

PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE EXTRACTOS ENZIMÁTICOS CRUDOS CON ACTIVIDAD DE FRUCTOSILTRANSFERASA

Camilo E. La Rotta*, Sonia A. Ospina**, Agustín López-Munguía***

* Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, AA 14 490, Santafé de Bogotá, Colombia.

** Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia, AA 14490, Santafé de Bogotá, Colombia,
E-Mail saospina@ciencias.ciencias.unal.edu.co

*** Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 510-3 Cuernavaca, MOR 62271, México,
E-mail agustin@ibt.unam.mx

RESUMEN

Se encontró que extractos crudos provenientes del cultivo de *Aspergillus niger cepa AN 166* poseen alta actividad de fructosiltransferasa. Se implementó un ensayo enzimático para evaluar las actividades de hidrólisis y transferencia observadas para la enzima que produce este microorganismo. Fueron encontradas actividades hidrolítica y de transferencia intra y extracelulares. Se encontró una mayor actividad extracelular de transferencia que la correspondiente encontrada para la fracción intracelular. La caracterización realizada permitirá posteriores estudios a nivel molecular de la o las enzimas que presentaron la actividad evaluada en esta cepa.

Palabras Clave: Fructosiltransferasa - Fructooligosacáridos - Transferencia de fructosa - FOS.

SUMMARY

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF CRUDE EXTRACTS WITH FRUCTOSYLTRANSFERASE ACTIVITY

A high fructosyltransferase activity in crude extracts, produced by batch culture of *Aspergillus niger AN 166* was found. An enzymatic trial for the evaluation was designed for the two kinds of activities, hydrolytic and transfructosylating presented for the strain. The results of these enzymatic trials for transferring and hydrolytic activities have shown that the extracellular activities are higher than the intracellular activities. This characterization will lead the next step in the study at molecular level for the enzymes that present the transferring activity in this strain.

Key Words: Fructosyltransferase - Fructooligosaccharides - Fructose transferring - FOS.

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, los carbohidratos y oligosacáridos han adquirido una relevancia biológica importante debido al descubrimiento de glicoproteínas y glicolípidos. La gran complejidad de los oligosacáridos, así como la alta especificidad de sus interacciones, dificulta en gran medida la posibilidad de su producción a gran escala por métodos tradicionales de síntesis bioquímica. Aunque tradicionalmente han sido obtenidos a través de procesos de extracción a partir de algunas plantas, así como por vía de hidrólisis enzimática de algunos polímeros producidos tanto por microorganismos como plantas, estos procesos son poco eficientes y difíciles de llevar a la escala de producción que el mercado actualmente requiere para estos productos.

Los fructooligosacáridos corresponden a carbohidratos complejos los cuales están formados por una a tres unidades de fructosa unidas por la posición β -2,1 a la sacarosa. Recientemente se han convertido en compuestos de gran interés por sus favorables propiedades funcionales tales como edulcorantes no calóricos y no cariogénicos, mejoradores de la microflora intestinal en mamíferos incluyendo al hombre, así como también disminuidores del colesterol total y lípidos en suero (1).

Los fructooligosacáridos actualmente son producidos por síntesis enzimática a través de la acción de β -D-fructosiltransferasas (FTasa, EC 2.4.1.9) o β -fructofuranosidasas (FFasa, EC 3.2.1.26) con alta actividad de transfructosilasa (4). Estas enzimas han sido encontradas en microorganismos tales como *Fusarium* sp., (2) *Aspergillus* sp., (3) *Aureobasidium* sp., (4) pero tan sólo unas pocas cepas poseen el potencial industrial que se requiere para su aplicación ya que la mayoría posee actividad transfructosilasa baja. Es por esto que se hace necesario buscar nuevos microorganismos con potencial para la expresión de esta enzima; es el caso de *Aspergillus niger AN 166*, que en trabajos previos durante la

Recibido para evaluación: 24 de octubre de 1997

Aprobado para publicación 18 de noviembre de 1997

producción de glucosa oxidasa, mostró ser productor de fructooligosacáridos (5).

