

PRODUCCION DE FRUCTOOLIGOSACARIDOS POR INVERTASA DE *ASPERGILLUS NIGER* IB56: UN PREBIOTICO DE IMPORTANCIA PARA LA SALUD HUMANA Y ANIMAL

(*Production of fructooligosaccharides by invertase of Aspergillus niger: A prebiotic of importance for the human health and animal*)

Cristina Rubio M^{1*}; Carlos Latina¹ & Antonio Navarro I¹

¹Cátedra Biotecnología Microbiana, Instituto de Biotecnología.
Licenciatura en Biotecnología. Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia.
Universidad nacional de Tucumán. Tucumán. Argentina.
Correo electrónico: mcrubio@fbqf.unt.edu.ar

Palabras claves: *Aspergillus niger*, fructooligosacáridos, invertasa, prebióticos

Key words: *Aspergillus niger*, Fructooligosaccharides, Invertase, Prebiotics

RESUMEN

A partir de jarabe de fructosa se aislaron e identificaron microorganismos productores de invertasa. *Aspergillus niger* IB56 fue el que produjo mayor concentración de la enzima con actividad transferasa (5,6 U/ml). Se estudió la producción de fructooligosacáridos (FOS) a diferentes pH (3,0; 4,0; 4,5; 5,0 y 5,5); temperaturas (20, 25, 30 y 40 °C), concentración de sacarosa (150; 300 y 450 g/l) y tiempos de incubación (60; 90 y 120 min.). La máxima producción de FOS (105 g/l) se obtuvo con una concentración de sacarosa de 300 g/l; a pH 5,0; temperatura 20°C y a los 60 min de incubación. La enzima invertasa posee especificidad para producir FOS como 1-kestosa y nistosa, prebióticos de importancia en la industria farmacéutica porque tienen efectos benéficos sobre la salud y estimulan la flora microbiana del intestino humano y animal como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*.

INTRODUCCION

Actualmente, la industria alimentaria elabora una nueva generación de alimentos, llamados alimentos funcionales, cuyo poder nutricional lo diferencian del resto porque tienen efectos benéficos sobre el ser humano y animal (Bernardino et al, 2001; Sedó, 2001). Según el IFIC (International Food Information Council foundation), «alimento funcional» se denomina a aquellos productos procesados a los cuales se les adiciona un ingrediente

ABSTRACT

Several microorganisms that produce invertase were isolated from fructose syrup and identified. *Aspergillus niger* IB56 was the one that produced the greatest concentration of the enzyme with transferase activity (5.6 U/ml). We studied the production of fructooligosaccharides (FOS) at different pH (3.0, 4.0, 4.5, 5.0 and 5.5), temperatures (20, 25, 30 and 40 °C), sucrose concentrations (150, 300 and 450 g/l) and incubation times (60, 90 and 120 min.). Maximum FOS production (105 g/l) was obtained with a sucrose concentration of 300 g/l, pH 5.0, at 20 °C after 60 min of incubation. The enzyme invertase specifically produces FOS such as 1-kestose and nistose, which are important prebiotics in the pharmaceutical industry because they have beneficial health effects and stimulate the intestinal microbial flora such as *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* in humans and animals.

específico, como un nutraceutico (antioxidante, azúcares no digerible o prebiótico, probiótico, etc.). Los prebióticos, estimulan selectivamente el crecimiento y la actividad de una o más bacterias probióticas como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, que habitan el tracto intestinal, disminuyendo la invasión de bacterias patógenas. La defensa del organismo es una prioridad para la supervivencia de todo ser vivo. Por esta razón el cuerpo humano cuenta con un complejo sistema de defensas naturales conformado por: la flora microbiana, el epitelio intestinal, la capa mucosa,

y el sistema inmunológico (específico y no específico) que lo protegen de los microorganismos patógenos y de otras agresiones que pueden causar enfermedad (Perrin et al, 2000).

