



PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE LA ELAGITANASA DE *Aspergillus niger* GH1 PRODUCIDA EN CULTIVO EN MEDIO SÓLIDO

Antonio F. Aguilera-Carbó^{1,3} Juan S. Hernández², Marcela C. Mireles², Lilia A. Prado-Barragán²,
Cristóbal N. Aguilar², Christopher Augur⁴ y Ernesto Favela-Torres^{3*}

¹ Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista Satillo, Coah., México

² Depto. de Investigación en Alimentos, Universidad Autónoma de Coahuila. Saltillo, Coah., México.

³ Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad-Iztapalapa, México, DF.

⁴ IRD-Unité Biotrans. Faculté des Sciences de Saint Jérôme, Université Paul Cézanne, Marseille, France.

*Correo electrónico: favela@xanum.uam.mx

Palabras claves: *Aspergillus niger* GH1, fermentación sólida, purificación

Introducción. Recientemente una nueva enzima se ha descrito y asociado a la biodegradación de elagitaninos, esta ha sido llamada elagitanasa o elagitanino acil hidrolasa y cataliza la hidrólisis de los enlaces éster presentes en moléculas de elagitaninos y glucósidos de ácido elálgico (1). Esta enzima posee un gran potencial de aplicación en diversas industrias como la alimentaria, farmacéutica etc. Su principal aplicación se asocia a la producción biotecnológica de ácido elálgico, molécula que posee propiedades biológicas como anti-carcinogénica, anti-oxidante, anti-viral, etc. El objetivo de la presente investigación fue purificar y caracterizar la elagitanasa de *Aspergillus niger* GH1 producida por cultivo en medio sólido.

Materiales y métodos. Para el cultivo en medio sólido (CMS) se usó espuma de poliuretano con extracto acuoso de cáscara de granada y las sales del medio Czapek-Dox y se inoculó con *Aspergillus niger* GH1 siguiendo el protocolo previamente reportado (2). Se recuperó el extracto enzimático por prensado con una solución amortiguadora de citratos 50 mM pH 5, se planteó un protocolo de purificación consistente en una diálisis en membrana de celulosa, ultrafiltración, cromatografía de filtración en gel y cromatografía de intercambio iónico. Adicionalmente, se determinó la influencia de las condiciones de reacción sobre la actividad enzimática, como temperatura, pH y tiempo de reacción.

Resultados y discusión.

El microorganismo fue capaz de expresar la elagitanasa en forma extracelular en CMS utilizando espuma de poliuretano como soporte inerte y elagitaninos de cáscara de granada como inductor. El tiempo de máxima producción fue de 48 horas, tiempo claramente asociado a la mayor liberación de ácido elálgico y la biodegradación de punicalagina, principal componente elagitanino de la granada. La enzima fue dializada y concentrada por UF y finalmente purificada por cromatografía. Se obtuvo un factor de purificación de 7.0 y una actividad específica de 457Umg⁻¹ en la última etapa de purificación (Tabla 1), Se determinó que el tiempo óptimo de reacción para la enzima puros es de 10 minutos (300UL⁻¹). La Elagitanasa actúa en un rango

de pH de 4 a 6. La temperatura es uno de los factores de mayor influencia sobre la actividad enzimática ya que esta se incrementa considerablemente (un 20%) a los 60 °C. Estas propiedades han sido reportadas para otras enzimas producidas por *Aspergillus niger* GH1, mismas que pueden ser aprovechadas para llevar a cabo procesos bajo dichas condiciones. Este estudio aporta conocimiento en la identificación y definición de la participación catalítica de enzimas fúngicas en la degradación de elagitaninos.

Tabla1. Etapas de de purificación de la elagitanasa

Fración	Volumen (mL)	Proteína (mgmL ⁻¹)	Actividad (UmL ⁻¹)	Actividad (U)	Act. Específica (Umg ⁻¹)	Factor de purificación	Rend (%)
EE crudo	1000	0.2605	16.91	16910	65.038	1	100
UF	43.5	1.0039	105.040	4569.25	104.630	1.60	27.020
G25	8	0.1904	0.91	7.28	4.779	0.073	0.043
QXL	6	0.0134	6.117	36.702	457.566	7.035	0.2170

Conclusiones. Bajo las condiciones de cultivo fue posible producir, purificar y caracterizar la enzima elagitanasa producida por *Aspergillus niger* GH1 en CMS. Sin embargo nuevos estudios de caracterización catalítica son necesarias para comprender el complejo sistema enzimático asociado a la hidrólisis de los polifenoles.

Agradecimientos. Al CONACyT vía: proyecto SEP-CONACYT, Ciencia básica-2005-24348.

Referencias

- Aguilera-Carbó A, Augur C, Prado-Barragán LA, Favela-Torres E and Aguilar CN. (2007). Microbial production of ellagic acid and biodegradation of ellagitannins. Appl. Microbiol. Biotechnol. 78, 189-199.
- Aguilera-Carbó A, Hernández JS, Augur C, Prado-Barragán LA, Favela-Torres E and Aguilar CN. (2008) Ellagic acid production from biodegradation of creosote bush ellagitannins by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *Food and Bioprocess Technol.* DOI: 10.1007/s11947-008-0063-0.