

Producción y purificación parcial de fructanasas constitutivas mediante fermentación sumergida de *Aspergillus sojae*

Vázquez-Vuelvas, O. F.,^{a,*} Gutiérrez-Novela, L.,^a Rodríguez-Pérez, A.,^a y Barragán-Vázquez, F.^a

^a Universidad de Colima. Facultad de Ciencias Químicas. Laboratorio de Ingeniería Bioquímica. Km 9 Carretera Colima-Coquimatlán s/n. C.P. 28400. Coquimatlán, Colima. México. *oscar_vazquez@ucol.mx

RESUMEN:

Las fructanasas constituyen una importante clase de enzimas para la producción de fructosa y fructooligosacáridos, los cuales son empleados ampliamente en la industria de alimentos. La producción de fructanasas ha sido reportada a partir de distintos hongos, levaduras y bacterias. El fructano de agave es un polisacárido de reserva del agave que puede ser adecuado para la elaboración de jarabes y productos fructosados. Se llevó a cabo un estudio cinético para evaluar la producción de biomasa mediante fermentación en medio líquido con el hongo *Aspergillus sojae* empleando glucosa y sacarosa, triptona y sales minerales. Los extractos de fermentación se les analizó azúcares totales residuales, biomasa y pH. Los extractos preparados presentaron actividad fructanasa empleando fructano de agave como sustrato. No obstante que las condiciones de la reacción no fueron adecuadas al inicio, un primer paso de purificación fue apropiada para la identificación de la producción de fructanasa por *Aspergillus sojae*.

ABSTRACT:

The fructanases are an important type of enzyme in the fructose and fructooligosaccharide production, which are widely employed in the food industry. Fructanase production have been reported in different type of fungus, yeasts and bacteria. Agave fructan is a polysaccharide in the agave backup which can be used in the elaboration of fructose syrups and products. A kinetic study was carried out for biomass production through submerged fermentation. *Aspergillus sojae* was cultured using glucose and sucrose, as well as mineral salts and tryptone. Both fermentation extracts showed fructanase activity in presence of agave fructan substrate. Nevertheless, the catalytic conditions were not suitable for detecting reducing sugars formed during the reaction on crude extracts, a first step of purification was adequate for the detection and confirmation of the constitutive production of the fructanase enzyme by the *Aspergillus sojae*.

Palabras clave:

Aspergillus sojae, fructano de agave, fructanasa, fermentación líquida.

Área: Microbiología y biotecnología

INTRODUCCIÓN

Los fructanos son biomoléculas con estructura polimérica que tienen una unidad de glucosa terminal con unidades de fructosa unidas predominantemente por enlaces glicosídicos $\alpha(2-1)$, a los cuales se conocen comúnmente como inulinas. El *Agave tequilana* Weber Var. Azul es una planta de alto valor comercial en México, debido a que es la materia prima en la elaboración de muchas bebidas fermentadas y destiladas de gran tradición, como lo es el Tequila (Ávila-Fernández, Galicia-Lagunas, Rodríguez-Alegría, Olvera, & López-Munguía, 2011). El contenido de carbohidratos presentes en el *Agave tequilana* está compuesto principalmente por fructanos, los cuales pueden variar de acuerdo con su estado de maduración y la región de plantación (Arrizon, Morel, Gschaedler, & Monsan, 2010; Mancilla-Margalli, López, & López, 2006; Vazquez-Vuelvas & Contreras-Esquivel, 2013). Se ha reportado previamente que los fructanos presentes en el *Agave tequilana* presentan una estructura combinada compleja de uniones glicosídicas de fructosa $\alpha(2-1)$ y $\alpha(2-6)$, dichas estructuras se les ha denominado agavinas y tienen un grado de polimerización de 3 a 29. Además del agave, otras fuentes de fructano son la dalia, la chicoria, la alcachofa de Jerusalem y el yacón (Chesini *et al.*, 2013; Mancilla-Margalli *et al.*, 2006).

Los fructooligosacáridos (FOS) u oligofructosa, son fructanos con un grado de polimerización menor a 10, y son junto con la inulina, dos de los ingredientes más importantes en la formulación de ingredientes funcionales, específicamente en los llamados prebióticos (Ávila-Fernández *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2009). Dado que nuestro organismo carece de las enzimas digestivas necesarias para la hidrólisis de los fructanos, estos polímeros entran en

la definición de fibra dietaria y como consecuencia de su solubilidad en agua, la inulina es considerada como fibra dietaria insoluble (FDI), mientras que los FOS constituyen la fibra dietaria soluble (FDS) (Montañez-Soto, Venegas-gonzález, Vivar-Vera, & Ramos-Ramirez, 2011). Como tal, son parte de dietas bajas en calorías ya que han sido ampliamente utilizados para sustituir azúcar en muchos productos alimenticios, a pesar de que los FOS tienen un moderado poder dulzor (Ávila-Fernández *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2009). La acción prebiótica de los FOS se observa debido a que los alimentos ricos en fructanos al momento de su ingesta, viajan a través del sistema digestivo sin sufrir prácticamente alteración alguna hasta llegar al intestino grueso, donde la microflora presente en el colon (principalmente lactobacilos y bifidobacterias) las utiliza como sustrato fermentativo, dando como resultado diversos beneficios (Saad, Delattre, Urdaci, Schmitter, & Bressollier, 2013).