Los fructooligosacáridos (FOS), son oligofruktosas que tienen un grado de polimerización bajo (menos de 9 unidades de fructosa). Estos, debido a los enlaces "α" entre las moléculas (**Figura 1**) no son atacados por las enzimas digestivas del estómago ni del intestino delgado. De esta manera llegan al intestino grueso promoviendo el crecimiento de la flora probiótica intestinal, acción conocida como efecto prebiótico. Estas moléculas, también modulan el metabolismo de los lípidos, influyen en la formación del colesterol, previenen la constipación, incrementan la actividad del sistema inmunitario y facilitan la absorción del calcio y magnesio, necesarios durante la menopausia (Bekers et al, 2002).

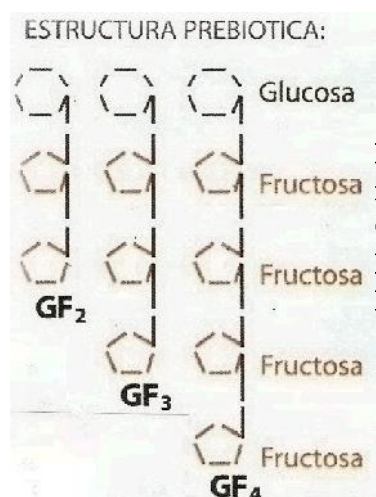


Figura 1: Estructura de fructooligosacáridos. GF₂, 1-Cestosa; GF₃, Nistosa y GF₄, 1-α Fructofuranosil nistosa

Los FOS pueden ser obtenidos por síntesis química o enzimática, el primero presenta desventajas debido a la formación de oligofruktosas con uniones a y b y a la formación de compuestos indeseables, obteniendo bajos rendimientos (60 %). Mientras que, por síntesis enzimática se producen compuestos con enlaces glicosídicos b, y se obtiene un 100 % de transformación de sustrato en producto.

Los FOS pueden ser producidos por hidrólisis enzimática de polímeros de fructosa como inulina y levano, o por reacciones de síntesis mediante la acción de transferasas (EC 2.4.1.9) e invertasas (EC 3.2.1.26) (Bekers et al 2002; Gómez et al, 2005). Esta última posee actividad de hidrólisis y de transferencia (Hernalsteens & Maugeri, 2010; Reddy et al, 2010). A concentraciones de sacarosa mayor a 100 g/l, invertasa transfiere específicamente moléculas de fructosa usando como núcleo de iniciación una molécula de

glucosa o sacarosa y forma fructooligosacáridos con enlaces b. Esta enzima se puede obtener a partir de hongos filamentosos y levaduras (Chen & Liu, 1996; Rubio et al, 2002; Vargas et al., 2004; Haq & Ali, 2005; Hernalsteens & Maugeri, 2008; Uma et al, 2010). Para la elección del microorganismo como fuente de obtención de enzimas se tiene en cuenta varios aspectos: bajos requerimientos nutricionales, bajo costo de extracción de enzima, prolongado tiempo de vida media y estabilidad operacional de la enzima. Los hongos filamentosos presentan ventajas respecto a las levaduras debido que, se usan métodos simples para la ruptura de la pared celular, no requieren medios ricos para su desarrollo celular y son grandes productores de enzimas (Rajoka & Yasmeen, 2005; Mussatto et al, 2009; Duca et al, 2009).

El Objetivo de este trabajo fue seleccionar un microorganismo productor de invertasa con alta actividad transferasa y estudiar las condiciones óptimas para la producción de fructooligosacáridos.

MATERIALES Y METODOS

Aislamiento directo: Se usó jarabe de fructosa (10 g/l), subproducto de la industrialización del almidón de maíz. El mismo se agregó a 50 ml de medio de MY₄₀ que está constituido por, g/l: 10, extracto de malta; 5, extracto de levadura; 400 g de sacarosa y 15, agar-agar, pH 5. La mezcla se distribuyó en tres cajas de Petri y se incubó a 30 °C durante 7 días.

