2% de extracto de levadura como fuente de nitrógeno.

Aislamiento de hongos nativos

Los sitios de recolección de muestras fueron elegidos de acuerdo a la información suministrada por la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Económico en la Unidad Regional de Planificación Agropecuaria URPA de la Gobernación de Cundinamarca, sobre territorios

dedicados al cultivo de caña y fabricación de panela (23). Se visitaron 32 fincas en 20 veredas de 12 municipios de la región de Cundinamarca. Los sitios seleccionados no presentan aplicación de fertilizantes químicos, ni fungicidas, ni herbicidas, ni insecticidas en el área de cultivo y la existencia de bagazo no menor a un mes ni mayor a seis meses de producido. Algunas características promedio de la región tenidas en cuenta durante el proceso de recolección fueron: temporada de verano, temperatura 28° C, hora de recolección 10am, 2pm y 5 pm.

De las muestras se aislaron 138 hongos que según el lugar y la fuente de obtención se distribuyeron como se presenta en la Tabla 4.

En las fermentaciones realizadas con la utilización del medio de cultivo ajustado y durante un tiempo de 36 horas se observó que 40% de los hongos aislados no producen FOS, el 25% producen 5g/L de FOS o menos, el 14% entre 5

y 10 g/L, el 18% entre 10 y 30 g/L, y el 4% entre 30 y 41 g/L, que es mayor a lo producido por *Aspergillus niger* AN 166. Es necesario anotar que un 56% es productor de FOS pero para el desarrollo de este trabajo el análisis se centro en los resultados de aquellos aislados que durante la fermentación presentaron mayores resultados que el modelo biológico. La mayor cantidad de FOS producida fue reportada con el aislado 40 con un valor de 40,2 g/L (Tabla 5). Este resultado comparado con el presentado para el *Aspergillus niger* AN 166 (32,6 g/L), representa un aumento del 23% en la producción con respecto al modelo biológico utilizado.

Se puede destacar que la principal fuente de obtención tanto de los hongos de mayor producción que el *Aspergillus niger* y en general los productores de FOS provienen del bagazo de caña. Adicionalmente, los cinco aislados seleccionados pertenecen al género *Aspergillus*.

La sacarosa residual fue un interesante parámetro de análisis en este caso, ya que generalmente todos los aislados consumieron una cantidad de alrededor del 90 al 95 % del sustrato presente en el medio, sin embargo, tanto el

modelo biológico como el aislado 68 presentaron un consumo de sacarosa mucho menor 78% y 81% respectivamente (Tabla 5).

La relación entre la cantidad de FOS formada y los micromoles de fructosa transferida depende del tipo de productos formados, es decir, como se puede observar durante la evaluación de los aislados el mayor productor es el aislado 40 pero el aislado 68 fue el más eficiente en el proceso de transfructosilación (Tabla 5).

Aunque no hay grandes diferencias en cuanto a la producción de FOS, estas se ven más marcadas en la proporción de los tipos de producto formado kestosa, nistosa y fructofuranosil nistosa (Tabla 5).

El ensayo de actividad fructosiltransferasa se llevó a cabo en un periodo de tres horas de reacción e igualmente para las fermentaciones se utilizó como modelo de comparación el *Aspergillus niger* AN 166. Durante la reacción enzimática los resultados con relación a producción de FOS, fructosa transferida y sacarosa residual difieren a los observados en el proceso de fermentación.

Tabla 5. Parámetros de fermentación del *A. niger* AN 166 y los aislados nativos seleccionados.

Hongo	FOS (g/L)	% Sustrato residual	% de fructosa transferida	% de distribución de FOS			F FN*
				Kestosa	Nistosa	F FN*	
<i>A. niger</i> AN 166	32.6	20.0	2.5	73.9	25.69	0.42	
# 33	33.7	6.3	6.3	27.98	53.86	18.16	
# 34	37.6	11.2	5.1	64.04	34.37	1.59	
# 40	40.6	7.4	7.3	51.14	47.97	8.89	
# 68	36.4	22.3	8.7	32.83	13.67	53.50	
# 74	39.8	7.6	6.8	53.33	46.67	0.00	

*F FN: FructofuranosilNistosa

Tabla 6. Parámetros del ensayo de actividad fructosiltransferasa con *A. niger* AN 166 y los aislados nativos seleccionados.