Los FOS son producidos principalmente por síntesis enzimática a partir de las sacarosas y fructosiltransferasas fúngicas o por hidrólisis enzimática de la inulina empleando inulinasas (Ávila-Fernández *et al.*, 2011). Las inulinasas microbianas se pueden dividir en dos clases de acuerdo con el patrón de hidrólisis. Exo-inulinasas (EC 3.2.1.80) rompen una unidad de fructosa terminal, mientras que las endo-inulinasas (EC 3.2.1.7) rompen en el interior de la cadena polimérica, produciendo fructoolosacáridos (Pouyez *et al.*, 2012)

Dentro de los microorganismos fúngicos que producen inulinasas para la producción de FOS, del género *Aspergillus*, se encuentran *Aspergillus niger*, el cual se puede obtener de manera comercial a través de extractos enzimáticos Megazyme (Fructozyme) y Novozyme (Ávila-Fernández *et al.*, 2011). Recientemente se reportó un trabajo donde se produce una enzima exoinulina de *A. niger* CH-A-2010, con el objetivo de producir azúcares fermentables para obtener etanol (Huitrón *et al.*, 2013). Adicionalmente, el hongo *Aspergillus ficuum* también ha demostrado actividad endo-inulina (Pouyez *et al.*, 2012).

La acción enzimática de las fructanasas disponibles comercialmente ha demostrado ser eficaz. Son enzimas producidas con *Aspergillus niger* utilizando sustratos como la chicoria o dalia, con acción –exo y –endo inulinasas. Sin embargo, dichas enzimas no han presentado la actividad deseada frente a sustratos como los fructanos provenientes del *Agave tequilana*, tal vez por la diferencia estructural altamente ramificada de las agavinas con respecto a otros sustratos, en donde las enzimas comerciales pueden ser producidas de manera inductiva. Por lo tanto, es posible considerar que el hongo filamentoso *Aspergillus sojae* representa una buena alternativa para la producción de fructanhidrolasas a partir de sustratos simples, o incluso evaluarse como productor de fructanhidrolasas constitutivas empleando solo glucosa y sacarosa como fuente de carbono en fermentaciones en medio líquido.

En este trabajo se reporta el estudio de la cinética de cultivo del hongo *Aspergillus sojae* empleando sacarosa y glucosa como fuentes de carbono, con el objetivo de evaluar y detectar la producción de una enzima que hidrolice los polisacáridos de fructano proveniente de *Agave tequilana*, mediante ensayos de actividad enzimática de los extractos de fermentación purificados parcialmente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Producción del inóculo

Para el estudio cinético del crecimiento de la biomasa fúngica, el inóculo se cultivó con hongo de la cepa *A. sojae* ATCC 20235 (American Type Culture Collection ATCC. Manassas, Virginia. E.U.A.) en un matraz Erlenmeyer de 500 mL, con 80 mL agar papa dextrosa. El cultivo se mantuvo a 30° C durante 8 días (Contreras Esquivel y Voget, 2004). Para la preparación del inóculo, se adicionaron 20 mL de solución de Tween 80 al 0.02% previamente esterilizada, y con un agitador y una barra magnética estéril se recogieron esporas para hacer una suspensión. El conteo de esporas se estimó utilizando una cámara de Neubauer.

Fermentaciones en medio líquido

Para la fermentación, el medio utilizado reportado previamente (Contreras-Esquivel, *et al.*, 1999) con algunas modificaciones en su composición fue (g/L): K₂HPO₄ 1g; KCl 0.5g; MgSO₄ • 7H₂O 0.5g; FeSO₄ • 7H₂O 0.01g; triptona 5 g y fuente de carbono, glucosa y sacarosa, 10 g. El pH se ajustó a 4 con ácido fosfórico 1 M antes de esterilizar a 121° C por 15 minutos. La fuente de carbono se esterilizó separadamente del resto de los componentes

del medio. Posteriormente, se colocaron 50 mL del medio líquido en matraces Erlenmeyer de 250 mL, y se inocularon 10^6 esporas del microorganismo en cada matraz. Las fermentaciones se llevaron a cabo durante 60 h para glucosa y 100 h para sacarosa, a 30° C con 200 RPM en un agitador rotatorio (CScientific, Mod. CVP-250).

Determinación de azúcares totales

La determinación de azúcares totales en las muestras de extracto crudo de los diferentes tiempos de fermentación con glucosa y sacarosa se realizó por el método fenol-ácido sulfúrico (Dubois, *et al.*, 1956). Se colocaron 250 μ L del extracto de fermentación o estándar en un tubo, se añadió 250 μ L de fenol al 5% (P/V) y se agitó en vortex. Se colocó la mezcla en baño de hielo durante 5 min. Se añadió 1 mL de H₂SO₄ concentrado con un dosificador de ácidos (Modelo Dispensette, Marca Brand) y se agitó nuevamente en el vortex. La mezcla fue llevada a ebullición durante 5 min. Se dejó enfriar en agua con hielo durante 10 min. Una muestra control blanco se preparó utilizando 250 μ L de agua desmineralizada y se le aplicó el mismo procedimiento de reacción. Se leyeron las absorbancias de las mezclas de reacción a 488 nm en el espectrofotómetro (Marca VELAB, modelo VE-5000V). Una curva de calibración se preparó utilizando una solución estándar de fructosa (0 - 100 ppm, utilizando 5 estándares y un blanco de agua desmineralizada).