Identificación: La identificación para hongos filamentosos se realizó en base a características macromorfológicas, micromorfológicas, fisiológicas y tipos de reproducción de acuerdo a los métodos propuestos por Ramírez (1982); Klich and Pitt (1988) y Pitt (1991). Para levaduras por Barnett et al (1990); Codón et al (1995); Kurtzman and Fell (1999) y se utilizó CANDIFAST test kit para *Cándida*.

Producción de invertasa: Se preparó un inóculo en solución fisiológica de cada microorganismo aislado, que contiene 10⁴ conidos/ml ó 10⁴ células/ml, que corresponde a una DO₅₆₀=0,25. Se agregó 5 ml (v/v) de inóculo a 50 ml de medio de Czapek Dox, constituido por, g/l: 3, NaNO₃; 1, K₂HPO₄; 0,5, MgSO₄·7H₂O; 0,5 KCL y sacarosa (10 g/l), a pH 4,5. Los ensayos se realizaron a 30 °C y a una velocidad de agitación de 250 rpm. Las muestras se extrajeron cada 12 h durante 48 h de incubación.

Preparación del extracto enzimático: Las levaduras se separaron del caldo por centrifugación a 4500 rpm, mientras que los hongos filamentosos por filtración. Las células se lavaron varias veces con agua destilada y se resuspendieron en 10 ml de ácido acético-acetato de sodio (0,2 M, pH 5). La ruptura celular se realizó con un sonicador hasta homogeneidad, el contenido intracelular fue separado de los restos celulares por filtración a través de una membrana filtrante (0,45 mm). El filtrado (extracto crudo) obtenido se conservó a 4 °C hasta determinación de actividad enzimática.

Actividad invertásica: Se usó una mezcla de reacción de la siguiente composición: 0,05 ml de extracto crudo; 0,45 ml de tampón ácido acético-acetato de sodio (0,2 M) a pH 4,5 más sacarosa (68,4 g/l). Se incubaron a 37 °C durante 10 min. Los azúcares reductores liberados fueron determinados por Somogyi (1945) - Nelson (1944). Una Unidad Enzimática se define como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de azúcares reductores por min.

Actividad transferasa: Se determinó la actividad transferasa de los extractos crudos (0,05 ml) con 0,45 ml de sacarosa (300 g/l) en tampón ácido acético-acetato de sodio (0,2 M) a pH 4,5. Se incubaron a 37 °C durante 1 hora. Los productos de la reacción enzimática fueron revelados de acuerdo a Trevelyan (1950) y cuantificados por HPLC. Los estándares de sacarosa, glucosa, fructosa, 1-cestosa y nistosa (Sigma) se usaron a una concentración de 1 g/l.

Una unidad transferasa se define como la cantidad de enzima que transfiere 1 μmol de fructosa por min.

Influencia de factores físicos y químicos sobre la producción de FOS: Se estudió el efecto del pH (3,0; 4,0; 4,5; 5,0 y 5,5); temperatura (20, 25, 30, 35 y 40 °C); concentración de sacarosa (150, 300 y 450 g/l) y tiempo de reacción (60, 90 y 120 min) sobre la producción de FOS, utilizando el extracto crudo del microorganismo seleccionado con alta actividad de transferencia.

Cromatografía de alta presión (HPLC): Las muestras previamente filtradas, se inyectaron en una columna de carbohydrate U-spherogel (Beckman), en un cromatógrafo Gilson. La corrida cromatográfica se realizó a una velocidad de flujo de 0,3 ml/min, a temperatura ambiente y como eluyente se usó una solución de H₂SO₄ (0,01 N). Los picos obtenidos se cuantificaron por un integrador (HP 3396 serie 8) de Hewlett Packard.