Hongo	FOS (g/L)			% Fructosa transferida			% Sacarosa residual		
	20 min	60 min	180 min	20 min	60 min	180 min	20 min	60 min	180 min
AN 166	-	-	-	3	11	21	98	72	4
# 33	17.69	72.98	13.58	5.6	21.1	3.6	43.8	29.3	14.2
# 34	9.74	37.80	196.07	2.9	10.8	57.2	45.2	33.2	17.3
# 40	5.50	24.31	172.65	1.5	6.5	49.9	48.2	35.1	18.8
# 68	2.36	41.06	110.97	0.6	13.3	29.6	45.9	28.7	18.0
# 74	6.64	31.61	195.70	1.9	8.4	55.4	46.8	32.0	16.2

La mayor producción de FOS se obtuvo con el aislado 34 con 196,07g/L (Tabla 6). La mayor actividad de transferencia la presentó el aislado 34 con un 57,2% de fructosa transferida del total de la sacarosa presente en la reacción, es decir 42478 μ mol/100mL (Tabla 6). Estas micromoles representan un 87% más de las transferidas por el modelo biológico utilizado. Igualmente con respecto a la cantidad de sacarosa residual, el AN 166 fue el microorganismo que mayor valor presentó en este parámetro

(44%) y el aislado número 33 fue el aislado con la menor cantidad de sustrato residual con un 14.2 % (Tabla 6).

En el caso del aislado 33 se observa el proceso de hidrólisis que sufren los FOS desde los 60 minutos de reacción. Aunque durante los primeros 60 minutos la transferencia de fructosa es mayor que la producida por el modelo biológico la enzima súbitamente detiene su actividad de transferencia pero continúa su proceso de hidrólisis.

Tabla 7. Proporción de FOS producidos durante el ensayo enzimático de los aislados nativos seleccionados.

Hongo	20 min			60 min			180 min		
	Kestosa	Nistosa	F FN	Kestosa	Nistosa	F FN	Kestosa	Nistosa	F FN
# 33	73	12	15	85	15	-	100	-	-
# 34	80	20	-	85	15	-	82	18	-
# 40	100	-	-	100	-	-	82	18	-
# 68	100	-	-	55	45	-	100	-	-
# 74	80	12	-	100	-	-	90	10	-

Las proporciones de cada tipo de producto formado durante la reacción enzimática se presentan en la Tabla 7. Estos resultados necesariamente tienen que ser comparados con los reportados en las fermentaciones, con el fin de esclarecer el tema relacionado con el mecanismo empleado por la fructosiltransferasa en cada microorganismo.

La característica general de la enzima en todos los aislados es que presenta dos actividades, la hidrólisis de la sacarosa y la síntesis de fructanos. Sus diferencias en el mecanismo radican en el paso de hidrólisis en donde la FTF actúa específicamente para la sacarosa o por el contrario actúa en cualquier sustrato.

El aislado 33 produce la formación de los tres oligosacáridos durante la fermentación y la reacción enzimática, pero en baja proporción comparada con los demás aislados (Tabla 6). Después de la primera hora de reacción se presenta el proceso de hidrólisis de la nistosa y la fructofuranosilnistosa a kestosa. En este aislado sería necesario la estandarización de otras condiciones específicas para la enzima FTF, con las cuales se pudiera lograr la máxima actividad, ya que posiblemente factores como la temperatura, la concentración de sustrato e incluso el tiempo de reacción no fueron los más apropiados para llevar a cabo este ensayo.

El aislado 34 mantiene la proporción del producto con un aumento progresivo de concentración, lo cual nos indica que la actividad hidrolítica sobre los productos no existe, es decir, que kestosa y nistosa no se usan como donores aceptores.

En el aislado 40 se presenta la formación de kestosa y nistosa durante la fermentación en proporciones prácticamente similares, durante el seguimiento de la reacción enzimática se observa que la formación de kestosa ocurre en un 100% durante la primera hora y transcurridas las tres horas de reacción se observa la aparición

de nistosa. Esto nos sugiere un mecanismo vía ping-pong que se caracteriza porque su acceptor inicial es la sacarosa y subsecuentemente las cadenas de fructanos que son formadas durante la misma reacción.

El aislado 68 produce en principio kestosa, luego nistosa y al final solo kestosa, lo cual hace pensar la actividad hidrolítica es muy alta, asociada a una pobre afinidad de kestosa como acceptor, nos muestra un microorganismo productor de kestosa de manera exclusiva, que desde el punto de vista de un proceso productivo es mucho más atractivo como modelo.

El aislado 74 durante el proceso de fermentación produce dos tipos de fructanos kestosa y nistosa. Durante su seguimiento en la reacción enzimática se puede observar que a través de los primeros 60 minutos, la nistosa formada es hidrolizada y posteriormente formada en mayor proporción, con ello aunque en estos procesos solo se observe la formación de estos productos es claro que la enzima no actúa específicamente sobre la sacarosa para hidrolizarla y en su lugar simultáneamente toma los productos formados para la hidrólisis. Este mismo caso se observa para el aislado número 34 y 68.

De este trabajo podemos decir que todos los aislados seleccionados son potencialmente interesantes para ser utilizados en la producción de fructooligosacáridos por lo que sugerimos que se profundice en la caracterización de la enzima producida por cada uno de ellos, puesto que su comportamiento nos indica que deben ser microorganismos que producen enzimas de características bien diferentes.