Producción de biomasa

La producción de biomasa se determinó mediante gravimetría. El micelio producido en los extractos de las diferentes fermentaciones se filtró en papel genérico de poro cerrado previamente pesado. La biomasa colectada, se lavó con 100 mL de agua destilada y se secó en una estufa a 70° C durante 48 horas (Huitrón *et al.*, 2013).

Cromatografía de permeación en gel

La cromatografía de permeación en gel se llevó a cabo utilizando la columna HiTrap Desalting (Sephadex) G-25 de 5 mL (Marca GE LifeSciences), junto con una bomba peristáltica (Control Company, mod. Mini Pum Variable Flow) con un caudal de 1 mL/min. Se eluyeron 10 mL para equilibrar la columna con buffer de acetatos 50 mM, pH 4.5, se inyectó manualmente un volumen de 0.5 mL del extracto crudo ó 0.1 mL de una solución de 150 g/L de fructano de agave en agua, con una jeringa desechable de 1 mL de capacidad (marca BD), inmediatamente después alimentó un volumen de elución de 10 mL de solución de buffer en acetatos pH 4.5 a 50 mM. Una vez terminada la elución de la muestra, se inyectó la muestra y se eluyó con 10 mL del mismo buffer, obteniendo un total de 10 fracciones de un 1 mL. El procedimiento se planeó en base al instructivo de uso de la columna.

Actividad Enzimática

Para llevar a cabo para llevar la reacción enzimática (RE), se agregaron 50 μ L de extracto enzimático y 200 μ L de solución de fructano de agave (Nutriagaves de México S.A de C.V.) al 0.1% en buffer de acetatos 50mM pH 4.5. Una reacción control enzima (CE) y otro control sustrato (CS) se ensayaron simultáneamente y en las mismas condiciones. El CE es un tubo de ensaye con 50 μ L de extracto enzimático y 200 μ L de solución buffer de acetatos 50 mM pH 4.5; para el CS se agregaron 50 μ L de buffer de acetatos y 200 μ L de sustrato. Los tubos de ensaye son colocados en un baño maría a 40°C durante 24 horas de reacción. Una vez cumplido el tiempo se realiza la técnica de azúcares reductores por el método de Somogyi-Nelson (Nelson, 1944; Somogyi, 1951). El reactivo de Somogyi está constituido por dos soluciones. Solución "A", se prepara pesando 25 g de carbonato de sodio, 25 g de tartrato de sodio y potasio tetrahidratado, 20 g de bicarbonato de sodio y 200 g de sulfato de sodio, todos se disolvieron en agua destilada para aforar a 1L. Solución B, se agregaron 4 gotas de ácido sulfúrico concentrado en 200 mL de agua destilada, se añadieron 30 g de sulfato de cobre a la mezcla. Para llevar a cabo la preparación del reactivo de Somogyi, se mezclaron 25 mL de solución "A" con 1 mL de solución B y se mantuvo la mezcla en un frasco color ámbar para protegerla de la luz. El reactivo de Nelson está constituido por dos soluciones. La solución A, se prepara adicionando 21 mL de ácido sulfúrico concentrado a 450 mL de agua destilada, y posteriormente 25 g de molibdato de amonio. Para preparar la Solución B, disolvieron 3 g de arsenato disódico hidratado. Para preparar el reactivo de Nelson, se mezclaron las soluciones A y B, se aforó a 500 mL con agua destilada, se colocó en baño maría a 55°C durante 30 min. Para la determinación de azúcares reductores, se colocaron 250 μ L de mezcla de reacción de actividad enzimática. Se agregaron 250 μ L de reactivo de Somogyi y se agitó el tubo con ayuda de un vortex. El tubo fue calentado en baño de agua hirviendo durante 10 min. Se retiró del baño de agua hirviendo y se colocó en

baño de agua con hielo durante 5 min. Se añadieron 250 μ L del reactivo de Nelson. Se agitó el tubo en un vortex y se dejó en reposo durante 20 min. Se agregó 3 mL de agua destilada y se agitó en vortex. Se leyó la muestra a 600 nm en el espectrofotómetro (Marca VELAB, modelo VE-5000V). El blanco se preparó utilizando 250 μ L de agua desmineralizada. Una curva de calibración se preparó utilizando soluciones estándar de fructosa en buffer de acetatos 50 mM y pH 4.5 (0 - 100 ppm, utilizando 5 estándares y un blanco de agua desmineralizada).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Producción de biomasa