Reproducibilidad de los resultados: Todos los ensayos se realizaron por duplicado y los valores reportados son el promedio de 4 valores independientes. Los datos fueron analizados estadísticamente para obtener la desviación estándar con un MS-Excel. Los valores fueron sometidos a un análisis estadístico de variancia (ANOVA), a P<0,05.

RESULTADOS Y DISCUSION

Aislamiento e Identificación: Se aislaron cuatro cepas de hongos filamentosos y dos levaduras, y se identificaron que los mismos pertenecen a los Géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cándida* y *Pichia*. De los *Aspergillus* se identificaron las especies *niger* y *clavatus*, de acuerdo a las características macroscópicas y microscópica. Para diferenciar la especie *niger* de la *carbonarius*, ambas se incubaron en medio de Czapek Dox agar, a 37 °C durante 60 h. En este tiempo la primera desarrolló normalmente sin variar el diámetro de las colonias (67 mm), lo cual indicó que este hongo pertenece a la especie *niger*, ya que a esta temperatura el *carbonarius* crece pobremente.

Las otras dos colonias de hongos filamentosos exhibieron coloración verde oscuro y celeste, respectivamente. Sus características coincidieron con varias especies de los Géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, por lo cual se las identificó como *Aspergillus sp.* y *Penicillium sp.* Los resultados de los estudios macromorfológicos, micromorfológicos y fisiológicos de las levaduras indicaron que corresponden a *Candida versatilis* y *Pichia guilliermondii*.

Producción de invertasa : En la **Figura 2** se observa que los mayores productores de invertasa fueron *Aspergillus niger* IB56 y *Penicillium sp.* Mientras que *Aspergillus sp.*, *A. clavatus*, *C. versatilis* y *Pichia guilliermondii*, produjeron menores concentraciones de la enzima (3,9; 2,0; 1,8 y 0,01 U/ml, respectivamente), a las 48 h de incubación. Por el contrario con invertasa de *A. niger PSSF21* la máxima producción fue a las 96 h de incubación (Reddy et al, 2010) y para la actividad fructosiltransferasa de *A. niger AN166* fue necesaria la adición de 2 g/l de extracto de levadura (Gómez et al, 2005). Estos resultados tienen el inconveniente de incrementar los costos del proceso industrial, debido al tiempo prolongado de producción de la enzima y a la suplementación del medio de cultivo con extracto de levadura.

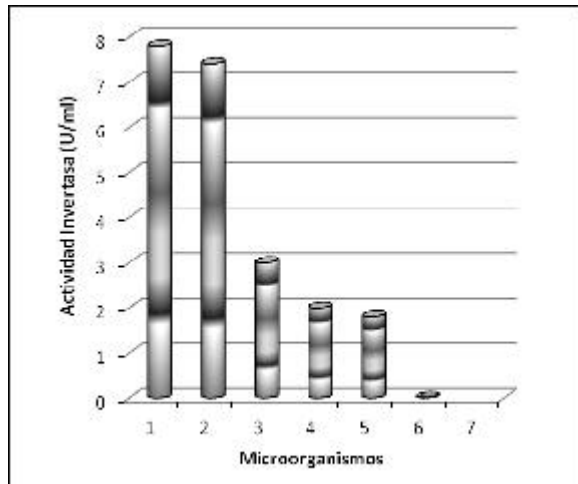


Figura 2: Actividad invertasa obtenida en medio de Czapek por las cepas aisladas de jarabe de glucosa. 1-*Aspergillus niger* IB56; 2-*Penicillium* sp.; 3-*Aspergillus* sp.; 4-*Cándida versatilis*; 5- *Aspergillus clavatus*; 6- *Candida guilliermondii*.

Actividad transferasa y producción de FOS: De los microorganismos aislados, se eligió *A. niger* IB56 por producir invertasa con alta actividad transferasa (5,6 U/ml) respecto a *Penicillium* sp (1,2 U/ml).