Bibliografía

1. F.R. Batista, L. Hernandez y J.R. Fernandez, Substitution of Asp-309 by Asn in the Arg-Asp-Pro (RDP) motif of *Acetobacter diazotrophicus* levansucrase affects sucrose

- hydrolysis, but not enzyme specificity, *Biochem. J.*, **337**, 503 (1999).
2. L.J. Bergeron, E. Monrou y R.A. Burne, Characterization of the Fructosyltransferase gene of *Actinomyces naeslundii* WVU45, *J. Bacteriol.*, July, 3649 (2000).
 3. J. Campbell, Selected fructooligosaccharide (1-Kestose, Nystose and 1-B-Fructofuranosylnystose) composition of foods and feeds, *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 3076 (1997).
 4. G. Florez y Y. Glaehter, "Obtención de Fructooligosacaridos utilizando la enzima Fructosyltransferasa producida por *Aspergillus niger* (CEPA AN 166)", Tesis de Magíster en Microbiología, Universidad Nacional de Colombia, 2000.
 5. A.G. Heyer y R. Wendenduerg, Gene cloning and functional characterization by heterologous expression of the fructosyltransferase of *Aspergillus sydowii* IAM 2544, *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, (2001).
 6. H. Hidaka, M. Hirayama y N. Sumi, A fructooligosaccharide-producing enzyme from *Aspergillus niger* ATCC 20611, *Agricul. Biol. Chem.*, **52**, 1681 (1988).
 7. H. Kaplan y R.W. Hutchins, Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and bifidobacteria, *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 2682 (2000).
 8. C.E. LaRotta, "Utilización de la sacarosa en la producción de fructooligosacaridos por métodos enzimáticos. Primera parte. Producción y caracterización de la enzima Fructosyltransferasa de *Aspergillus niger* (CEPA AN 166)", Trabajo de Grado, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia, 1997.
 9. A. Madlova, M. Antosova, M. Bathova, M. Polakovic, V. Stefucova y V. Bales, Screening of microorganisms of transfructosylating activity of optimization of biotransformation of sucrose to fructooligosaccharides, *Chem. Technol.*, January, 366 (1999).
 10. K.B. Raper, "The genus *Aspergillus*", Williams & Wilkins Company, 1965. pp. 3-56.
 11. C. Rathsam y N.A. Jacques, Role of C-terminal domains in surface attachment of the fructosyltransferase of *Streptococcus salivarius* ATCC 25975, *J. Bacteriol.*, **180**, 6400 (1998).
 12. J. Rehm, L. Wllmitzer y A.G. Heyer, Production of 1-kestose in transgenic yeast expressing a fructosyltransferase from *Aspergillus foetidus*, *J. Bacteriol.*, **180**, 1305 (1998).
 13. M.E. roberfroid, Dietary Fructans, *Annual Reviews Nutrition*, **18**, 117 (1998).
 14. K. Saito, K. Kondo, I. Kojima, A. Yokota y F. Tomita, Purification and characterization of 2,6-D-Fructan 6-levanbiohidrolase from *Streptomyces exfoliatus* F3-2, *Appl. Environ. Microbiol.*, January, 252 (2000).
 15. R.J. Sharp, D. Smith, P. Stanbury y A. Wood, "Applied Microbial Physiology: A Practical Approach", IRL Press, 1997. pp. 54-60.
 16. D.D. Song y N.A. Jacques, Purification and enzymic properties of the fructosyltransferase of *Streptococcus salivarius* ATCC 25975, *Biochemical Society*, **341**, 285 (1999).
 17. D.D. Song y N.A. Jacques, Mutation of aspartic acid residues in the fructosyltransferase of *Streptococcus salivarius* ATCC 25975, *Biochemical Society*, **344**, 259 (1999).
 18. J.E. Spiegel, Safety and benefits of fructooligosaccharides as food ingredients, *Food Technol.*, January, 85 (1994).
 19. N. Sprenger, K. Bortlik, A. Brand, T. Boller y A. Wieken, Purification, cloning, and functional expression of sucrose: fructan

- 6-fructosyltransferase, a key enzyme of fructan synthesis in barley, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 11652 (1997).
20. N. Sprenger, L. Schellenbaum, K. Van Dun, T. Boller y A. Wielen, Fructan synthesis in transgenic tobacco and chicory plants expressing barley sucrose: fructan 6-fructosyltransferase, *FENS Letters*, **400**, 355 (1997).
21. I. Vijn, A. Van Dijken, M. Lüscher, A. Bos, E. Smeets, P. Weisbeek, A. Wiemken y S. Smeekens, Cloning of sucrose:sucrose-1-fructosyltransferase from onion and synthesis of structurally defined fructan molecules from sucrose, *Plant Physiology*, **117**, 1507 (1998).
22. J.W. Yun, Fructooligosaccharides, occurrence, preparation and application, *Enzyme Microbial Technol.*, **19**, 107 (1996).
23. <ftp://www1.cundinamarca.gov.co/mapas/>