Los resultados de la producción de biomasa fúngica utilizando glucosa y sacarosa se muestra en la Fig. 1a y Fig. 1b, respectivamente. El comportamiento del crecimiento presenta una similitud al del perfil característico de un crecimiento microbiano, ya que estos perfiles de fermentación mostrados por *A. sojae* son semejantes al reportado previamente en un sistema similar utilizando *Aspergillus kawachii* en presencia de glucosa para la producción de poligalacturonas (Contreras Esquivel *et al.*, 1999). Se observa que el crecimiento en la producción de biomasa presenta la fase exponencial desde las 12 horas de haber iniciado la fermentación, continuando hasta las 36 horas que comienza la etapa semi-estacionaria. El valor máximo de biomasa producida utilizando glucosa fue 4.8 g/L al final del bioproceso de 60 h, mientras que el sistema que se basó en sacarosa alcanzó un máximo de 7.3 g/L a las 36 h. Sin embargo, al final del proceso de fermentación, la cantidad de biomasa disminuyó, finalizando en 4.4 g/L. El resultado que presenta la producción total de biomasa (4.4 g/L) para el cultivo de *A. sojae* utilizando sacarosa coincide en gran medida al presentado por el perfil de fermentación del *A. kawachii*, al haberse reportado que produjo 4.7 g/L al utilizar sacarosa, también como fuente de carbono para una fermentación sumergida (Vázquez-Vuelvas & Contreras-Esquivel, 2013). Cabe mencionar que el hongo *A. niger* CH-A-2010, aislado de los campos de *Agave Tequilana*, se empleó en una fermentación usando glucosa con el objetivo de producir una fructanasa. La productividad reportada para un periodo de 120 horas en dicha fermentación llevada a cabo a 37 °C fue de 0.75 g/L (Huitrón *et al.*, 2013), demostrando que la productividad entre diferentes especies del mismo género de hongos puede variar dependiendo de las condiciones del medio. Finalmente, la disminución del valor de biomasa presentado por el hongo empleando sacarosa puede deberse a que el incremento del micelio en el matraz, la viscosidad en el medio aumentar, provocando que la disponibilidad de azúcares y oxígeno se ve comprometida, promoviendo que el microorganismo realice un proceso de autólisis (Tung, Miyata, & Iwahori, 2004).

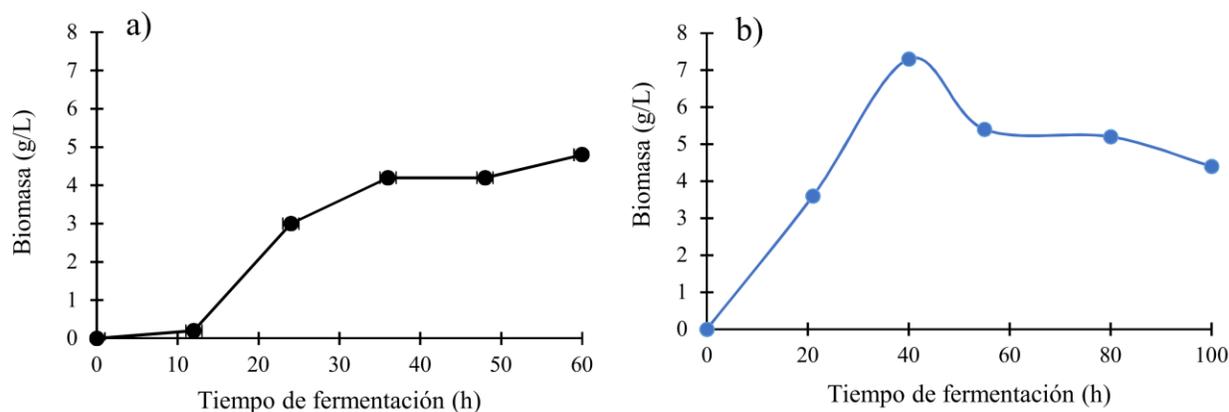


Figura 1. Producción de biomasa durante el tiempo de fermentación con los sustratos a) glucosa y b) sacarosa

Comportamiento del pH

Durante la fermentación en medio líquido de *A. sojae*, utilizando glucosa, el pH mostró el comportamiento que se ilustra en la Fig. 2a. El pH no presenta cambio durante las primeras 12 horas en el medio glucosado, a diferencia del medio con sacarosa como se muestra en la Fig. 2b, el cual muestra estabilidad inicial hasta las 20 horas. Ambos sistemas presentan una disminución en el pH hasta alcanzar un valor de 3.2 en las 40 horas. Posteriormente, se

observa un aumento en el pH en los dos hasta llegar a un valor alrededor de pH 7 en ambos cultivos a las 60 h. La última etapa del bioproceso con sacarosa alcanza un valor de 8.3 al final de las 100 horas de incubación.

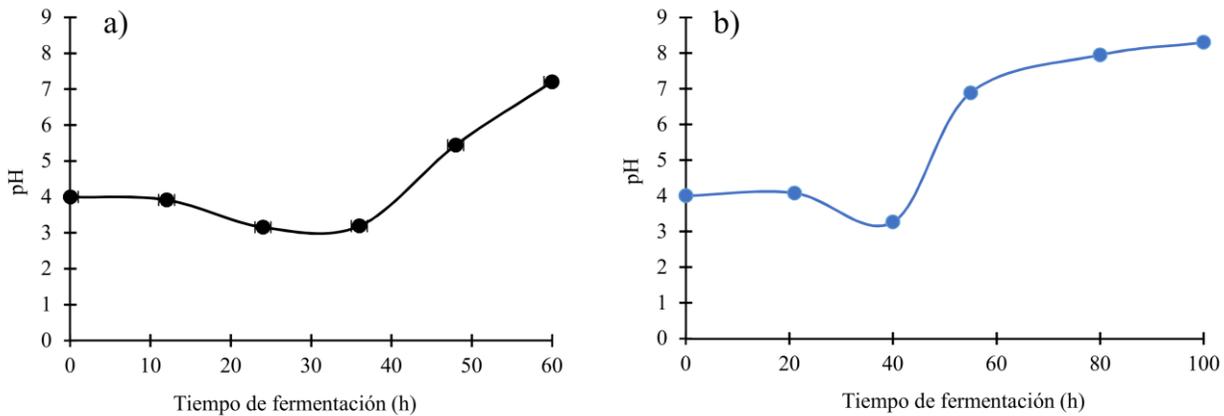


Figura 2. Comportamiento del pH con respecto al tiempo de fermentación empleando los sustratos a) glucosa y b) sacarosa