Los resultados de la cromatografía en papel de los productos generados por la acción de invertasa de *A. niger* IB56, revelaron manchas cercanas al origen, indicando la presencia de oligosacáridos. Sus R_f coincidían con los R_f de las muestras estándar de 1-cestosa y nistosa, las cuales están formadas por 3 y 4 unidades de monosacáridos. El análisis por HPLC indicó la formación de oligosacáridos cuyos tiempos de elución coincidían con los estándares de 1-cestosa (3') y nistosa (5'). La Figura 3 muestra el perfil cromatográfico de HPLC, el cual indica que el área de la concentración de fructosa disminuyó respecto al área de glucosa, esto sugiere la transferencia de unidades de fructosa por invertasa para la formación de fructooligosacáridos. De acuerdo a Hayazawa et al (1990), las bifidobacterias y *Lactobacillus* metabolizan oligosacáridos de cadenas cortas de 3 a 4 unidades de fructosa. Las mismas actúan inhibiendo el crecimiento de bacterias patógenas mediante la reducción del pH del tubo digestivo y la producción de metabolitos bactericidas.

Efecto del pH sobre la producción de FOS por invertasa de *A. niger* IB56r: La máxima producción de FOS se obtiene a pH 5 (Tabla 1). A pH 3 la producción disminuyó un 71 % respecto al obtenido a pH 5. Esto se debe a la ionización de grupos de la molécula enzimática que trae aparejada la

modificación de su estructura espacial, de manera que dificulta la unión enzima-sustrato (sacarosa). Resultados similares se obtuvieron con invertasa de *Rhodotorula* sp (Hernalsteens and Maugeri, 2008)

Efecto de la temperatura: En la Tabla 1 se observa que a medida que aumenta la temperatura disminuye la producción de FOS. Esto sugiere que la actividad transferasa de *A. niger* IB56 aislado se desarrolla a bajas temperaturas (20°C). Por el contrario invertasa de *Rhodotorula* sp. tiene un óptimo a 65°C (Hernalsteens and Maugeri, 2008), este resultado implica que a nivel industrial se obtienen mayores costos debido a los gastos energéticos por calefacción.

Efecto de la concentración de sacarosa: A concentraciones de 150 y 300 g/l de sacarosa se obtuvo una reducción de FOS del 80 y 70 %, respectivamente. Por el contrario con invertasa de *Candida* sp. se obtuvo un 44 % de FOS (Hernalsteens and Maugeri, 2010). A una concentración de sacarosa de 450 g/l, la producción de FOS disminuyó un 40 %. Este resultado sugiere efectos inhibitorios de la actividad de invertasa por sustrato (sacarosa) y productos (glucosa y fructosa). De acuerdo con la bibliografía la glucosa es un inhibidor no competitivo de la actividad de invertasa en *A. niger* (Rubio and Maldonado, 1995).

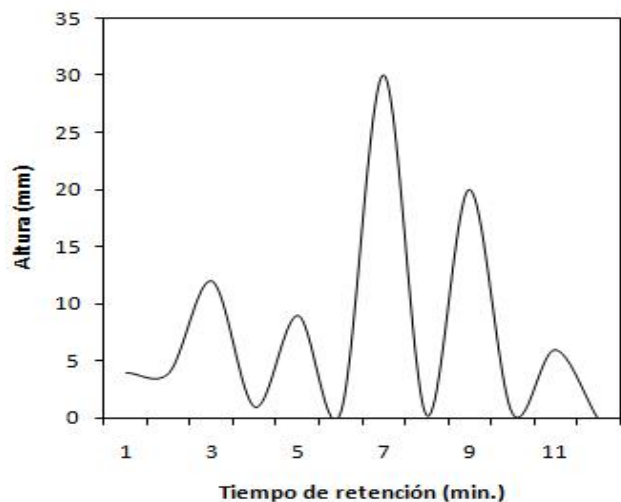


Figura 3: Perfil cromatográfico de los productos obtenidos por la actividad transferasa de invertasa de *Aspergillus niger* IB56. Los experimentos se realizaron con sacarosa (300g/l) en tampón ácido acético-acetato de sodio (0,2M, pH 5,0) a 20°C. Los valores fueron obtenidos a los 60 min. de incubación. Tiempo de elución (min): 3 (1-cestosa); 5 (nistosa); 7 (sacarosa); 9 (glucosa) y 11 (fructosa).

