



## IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA FRUCTANASA DE *Bifidobacterium longum* CAPAZ DE HIDROLIZAR FRUCTANAS DE AGAVE.

Esmeralda Cuevas Juárez, Ángela Ávila Fernández, Agustín López-Munguía Canales.

Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biotecnología, Dpto de Ingeniería Celular y Biocatálisis. Cuernavaca 62210. ecuevas@ibt.unam.mx

*Palabras clave:* Prebiótico, fructanasa, agave.

**Introducción.** Los fructo-oligosacáridos (FOS) son polímeros de fructosa con un grado de polimerización de entre 2 y 10 unidades de fructosa. Éstos poseen efecto prebiótico demostrado (1). Los FOS se obtienen por síntesis enzimática o por hidrólisis de los polímeros de fructosa de mayor peso molecular (fructanas). Las plantas de agave sintetizan fructanas (agavinas), las cuales son utilizadas para la obtención de FOS (2), a pesar de la compleja estructura que presentan (3).

El objetivo de este trabajo de investigación fue identificar y caracterizar fructanasas de microorganismos probióticos capaces de hidrolizar agavinas, a fin de explorar la posibilidad de producir FOS a partir de las fructanas del agave, utilizando las enzimas identificadas.

**Metodología.** Mediante una búsqueda en la base de datos del NCBI se identificaron cuatro fructanasas hipotéticas: Blon\_2056 (*B. longum*), Blon\_0787 (*B. longum*), Banan\_06065 (*B. animalis*) y HMPREF9228\_0546 (*B. breve*). Se aislaron, clonaron y expresaron los genes. Se llevaron a cabo reacciones usando cada extracto enzimático y agavinas como sustrato. Se obtuvo un perfil de productos preliminar por TLC. Con base en esto, se eligió la fructanasa Blon\_2056 para una completa caracterización. Se determinó su T y pH óptimos. Se usaron estas condiciones para llevar a cabo reacciones con diferentes tipos de fructanas (1%), y se determinó el perfil de productos por HPAED-PAC.

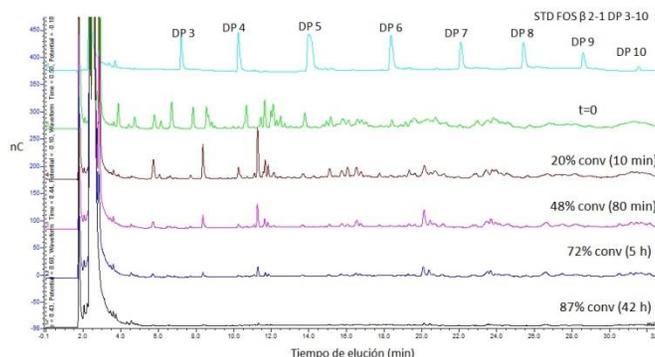
**Resultados.** La enzima Blon\_2056 de *B. longum* fue capaz de hidrolizar fructanas de distintos orígenes (vegetal y bacteriano); así como de distinto tipo de enlace: inulinas ( $\beta$ 2-1) y levanas ( $\beta$ 2-6). Presentó mayor afinidad por aquellas de tipo inulina y de menor peso molecular (Tabla 1). En todos los casos se alcanzaron altos porcentajes de conversión.

Al observar el perfil de productos de la enzima cuando actúa sobre agavinas (Figura 1), se puede observar la liberación progresiva de fructosa, asociada con una disminución en la señal de los picos de menor peso molecular (menor tiempo de elución), y posteriormente de los de mayor peso molecular. Después de 42 horas de reacción, el principal producto es fructosa. Con esto, se puede concluir que la enzima actúa mediante un mecanismo exo, tomando una cadena de agavina e hidrolizando el residuo de fructosa terminal. Lo mismo ocurrió para el resto de los sustratos evaluados.

Cabe destacar que, a altas concentraciones de sacarosa (1M), la enzima fue capaz de llevar a cabo transfructosilación, produciendo 1-kestosa, blastosa, inulobiosa, 6-kestosa, levanobiosa y neo-kestosa (datos no mostrados).

**Tabla 1.** Actividad relativa y conversión alcanzada de la enzima Blon\_2056 sobre diferentes fructanas.

Sustrato	Peso molecular promedio (Da)	Actividad Relativa (%)	Conversión (%)
Raftilosa p95	747.68	100.00	100.00
Raftilosa synergy 1	3220.47	78.01	92.95
Agavina	6200.00	25.46	87.39
Sacarosa	342.29	16.91	89.00
Raftilina HP	5693.26	13.13	84.31
Lev B	8300.00	7.43	95.49
Inulina <i>L. citreum</i>	$3 \times 10^6$	0.89	79.52
Lev A	$3.5 \times 10^6$	0.47	100.00



**Figura 1.** Efecto del tiempo de reacción en el perfil de productos de hidrólisis de agavina al 1% por la fructanasa Blon\_2056 de *B. longum*.

**Conclusiones.** La enzima Blon\_2056 de *B. longum* hidroliza las agavinas de forma exo, liberando fructosa, mas no FOS. Sin embargo, fue capaz de llevar a cabo reacciones de transfructosilación, produciendo los FOS 1-kestosa, blastosa, inulobiosa, 6-kestosa, levanobiosa y neo-kestosa a partir de sacarosa.

**Agradecimiento.** Al CONACyT por la beca otorgada.

### Bibliografía.

- Gibson G, Wang X. (1994). *Food Microbiol.* 11:491-498
- Ávila A, Galicia N, Rodríguez M, Olvera C, López-Munguía A. (2011). *Food Chem.* 129: 380-386.
- Mancilla A, López M. (2006). *J Agr Food Chem.* 54: 7832-7839