Considerando la biomasa, el aumento coincide con valores cercanos a 3 de pH del medio de ambos sistemas de fermentación (Tung *et al.*, 2004). Este comportamiento es característico de sistemas fúngicos del género *Aspergillus*, debido a que producción de ácido cítrico provoca que el ambiente se acidifique, el cual es adecuado para sus enzimas ácido-estables (Iwashita, 2002; Papagianni, 2004). Sin embargo, el comportamiento de aumento en el valor del pH después de las 40 horas tiene que ver con la presencia de amonio en el medio. El amonio es producto de la desaminación de aminoácidos que lleva a cabo el microorganismo, como resultado de su metabolismo. Se ha reportado incluso que fuentes de nitrógeno como la peptona, un producto similar a la triptona, puede ser utilizada como fuente tanto de nitrógeno como de carbono (Tung *et al.*, 2004). Por lo tanto, el consumo del nitrógeno de aminoácidos genera la liberación e incremento de iones amonio en el medio, generando así, un ambiente más básico (Lesniak & Podgorski, 2000; Tung *et al.*, 2004).

Consumo de la fuente de carbono

Se puede observar claramente que la cantidad de glucosa disminuye en forma proporcional al crecimiento de la biomasa fúngica (Fig 1). La concentración de glucosa a las 60 h fue de 0.851 g/L, lo que representa menos del 10% del total (Fig. 3a). El comportamiento mostrado por *A. sojae* en relación con el consumo de azúcares con el paso del tiempo, es el mismo al presentado por otros miembros del género *Aspergillus*; tal como el reportado por *A. niger* en una fermentación en medio líquido utilizando la misma fuente de carbono. En dicho reporte, se observa que, desde el inicio del bioproceso, la fuente de carbono comienza a disminuir al mismo tiempo que presenta un aumento exponencial en la producción de biomasa (Reginatto *et al.*, 2017). Al final del tiempo de fermentación, no se detectó el consumo total de la glucosa, debido a la combinación de varios factores, como lo es un alto suplemento del sustrato en el medio, un corto tiempo de incubación o una pequeña concentración inicial del inóculo.

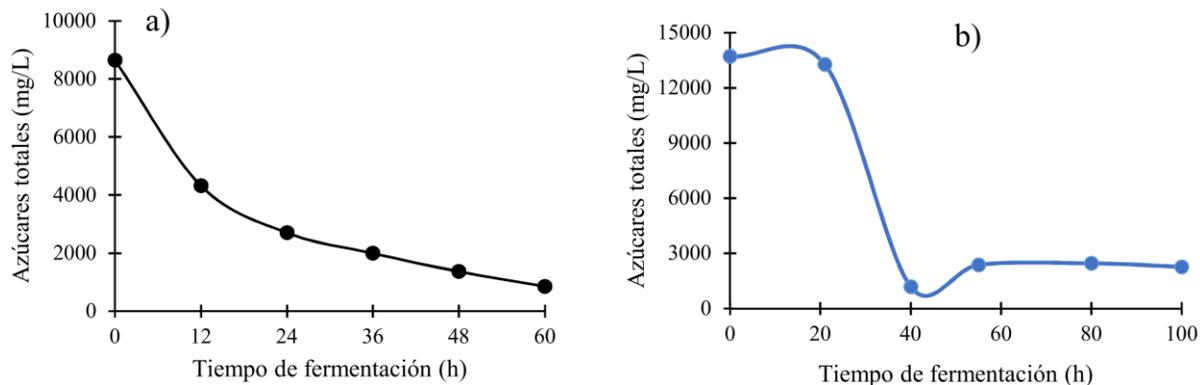


Figura 3. Relación del consumo de a) glucosa y b) sacarosa durante el tiempo de fermentación.

El perfil de consumo de sacarosa a lo largo de la fermentación en medio líquido de *A. sojae*, como se ilustra en la Figura 3b, indica que de las 21 a las 40 horas de fermentación, el sustrato disminuye en concentración de manera proporcional al incremento de biomasa, presentando un esquema similar al reportado para hongo del género *Aspergillus*, como el *A. kawachii*, al suplementarse con la misma fuente de carbono (Vázquez-Vuelvas & Contreras-Esquivel, 2013), llegando a 2.65 g/L de sustrato al final de la incubación. Cabe mencionar que el pequeño aumento en la concentración de azúcares totales que se observa a las 55 horas de fermentación y la invariabilidad de la concentración de sacarosa en el resto del cultivo puede ser un resultado asociado al mismo efecto observado en el decrecimiento de la biomasa (Fig. 1b). Es decir, a consecuencia del incremento exponencial del hongo, el incremento del micelio en el matraz afecta la viscosidad provocando un aumento, volviendo poco disponible el acceso al sustrato y al oxígeno, por lo tanto, el consumo de sacarosa decrece y se presenta un efecto de autólisis en el microorganismo. Finalmente, el consumo de las fuentes de carbono por parte de *A. sojae* en ambos cultivos, se llevó a cabo en valores arriba del 90% en glucosa y del 75% en sacarosa. Estos resultados concuerdan con lo observado previamente para un sistema utilizando *Aspergillus kawachii*, donde el uso de glucosa y sacarosa representa un buen suplemento para el hongo (Chesini *et al.*, 2013).