Efecto del tiempo de reacción: Para tiempos de incubación de 60, 90 y 120 min., se obtuvo una producción de FOS de 70; 69 y 65 %, respectivamente, con una concentración de sacarosa de 300 g/l, en la mezcla de reacción. El análisis estadístico mostró que los valores obtenidos no variaron significativamente, $p < 0,05$. Contrariamente *A. japonicus* inmovilizado en gluten requería 3 h para obtener la máxima producción de FOS (Chen and Liu, 1996).

Producción de FOS (g/l)	pH					Temperatura (°C)				
	3,0	4,0	4,5	5,0	5,5	20	25	30	35	40
	30	45	60	105	70	105	70	60	45	15

Tabla 1: Producción de fructooligosacáridos (g/l) por invertasa de *Aspergillus niger* IB56, aislado de jarabe de fructosa, en diferentes condiciones de pH, temperatura en la mezcla de reacción con sacarosa (300g/l).

CONCLUSION

En conclusión, de los microorganismos aislados de jarabe de fructosa se obtuvo una cepa que fue identificada como *Aspergillus niger* IB56, capaz de producir invertasa a las 48 h de incubación, que posee alta actividad transfructosilante (5,6 U/ml). Se determinó que la máxima producción de FOS fue 105 g/l, respecto a la concentración de sacarosa inicial (300 g/l), en las siguientes condiciones de ensayo: pH, 5,0; Temperatura 20 °C y en un tiempo de reacción de 60 min. La enzima tiene especificidad de transferir moléculas de fructosa para formar fructooligosacáridos de 3 y 4 unidades de monómeros, correspondientes a 1-cestosa y nistosa, ingredientes prebióticos necesarios para estimular la flora microbiana probiótica del intestino, las cuales favorecen la salud y la nutrición humana y animal.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Dra. R. Runco, de la Cátedra de Micología. UNT, por su asesoramiento y al Consejo de Investigación de la Universidad Nacional de Tucumán.

REFERENCIAS

Barnett, J.; Payne, R.; Yarrow, D (1990) Yeasts. Characteristics and identification. 2do. Ed. Cambridge University Press, Cambridge

Bernardino, N; Ortíz, N; Martínez, A & Dávila, O (2001) Guava seed protein isolate. Functional and nutritional characterization. J. Food Biochem. 25: 76-89.

Bekers, M; Laukevics, J.; Upite, D; Kaminska, E.; Vigants, A.; Viesturs, U.; Pankova, L. & Danilevics, A. (2002) Fructooligosaccharide and levan producing activity of *Zymomonas mobilis* extracellular levansucrase. Process Biochem. 38:701-706.

Chen, C. & Liu, C. (1996). Production of b-fructofuranosidase by *Aspergillus japonicus*. Enzyme and Microbial Technology. 18: 153-160.

Codón, A.; Gasent-Ramírez, J & Benítez, T (1995) Factors which affect the frequency of sporulation and tetrad formation in *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeasts. Appl. Environ. Microbiol. 61:630-638.

Duca, G.; Nuñez, C. & Rubio, C. (2009) Producción de inulinasa extracelular para la obtención de jarabe de fructosa. Acta Científica Venezolana-Tecnología de Alimentos 60: 36-40.

Gómez, J.; Zuñiga, M.; Silva, E. & Ospina, S. (2005) Producción de fructooligosacáridos (FOS) por tecnología de enzimas. Parte I: Evaluación de aislados nativos de hongos para la producción de FOS. Rev. Colombiana qca y Farmac. 34: 77-91.