La caracterización enzimática bien sea de extractos crudos o de fracciones purificadas de una enzima permite determinar las condiciones óptimas tanto para la máxima producción por parte de la enzima como de su propia estabilidad. El conocer estas condiciones permitirá evaluar más adelante parámetros mucho más específicos necesarios para la caracterización molecular y genética de la enzima. La caracterización realizada se llevó a cabo sobre extractos crudos no purificados tanto de micelio como de sobrenadante de fermentación evaluando los siguientes pa-

Medio de Cultivo

El medio de fermentación empleado fue diseñado por Quirasco en 1990 y posee la siguiente composición: Sacarosa 400 g/L, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 2,0g/L, KH_2PO_4 0,25 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,25 g/L, KCl 0,25 g/L, FeCl_3 0,01 g/L. Por otra parte la cepa fue conservada en medio Czapek-Dox.

Cultivo del Microorganismo

Los ensayos de fermentación fueron realizados en un Bioflo III Batch-continuous fermentor (New Brunswick Scientific) de 7 litros, de acuerdo con las condiciones anotadas en la Tabla 1.

Tabla 1. Descripción de las condiciones de los ensayos de fermentación realizados.

VOL. (mL)	DURACIÓN (horas)	PREINÓCULO (No. esporas)	T °C	pH	AGITACIÓN (r.p.m.)	O ₂ (vvM)	D.O.
5000	90	2X10	30	6.0	200-500	0.5-1	20%

rámetros que afectan las actividades tanto hidrolítica como de transferencia : pH óptimo, temperatura óptima, y efecto de la concentración de sustrato. Los ensayos enzimáticos de actividad, fueron realizados tanto para la actividad de transferencia como para la actividad de hidrólisis ya que de acuerdo a previos reportes estas dos actividades se presentan simultáneamente, durante la producción de fructooligosacáridos, por lo que se hace necesario cuantificarlas por separado.

PARTE EXPERIMENTAL

Microorganismo

Se empleó *Aspergillus niger* cepa AN 166, que corresponde a un microorganismo modificado genéticamente en el Instituto de Biotecnología de la Universidad de Praga en Checoslovaquia, para la superproducción de ácido glucónico. Sin embargo en el estudio de la producción de este compuesto se observó la presencia adicional de otros productos de interés, como es caso de los fructooligosacáridos (5). El microorganismo fue cultivado en medio de conservación Czapek-Dox (1) durante 12 días a 25°C, al cabo de los cuales fueron cosechadas las esporas por medio de una solución tensoactiva, obteniéndose una suspensión de esporas de aproximadamente $2,6 \times 10^7$ esporas por mililitro, la cual fue almacenada en refrigeración a 4°C hasta su utilización.

Obtención de la enzima

La enzima intracelular fue obtenida a partir de la ruptura del micelio con nitrógeno líquido y extraída con buffer citrato-fosfato 0,05 mM pH 6,0. La enzima extracelular fue obtenida a partir del sobrenadante intacto de la fermentación.

Determinación de la actividad enzimática

El ensayo enzimático empleado se basó en la medida de la velocidad inicial de reacción tanto para la actividad de hidrólisis como para la actividad de transfructosilación. La mezcla de reacción consistía en 4,5 mL de una solución de sacarosa al 4% (p/v) en buffer citrato-fosfato pH 5,5-6,0 y 0,5 mL del extracto enzimático. La reacción enzimática fue llevada a cabo a 55°C por 10 minutos y la reacción fue detenida por choque térmico con agua en ebullición por 10 min. La actividad transfructosidasa y la actividad hidrolítica fueron determinadas por la glucosa liberada (G), medida enzimáticamente por el método GOD-PAP (Boehringer-Mannheim) y por los azúcares reductores (R) totales liberados por el método DNS (5). Las siguientes ecuaciones fueron empleadas para calcular las concentraciones de fructosa libre (F) y fructosa transferida (F'), en la mezcla de reacción:

$$F = R - G$$

$$F' = G - F = 2G - R$$

Una unidad de actividad de transferencia fue definida como la cantidad de enzima requerida para transferir

un mMol de fructosa por minuto. Una unidad de actividad hidrolítica fue definida como la cantidad de enzima requerida para liberar un mMol de glucosa por minuto. La proteína total fue determinada por el método colorimétrico de Lowry (7), para cada uno de los extractos empleados para los ensayos enzimáticos realizados.

Tabla 2. Parámetros y variables estudiados para la caracterización de extractos crudos con actividad de transferencia.

Condiciones del ensayo: Parámetro a evaluar	Temperatura (°C)	pH	Sacarosa % (p/v)
Temperatura (°C)	25 -95	5,5	4
pH	55	3 - 8	4
Sacarosa % (p/v)	55	5,5	1 - 60

RESULTADOS Y DISCUSION

Tabla 3. Resultados generales de Actividad enzimática evaluada para la cepa 166 de *Aspergillus niger*.

	Actividad enzimática Intracelular	Actividad enzimática extracelular
Act. Hidrólisis (U/mL)	57.84	88.58
Act. Específica de Hidrólisis (U/mg)	22.47	45.53
Act. Transferencia (U/mL)	57.84	107.87
Act. Específica de Transferencia (U/mg)	22.47	55.44
PT (mg/mL)	2.574	1.940

PT = Proteína Total

Km Hidrólisis	7.49
Km Transferencia	10.03

Los resultados obtenidos (Tabla 3) muestran que la cepa AN 166 produce una mayor actividad transfructosidasa extracelular comparada con la actividad intracelular cuando fueron evaluadas bajo el mismo ensayo enzimático. El radio de transfructosilación (actividad de transferencia/actividad de hidrólisis) encontrado para la actividad enzimática extracelular fue de 121 %, superior que el radio de transfructosilación encontrado para la fracción intracelular que fue de 100%. Esto indica una menor actividad intracelular, aunque también puede sugerirse un factor de

interferencia para la actividad de transfructosilación en los extractos crudos provenientes del micelio, lo que es ventajoso en la producción de FOS.

La determinación del efecto del pH (Figura 1) sobre la actividades enzimáticas evaluadas muestra que la actividad máxima de transferencia ocurre a valores de pH entre 5,5 y 6,0. Además cabe anotar que esta actividad al igual que la hidrolítica son significativamente bajas a pH 5, hecho importante puesto que indica que seleccionando un pH determinado se favorece una reacción sobre la otra, es decir, para la producción de FOS el pH a seleccionar será 5-7, en el cual la hidrólisis se inhibe. En el estudio del efecto de la temperatura óptima de actividad (Figura 2) se observó que a medida que aumenta la temperatura aumentan también las actividades hidrolítica y de transferencia, sin embargo la actividad de transferencia alcanza su máximo a 55 °C siendo mayor que la actividad hidrolítica la cual es máxima a 80 °C; no obstante se observó que las dos actividades pre-

sentan niveles relativamente altos de actividad en el intervalo de 60 a 80°C, lo que puede indicar una alta termoestabilidad para la o las enzimas responsables.

Los resultados obtenidos en el estudio del efecto de la concentración de sustrato en la actividad (Figura 3) muestran que comparativamente en condiciones similares a las empleadas para los ensayos de actividad enzimática para otras cepas relacionadas el valor de actividad de transfructosidasa es muy cercano (11).

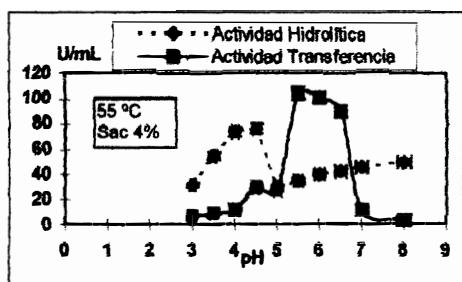


Figura 1. Efecto del pH sobre la actividad enzimática evaluada.

