



MONITOREO EN LÍNEA DE LA PRODUCCIÓN DE ENZIMAS FRUCTOSILTRANSFERASAS POR *Aspergillus Aculeatus* EN BIORREACTOR

José Juan Virgen-Ortíz, Vrani Ibarra-Junquera, Pilar Escalante-Minakata, Juan A. Osuna-Castro, Universidad de Colima, Laboratorio de Bioingeniería, Coquimatlán, Colima. C.P. 28400. juanvirgen@hotmail.com

Palabras clave: Fructosiltransferasa, monitoreo en línea, *Aspergillus aculeatus*.

Introducción. Los bioprocesos desempeñan un papel clave en la producción de moléculas con propiedades funcionales o terapéuticas de alto valor comercial, como son, enzimas, proteínas, antibióticos y vitaminas entre otros. Para optimizar su producción es necesario controlar las variables más importantes del bioproceso, como son biomasa, sustrato y el producto (1). Por lo que es fundamental encontrar alguna variable fácilmente medible en línea que se pueda asociar con la producción del bioproducto de interés. Por otra parte, los fructooligosacáridos (FOS) son los prebióticos más estudiados y utilizados (2). La síntesis de FOS es catalizada por la acción de enzimas fructosiltransferasas (FT) a partir de sacarosa como sustrato (2).

El objetivo de este trabajo fue asociar la producción de enzimas FT en biorreactor con la evolución dinámica de los sólidos solubles totales (°Brix) monitoreados en línea durante la fermentación, además caracterizar molecular y cinéticamente la FT.

Metodología. Se monitoreó la producción de la FT por fermentación sumergida en biorreactor. Se utilizó la cepa *Aspergillus aculeatus* Lizuka ATCC 36411. La fermentación se corrió a 30°C, 200 rpm y 2.5 L/min de aire, en un biorreactor con volumen de trabajo de 2.5 L con medio de cultivo enriquecido con 20% de sacarosa. El biorreactor se conectó a una computadora personal por un sistema de adquisición de datos basado en Simulink (MathWorks). Se monitoreo en línea el pH, potencial REDOX (ORP), torque, biomasa viable y °Brix. A la par se midió fuera de línea la actividad FT, cuantificando la glucosa (por el método del DNS) que se libera durante la formación de FOS. La FT se purificó por ultrafiltración tangencial, seguida por intercambio iónico (DEAE) y filtración en gel (S-200). Se estimó su peso molecular en condiciones desnaturalizantes y nativas. Finalmente, se determinaron los parámetros cinéticos de la FT purificada.

Resultados. En la Fig. 1, se muestra el comportamiento de los °Brix medidos en línea durante la fermentación, y su relación con la actividad FT. El fenómeno de alta expresión de la actividad FT coincide con el decaimiento de los °Brix, el cual es de tipo sigmoideo. Como se muestra en la Fig. 2A, la FT se purificó a homogeneidad y presentó un peso molecular cercano a 64 kDa (carril 3) en condiciones desnaturalizantes y de 140 kDa (Fig. 2B) estimado en zimograma, lo que sugiera que la FT está ensamblada en su forma nativa como un homodímero.

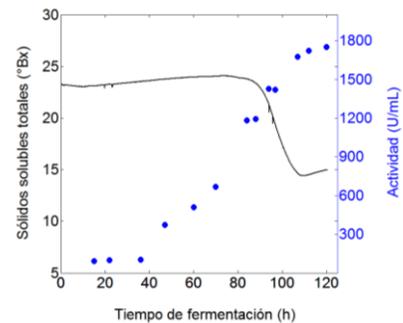


Fig. 1. Monitoreo en línea de los °Brix durante la fermentación de *A. aculeatus*, y la actividad FT medida fuera de línea.

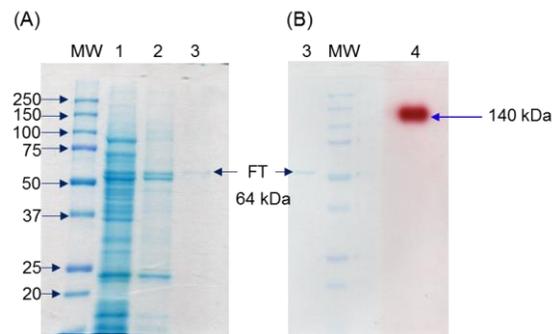


Fig. 2. (A) Perfil electroforético resultante de los procedimientos de purificación, 1: extracto crudo diafiltrado, 2: intercambio iónico y, 3: filtración en gel. (B) Zimograma de actividad FT, 3: FT purificada corrida bajo condiciones desnaturalizantes y reductoras, MW: marcador de peso molecular y, 4: FT nativa.

El pH y la temperatura óptima de la FT fueron 6.0 y 65°C, respectivamente. Bajo estas condiciones, la FT mostró un comportamiento cinético tipo Michaelis-Menten con una K_m y V_{max} de 340 mM y 777 ($\mu\text{mol}/\text{min}$)/mg proteína, respectivamente.

Conclusiones. Se utilizó el monitoreo en línea de los °Brix para asociarlos con la producción de la enzima FT por *A. aculeatus* en biorreactor. Se purificó y caracterizó bioquímicamente la FT.

Agradecimiento. Este trabajo fue financiado por CONACyT (Proyecto ciencia básica No. 169048).

Bibliografía.

- Sampaio PN, Sales KC, Rosa FO, Lopes MB, Calado CR. (2014). *J Biotechnol.* 188:148-157.
- Sangeetha PT, Ramesh MN, Prapulla SG. (2005). *Trends Food Sci Technol.* 16(10): 442-457.