Haq, I. & Ali, S. (2005) Invertase production from a hyperproducing *Saccharomyces cerevisiae* strain isolated from dates. Pak. J. Bot. 37: 749-759.

Hayazawa, K.; Mizutani, J.; Wada, K.; Masari, T; Yoshihara, I. & Mitsouka, T (1990) Effects of soybean oligosaccharides on human flora. Microbiol. Ecol. Health disease 3: 293-303.

Hernalsteens, S. & Maugeri, F. (2008) Partial purification and characterization of a fructosyltransferase from *Rhodotorula sp.* Appl. Microbiol. Biotechnol. 79:589-596.

Hernalsteens, S. & Maugeri, F. (2010) Partial purification and characterization of extracellular fructofuranosidase with transfructosylation activity from *Candida sp.* Food Bioprocess technol. 3:568-576.

Klich, M. & Pitt, J. (1988) A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs. Common Wealth

- Scientific Industrial Research. Organization, Division of food Processing, North Ryde.
- Kurtzman, C. & Fell, J.** (1999) The yeasts. A taxonomic study. 4th ed. Elsevier Publishers, Amsterdam
- Mussatto, S.; Rodrigues, L. & Teixeira, J.** (2009) α -fructofuranosidase production by repeated batch fermentation with immobilized *Aspergillus japonicus*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 36:923-928.
- Nelson, N.** (1944) A photometric adaptation of Somogyi method for the determination of glucose. J. Biol. Chem. 153: 375-80
- Pitt, J.** (1991) A laboratory guide to common *Penicillium* species. Commonwealth Scientific Industrial Research Organization, Division of Food Processing, North Ryde.
- Perrin, S.; Grill, J.P. & Schneider, F.** (2000) Effects of fructooligosaccharides and their monomeric components on bile salt resistance in three species of bifidobacteria. J. Appl. Microbiology. 88: 968-974.
- Rajoka, M. & Yasmeen, A.** (2005) Improved productivity of α -fructofuranosidase by a derepressed mutant of *Aspergillus niger* from conventional and non-conventional substrates. World J. Microbiol. Biotechnol. 21:471-478.
- Ramírez, C.** (1982) Manual and Atlas of the *Penicillia*. Elsevier Biomedical Press. Amsterdam.
- Reddy, P.; Reddy, G & Sulochana, M.** (2010) Highly thermostable α -fructofuranosidase from *Aspergillus niger* PSSF21 and its application in the synthesis of fructooligosaccharides from agro-industrial residues. Asian J. Biotechnol. 2: 86-98.
- Rubio, M.C & Maldonado, M.** (1995) Purification and characterization of invertase from *Aspergillus niger*. Curr. Microbiol. 31: 80-83.
- Rubio, M.C.; Runco, R. & Navarro, A.R.** (2002) Invertase from a strain of *Rhodotorula glutinis*. Phytochem. 61:605-609.
- Sedó Masís P.** (2001) Alimentos funcionales: análisis general acerca de las características químico - nutricionales, desarrollo industrial y legislación alimentaria Rev. costarric. salud pública .10:18-19.
- Somogyi, M.** (1945) A new reagent for the determination of sugar. J. Biol. Chem 160:168
- Trevelyan, W, Procter, D & Harrison, J.** (1950) Nature 166: 44
- Uma, C.; Gimathi, D.; Mothulakshmi, C & Gopalakrishnan, V.** (2010) Production, purification and characterization of α -fructofuranosidase from *Aspergillus flavus* in fruit peel waste as substrate. Adv. Biol. Res. 4:31-36.
- Vargas, L.; Pião, A.; Domingos, R. & Carmona, E.** (2004) Ultrasound effect on invertase from *Aspergillus niger*. World J. Microbiol. Biotechnol. 20:137-142.