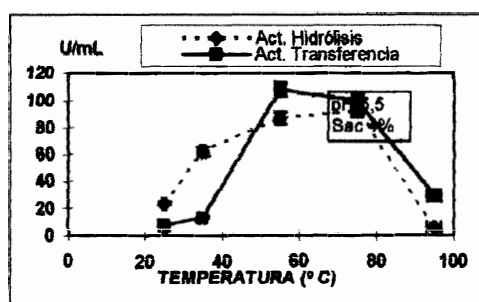


Figura 2. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática evaluada.

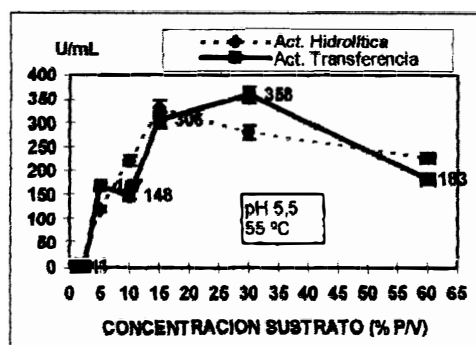


Figura 3. Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad enzimática.

<i>A. japonicus</i> TIT-90076	660 U/mL
<i>A. pullulans</i> ATCC 16629	360 U/mL
<i>A. niger</i> ATCC 20611	340 U/mL
<i>A. niger</i> AN 166	358 U/mL

El estudio de la fructosiltransferasa de *Aspergillus niger* AN 166 para los extractos evaluados hace parte del primer paso en el estudio de otros extractos con la misma actividad enzimática y permite comprender parámetros básicos que determinan la actividad y estabilidad de la o las enzimas responsables de esta actividad, sin embargo, el estudio debe ser complementado con los pasos de purificación que den como resultado la elucidación de otras características de la proteína en estudio como son: confirmación de la existencia de una o dos proteínas responsables de la actividad, peso(s) molecular(es), secuencia de aminoácidos, pH isoelectrico, etc.

Agradecimientos

Agradecemos al Instituto de Biotecnología, y a Colciencias, por el apoyo tanto económico como institucional para el desarrollo de este trabajo. Igualmente agradecemos a la Q.F. Amelia Vargas por la asesoría prestada.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bealing, F.J. and Bacon, J.S.D., *Biochemical Journal*. **53**, 277(1953).
2. Gupta, A.K. and Bhatia, T.S., *Phytochemistry*. **19**, 2557 (1980).
3. Hayashi, S. Nonogushi, M., Tkasaki, Y., Ueno, H., and Imada, K., *J. Indus. Microbiol.* **7**, 251 (1991).
4. Hidaka, H., Eida, T., Takizawa, T., Tokanaga, T. and Tashiro, Y., *Bifidobacteria Microflora*. **5**(1), 37 (1986).
5. Quirasco, M., Iturbe, F., Novak, M.F., López, A., *Rev. Lat.-Amer. Microbiology*. **35**, 273 (1993).
6. Hidaka, H., Hirayama, M. and Sumi, N., *Agricultural and Biological Chemistry*. **52**, 1181 (1988).
7. Lowry, O. Rosebrough, N. Farr, Al. *Journal of Biological Chemistry*, vol. **193**, 265 (1951).
8. Miller, G. L., *Anal. Chem.* **7**, 251 (1959).
9. Oku, T., Tokunaga, T. and Hosoya, N., *Journal of Nutrition*. **114**, 1574 (1984).
10. Park, Y. and Almeida, M., *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **7**, 331 (1991).
11. Wen-chang Chen, *Enzyme and Microbial Technology*, vol. **18**, 153 (1996).