Cromatografía de permeación en gel de extractos enzimáticos y del fructano de agave

La actividad enzimática fructanasa fue evaluada inicialmente empleado extractos crudos de fermentación. Sin embargo, se detectó que los azúcares reductores, tanto en el extracto enzimático como en el sustrato empleado era muy alta para la técnica de determinación de AR's utilizada, ya que las absorbancias en el espectrofotómetro resultaban fuera de rango (resultados no mostrados). Ante esa situación, se optó por procesar, tanto los extractos de fermentación, como el sustrato, para eliminar en ambos la presencia de azúcares simples y de cadena corta, así como material residual de la fermentación, como son las sales minerales y otros metabolitos. Se aplicó un proceso purificación a los extractos enzimáticos de ambas fuentes de carbono y al sustrato, para la separación de moléculas que no son de interés para este trabajo.

Con la intención de obtener un sustrato con alta concentración de fructano, pero libre de oligosacáridos, a las fracciones resultantes de la cromatografía, se les determinó la concentración de azúcares reductores y de azúcares totales. La Figura 4a muestra los resultados de análisis de azúcares totales y azúcares reductores al extracto de 55 horas de la fermentación de sacarosa.

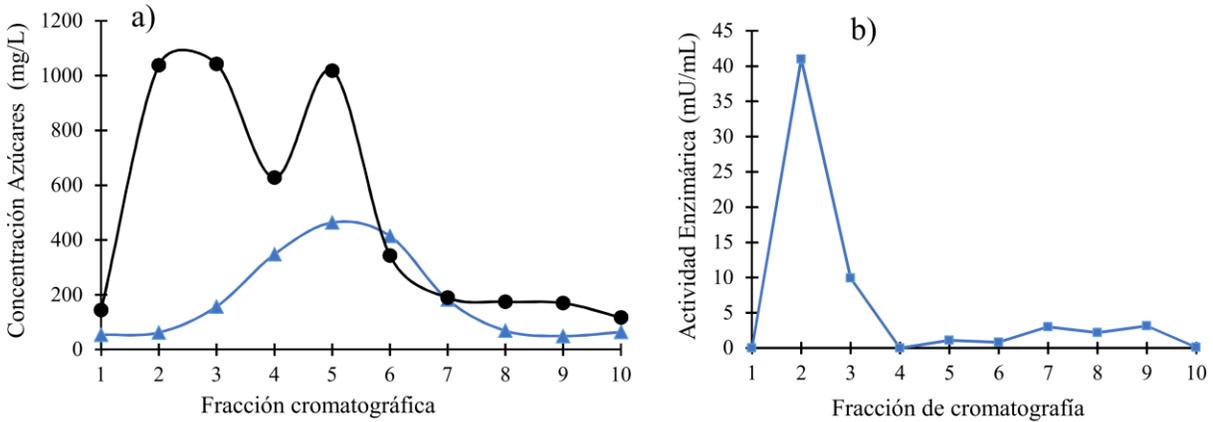


Figura 4. a) Concentración de azúcares totales (círculo) y reductores (triángulo) del sustrato fructano de agave purificado por cromatografía de permeación en gel. b) Actividad enzimática fructanasa mostrada por cada fracción resultante de la cromatografía de filtración en gel para el extracto de 55 h.

Como se puede apreciar de manera clara, la concentración de los azúcares totales en las diferentes fracciones de la cromatografía en general es mayor en el inicio, del tubo 1 al 5; y disminuyen conforme transcurre el proceso de filtración en gel (Fig. 4a). Por otro lado, la concentración de azúcares reductores a lo largo de la cromatografía presenta una mayor concentración a la mitad del proceso de filtración en gel, es decir entre los tubos 4 y 7 (Fig. 4a). Este comportamiento de picos separados mostrados por la gráfica permitió bajo el criterio de alta concentración de azúcares totales y baja concentración de azúcares reductores, considerar que las fracciones 2 y 3 eran las más adecuadas para emplearse como sustrato libre o bajo en azúcares de cadena corta, los cuales, son lo que elevan la concentración de azúcares reductores en la muestra sin filtrar. Es decir, Las fracciones seleccionadas se buscan con homogeneidad en la longitud de la cadena de las moléculas del polisacárido y una baja concentración de oligosacáridos. Las fracciones 2 y 3 se unieron para formar una sola solución a la cual se le analizaron los azúcares totales, resultando en una concentración estimada de 1500 ppm, para después diluirse a 1000 ppm, concentración para ensayar la actividad enzimática fructanasa.

En la Figura 4b se ilustran los resultados de la actividad enzimática mostrada por cada fracción de la cromatografía del extracto de fermentación. Se puede observar una tendencia clara de mayor a menor concentración de azúcares reductores producidos por la enzima durante la reacción catalítica, en la que la fracción 2 presentó marcadamente la mayor actividad enzimática, 42 mU/mL, seguido de la fracción 3 con 9.94 mU/mL. Este resultado indica claramente, la presencia de la enzima fructanasa en el extracto purificado.

Actividad enzimática fructanasa

Las fracciones 2 y 3 de la purificación de cada extracto obtenido con sacarosa, se utilizaron como extracto enzimático para determinar la actividad fructanasa de cada tubo de manera individual.

