

## CARACTERIZACIÓN DE UNA $\beta$ -FRUCTOFURANOSIDASA DE *Bifidobacterium animalis*.

José Antonio Morales Contreras, Luz del Alba Broca Cárdenas, María Elena Rodríguez Alegría, Agustín López Munguía, Carolina Esther Melgar Valdés, Ángela Ávila Fernández. DACS-Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Villahermosa, Centro, Tabasco, 86150, [angela.avila@ujat.mx](mailto:angela.avila@ujat.mx)

*Probióticos, prebióticos, bifidobacterias*

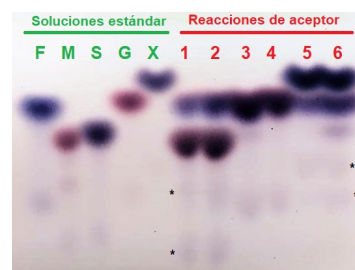
**Introducción.** *B. animalis* se considera un probiótico y es ampliamente utilizada en la industria alimentaria. Posee dos subespecies *lactis* y *animalis*, de esta última, existen pocos estudios relacionados a como metaboliza carbohidratos prebióticos, como las fructanas, en comparación con otros miembros del género *Bifidobacterium* (1). Para asimilar a las fructanas, las bifidobacterias poseen enzimas de tipo  $\beta$ -fructofuranosidasa, las cuales han sido caracterizadas en otras cepas. Por otro lado, se ha descrito que algunas  $\beta$ -fructofuranosidasas son capaces de fructosilar diferentes tipos de carbohidratos (aceptores) formando hetero-oligosacáridos con potencial aplicación industrial (2). A pesar de ello, no se han reportado ensayos de aceptor con  $\beta$ -fructofuranosidasas de origen bifidobacteriano.

En este estudio se describe el aislamiento, expresión, purificación y caracterización de una  $\beta$ -fructofuranosidasa de *B. animalis*. Asimismo, evaluamos su habilidad para realizar transferencia sobre diferentes aceptores.

**Metodología.** Se realizó el aislamiento del gen que codifica para la enzima denominada B.anima1 utilizando oligonucleótidos específicos a partir del ADN genómico de la cepa *Bifidobacterium animalis* ATCC 25527. El gen se clonó en el vector de expresión pET22b(+) y con él se transformó la cepa *E. coli* Rosetta II. La enzima recombinante se produjo induciendo 100 mL de un cultivo de la cepa transformada con 1 mM de IPTG durante 12 h. La enzima se purificó mediante cromatografía de afinidad a iones metálicos y se determinó su actividad enzimática en amortiguador de fosfatos 100 mM pH 6.0 a 35°C. Se determinaron su pH y temperatura óptimos, su estabilidad térmica, su actividad relativa sobre diferentes fructanas (agavina, inulina de alto y bajo peso molecular y fructooligosacáridos) y su capacidad para realizar transferencia sobre diferentes aceptores (maltosa, xilosa y glucosa).

**Resultados.** La enzima B.anima1 compuesta de 532 aminoácidos posee entre un 70 y un 99% de identidad con las  $\beta$ -fructofuranosidasas de bifidobacterias ya caracterizadas y reportadas (3). La temperatura óptima de B.anima1 se encuentra en el rango de 35 a 40°C mientras que su pH óptimo se encuentra en un rango de 6 a 6.5 (Tabla 1). La enzima es estable a 40°C y pierde un 40% de actividad a los 45°C. De los sustratos ensayados, B.anima1 tuvo mayor actividad sobre Raftilosa Sinergy 1 (Orafti) y su actividad sobre sacarosa, Inulina HP (Orafti), levana SacB de bajo peso molecular, inulina de *Leuconostoc citreum* y levana de *Leuconostoc mesenteroides* cepa B-512 fue de 47, 42, 10, 3 y 0.3%, respectivamente. Ensayos preliminares muestran la capacidad de la enzima para realizar transferencia utilizando maltosa y xilosa como aceptores (Fig.1). Los hetero-oligosacáridos tienen potencial aplicación en la industria farmacéutica y de alimentos

funcionales (4) por lo que es importante contar con enzimas que los produzcan eficientemente. Se requiere probar más aceptores y analizar los resultados mediante metodologías como HPLC-IR o HPAEC-PAD para corroborar los resultados y caracterizar a fondo la capacidad de la enzima para transferir residuos de fructosa.



**Fig. 1.** Cromatografía en capa fina de las reacciones de aceptor sobre maltosa (1 y 2), glucosa (3 y 4) y xilosa (5 y 6).

**Tabla 1.** Análisis comparativo de B.anima1 con las  $\beta$ -fructofuranosidasas de bifidobacterias ya caracterizadas.

| Cepa                          | T<br>óptima<br>(°C) | pH<br>óptimo | Porcentaje de<br>identidad con<br>B.anima1 (%) |
|-------------------------------|---------------------|--------------|------------------------------------------------|
| <i>B. animalis</i> ATCC 25527 | 35-40               | 6.0-6.5      | 100                                            |
| <i>B. lactis</i> DSM10140T    | 40                  | 6.5          | 97                                             |
| <i>B. breve</i> UCC2003       | 37                  | 6            | 71                                             |
| <i>B. adolescentis</i> G1     | 59                  | 5.7-8.6      | 72                                             |
| <i>B. longum</i> KN29.1.      | 37-45               | 6.0-6.2      | 71                                             |
| <i>B. longum</i> ATCC 15697   | 50                  | 6.0-6.5      | 71                                             |

**Conclusiones.** B.anima1 tiene características bioquímicas muy similares a las demás  $\beta$ -fructofuranosidasas de bifidobacterias ya reportadas. Su estabilidad térmica es superior a la de otras  $\beta$ -fructofuranosidasas de 518 a 532 aminoácidos y menor a la reportada para la  $\beta$ -fructofuranosidasa de 636 aminoácidos de *B. longum* ATCC 15697 (3). B.anima1 es la primera  $\beta$ -fructofuranosidasa de bifidobacterias cuya capacidad para realizar reacciones de transferencia está siendo probada y los resultados preliminares parecen prometedores.

**Agradecimientos.** Agradecemos el soporte financiero de este trabajo al proyecto SEP-CONACYT 288403 y a la beca CONACYT 884472.

### Bibliografía.

- Egan, M et al. (2018). Appl Microbiol Biotechnol, 102(24), 10645-10663.
- Piedrabuena, D et al. (2016). Appl Microbiol Biotechnol, 100(20), 8769-8778.
- Ávila-Fernández, Á et al. (2016). J Appl Microbiol., 121(1), 263-276
- Míguez, N et al. (2018) ChemCatChem 10.21: 4878-4887.