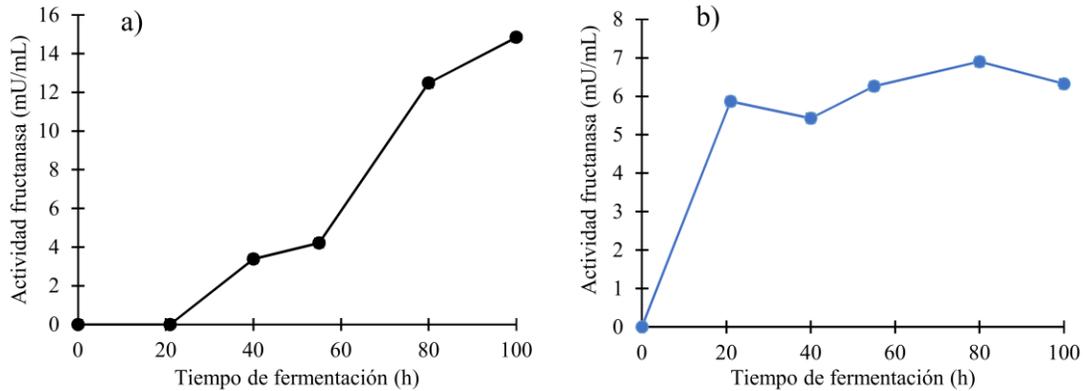


Figura 5. Actividad fructanasa de a) fracción 2 y b) fracción 3 de la filtración en gel de extractos de fermentación con sacarosa.

En la Figura 5a se observa los resultados de la actividad enzimática de la segunda fracción cromatográfica de los extractos enzimáticos obtenidos con sacarosa. Para el extracto de 21 horas no se detecta actividad enzimática debido posiblemente a que la concentración de la enzima fructanasa en el medio de fermentación es muy baja. Posteriormente, se detecta una actividad enzimática de 3.38 mU/mL a las 40 horas, que con el paso del tiempo comienza a incrementarse. A las 55, 80 y 100 horas se registra aumento continuo en la actividad enzimática, registrándose valores de 4.21, 12.47 y 14.83 mU/mL, respectivamente. La tendencia de incremento en la actividad catalítica de los extractos mostrada por *Aspergillus sojae*, es similar a la que presenta *Aspergillus niger* 20 Osm (Skowronek & Fiedurek, 2006) al fermentar un medio de cultivo con sacarosa como sustrato. Para la tercera fracción, la actividad enzimática se presentó desde las 20 horas de haber iniciado el proceso de fermentación, a diferencia del extracto de la fracción 2. La actividad fructanasa con mayor valor, 6.89 mU/mL, la presentó la fracción 3 del extracto de 80 horas, siendo una actividad menor que la de su correspondiente fracción 2. Sin embargo, la actividad catalítica fructanasa se comporta con poca variabilidad para el resto de los extractos de fermentación. Finalmente, haciendo una estimación de las actividades enzimáticas del tubo 2 y tubo 3 para el extracto obtenido a las 100 h de fermentación, podría ser posible que, si se unieran las dos fracciones, se podrían presentar una actividad fructanasa aditiva, es decir, los resultados de 6.32 y 14.83 mU/mL respectivamente, resultarían en 21.14 mU/mL.

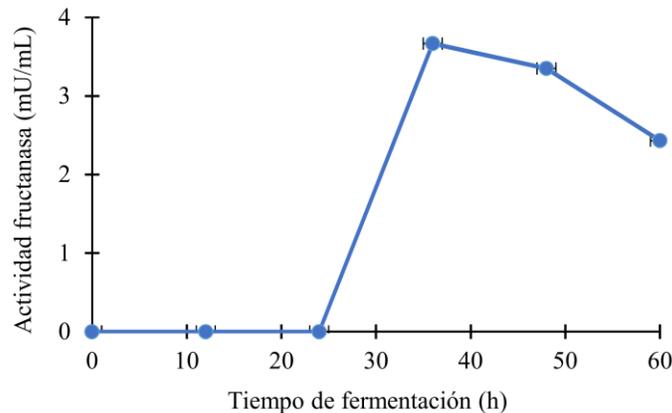


Figura 6. Actividad fructanasa de las fracciones 2 y 3 (unidades) de la filtración en gel de extractos de fermentación con glucosa.

En la figura 6 se observan los resultados obtenidos de actividad fructanasa por el extracto purificado a partir de glucosa. Como se ve claramente, las primeras horas de fermentación prácticamente no se detectó la presencia de la enzima. Sin embargo, el extracto fermentativo de 36 h presenta actividad enzimática, con 3.6 mU/mL, seguida por 3.34 mU/mL, mostrada por el extracto de 48 h. Se observa que, a partir de las 36 horas de haber iniciado el proceso

de fermentación, la actividad enzimática presentó una tendencia a disminuir. La tendencia en los resultados de actividad fructanasa desplegados por *Aspergillus sojae* en el presente trabajo, específicamente, el incremento de la actividad enzimática a partir de las 20 horas de fermentación coincide con el comportamiento mostrado por *Aspergillus niger* utilizando glucosa como fuente de carbono (Huitrón *et al.*, 2013).

CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos demuestran que las fermentaciones en medio líquido empleando sacarosa y glucosa como fuente de carbono, fueron adecuados para un buen crecimiento de *Aspergillus sojae*, mostrando perfiles de fermentación característicos para sistemas análogos. La filtración en gel resultó ser adecuada para una primera etapa de purificación de las proteínas con actividad catalítica fructanasa, así como; así como para preparar un sustrato de fructano de agave con uniformidad en el grado de polimerización. Los extractos purificados mostraron actividad enzimática fructanasa al incrementar la concentración de azúcares reductores formados durante la reacción de hidrólisis del sustrato, tanto en los extractos obtenidos empleando sacarosa como los que se obtuvieron empleando glucosa. La detección de la actividad catalítica fructanasa en las condiciones estudiadas es un indicio de que la enzima fructanhidrolasa es un metabolito producido de manera constitutiva por el hongo *Aspergillus sojae*, ya que los sustratos son simples y no son inductores, y por lo tanto no le generan la necesidad de la adaptación al medio de cultivo por parte del microorganismo.

Agradecimientos

El presente trabajo fue financiado a través del proyecto SEP-PRODEP UCOL-NPTC-250.

BIBLIOGRAFÍA

- Arrizon, J., Morel, S., Gschaedler, A., & Monsan, P. (2010). Comparison of the water-soluble carbohydrate composition and fructan structures of Agave tequilana plants of different ages. *Food Chemistry*, 122(1), 123–130.
- Ávila-Fernández, Á., Galicia-Lagunas, N., Rodríguez-Alegría, M. E., Olvera, C., & López-Munguía, A. (2011). Production of functional oligosaccharides through limited acid hydrolysis of agave fructans. *Food Chemistry*, 129(2), 380–386.
- Chen, H. Q., Chen, X. M., Li, Y., Wang, J., Jin, Z. Y., Xu, X. M., ... Xie, Z. J. (2009). Purification and characterisation of exo- and endo-inulinase from *Aspergillus ficuum* JNSP5-06. *Food Chemistry*, 115(4), 1206–1212.
- Chesini, M., Neila, L. P., de la Parra, D. F., Rojas, N. L., Esquivel, J. C. C., Cavalitto, S. F., ... Hours, R. A. (2013). *Aspergillus kawachii* produces an inulinase in cultures with yacon (*Smallanthus sonchifolius*) as substrate. *Electronic Journal of Biotechnology*, 16(3).
- Contreras Esquivel, J. C., Hours, R. A., Voget, C. E., & Mignone, C. F. (1999). *Aspergillus kawachii* produces an acidic pectin releasing enzyme activity. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 88(1), 48–52.
- Contreras Esquivel, J. C., & Voget, C. E. (2004). Purification and partial characterization of an acidic polygalacturonase from *Aspergillus kawachii*. *Journal of Biotechnology*, 110(1), 21–28.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356.
- Huitrón, C., Pérez, R., Gutiérrez, L., Lappe, P., Petrosyan, P., Villegas, J., ... Blancas, A. (2013). Bioconversion of Agave tequilana fructans by exo-inulinases from indigenous *Aspergillus niger* CH-A-2010 enhances ethanol production from raw Agave tequilana juice. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 40(1), 123–132.

- Iwashita, K. (2002). Recent studies of protein secretion by filamentous fungi. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 94(6), 530–5.
- Lesniak, W., & Podgorski, W. (2000). Effect of amino acids and vitamins on citric acid biosynthesis. In S. Bielecki, J. Tramper, & J. Polak (Eds.), *Food Biotechnology* (pp. 251–255). Amsterdam: Elsevier Ltd.
- Mancilla-Margalli, N., López, A., & López, M. G. (2006). Water-Soluble Carbohydrates and Fructan Structure Patterns from Agave and Dasyilirion Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(20), 7832–7839.
- Montañez-Soto, J., Venegas-gonzález, J., Vivar-Vera, M., & Ramos-Ramirez, E. (2011). Extracción, caracterización y cuantificación de los fructanos contenidos en la cabeza y las hojas del Agave tequilana Weber AZUL. *Bioagro*, 23(3), 199–206.
- Nelson, N. (1944). A photometric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose. *The Journal of Biological Chemistry*, 3(2), 375–380.
- Papagianni, M. (2004). Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnology Advances*, 22(3), 189–259.
- Pouyez, J., Mayard, A., Vandamme, A. M., Roussel, G., Perpète, E. A., Wouters, J., ... Michaux, C. (2012). First crystal structure of an endo-inulinase, INU2, from *Aspergillus ficuum*: Discovery of an extra-pocket in the catalytic domain responsible for its endo-activity. *Biochimie*, 94(11), 2423–2430.
- Reginatto, C., Rossi, C., Miglioranza, B. G., Santos, M. dos, Meneghel, L., Silveira, M. M. da, & Malvessi, E. (2017). Pectinase production by *Aspergillus niger* LB-02-SF is influenced by the culture medium composition and the addition of the enzyme inducer after biomass growth. *Process Biochemistry*, 58, 1–8.
- Saad, N., Delattre, C., Urdaci, M., Schmitter, J. M., & Bressollier, P. (2013). An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *LWT - Food Science and Technology*, 50(1), 1–16.
- Skowronek, M., & Fiedurek, J. (2006). Inulinase biosynthesis using immobilized mycelium of *Aspergillus niger*. *Enzyme and Microbial Technology*, 38(1–2), 162–167.
- Somogyi, M. (1951). Notes on sugar determination. *Journal of Biological Chemistry*, 19–24.
- Tung, T. Q., Miyata, N., & Iwahori, K. (2004). Growth of *Aspergillus oryzae* during treatment of cassava starch processing wastewater with high content of suspended solids. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 97(5), 329–335.
- Vazquez-Vuelvas, O. F., & Contreras-Esquivel, J. C. (2013). Estudio de biomasa fúngica de *A. kawachii* mediante fermentación en medio líquido. *Salud Publica Y Nutrición*, 2, 507–512.