



Identificación de enzimas β -fructosidasas en *Lactobacillus casei*

Norma Angélica Gaytán-Saldaña | Edgar León Esparza-Ibarra

Unidad Académica de Ciencias Biológicas | UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ZACATECAS

Juan Alberto Osuna-Castro

Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias | UNIVERSIDAD DE COLIMA

correo-e: gaytanangelica1@gmail.com

Resumen

Los fructanos, polímeros de fructosa, comprenden una excelente fuente para la obtención de fructooligosacáridos (FOS), donde la hidrólisis enzimática parcial resulta ser un proceso ventajoso. El aislamiento de cepas con capacidad para sintetizar enzimas β -fructosidasas para la adquisición de FOS ofrece aportaciones para investigaciones futuras en el contexto de los prebióticos y probióticos. En este estudio a partir de la savia de *Agave* sp. denominada aguamiel, se aisló *Lactobacillus casei* con actividad de β -fructosidasa. La síntesis de enzimas β -fructosidasas de *L. casei* se indujo en medio con fructanos de agave como única fuente de carbono. El extracto proteínico extracelular mostró un halo de actividad enzimática en zimogramas co-polimerizado con inulina; se determinaron por electroforesis desnaturizante dos proteínas con un peso molecular estimado de 105 y 116 kDa.

Palabras clave: agave, aguamiel, electroforesis SDS-PAGE, fructanos.

Introducción

Los fructanos son polímeros de fructosa sintetizados a partir de una molécula de sacarosa (Chalmers, 2005), a la cual las unidades de fructosa se unen adyacentemente mediante enlaces β -fructosil-fructosa. En el reino vegetal se encuentran en el 15% de las angiospermas. En agaves, los fructanos constituyen el 60% del peso seco (Mancilla-Margalli y López, 2006); se emplean para la elaboración de bebidas (tequila, mezcal, bacanora y pulque).

Los FOS son fructanos considerados como prebióticos con propiedades benéficas para el humano; son sintetizados a partir de sacarosa a través de enzimas fructosiltransferasas y/o por la hidrólisis enzimática parcial de fructanos. Las enzimas que hidrolizan los enlaces β -fructosil-fructosa son las β -fructosidasas.

El aislamiento de *Lactobacillus* se ha reportado en gramíneas (Müller y Lier, 1994) y en fermentos de *Agave salmiana* (Escalante-Minakata, 2008). La presencia de *Lactobacillus* en gramíneas y bebidas ricas en fructanos indica que las bacterias asimilan fructanos mediante la producción de enzimas que degradan los polisacáridos a sus monosacáridos constituyentes. La búsqueda de *Lactobacillus spp.* en aguamiel de *Agave sp.* con actividad hidrolítica sobre fructanos fue el propósito de este estudio.

Metodología

Una alícuota de aguamiel se diluyó en caldo MRS (Difco-USA) y se incubó a 45°C (Jaramillo, 2010). Enseguida se realizaron diluciones en caldo MRS y se sembraron en placas con MRS-agar. Las placas se incubaron a 37°C en condiciones aeróbicas y anaeróbicas durante 24-72 h. Fueron seleccionadas las colonias con morfología colonial correspondiente a *Lactobacillus spp.*

Determinación fenotípica y bioquímica

Las cepas fueron determinadas según los criterios de MacFaddin (2003) y el *Manual Bergey* (Garrity *et al.*, 2005) para establecer bacterias ácido lácticas, especialmente del género *Lactobacillus*.

Determinación de actividad

β -fructosidasa. Las cepas seleccionadas se evaluaron con base en su capacidad de fermentar fructanos, siguiendo la metodología de oxidación o fermentación de la glucosa de McFaddin (2003). Se clasificaron cuatro grupos de acuerdo con el carbohidrato empleado: grupo G (glucosa), FA (fructanos de agave), I (inulina de achicoria) y C (control).

Determinación molecular mediante amplificación y secuenciación del gen 16S DNAr

El ADN genómico de las cepas con capacidad de β -fructosidasa fue aislado con el método de Petrick *et al.* (1988). La región 16S DNAr se amplificó utilizando primers universales reportados por Liu *et al.* (2012), el amplicon se envió a secuenciar al Laboratorio de Servicios Genómicos Langebio del CINVESTAV Unidad Irapuato, Guanajuato. Se precisó la especie al comparar la secuencia del 16S DNAr obtenida con las secuencias disponibles en el GenBank.

Identificación de la actividad de β -fructosidasa

La cepa seleccionada se inoculó en medio de cultivo líquido (medio MRS sin la adición de glucosa) con fructanos de agave y/o inulina al 2% (ρ/v) e incubado a 37°C durante 48 h. Las proteínas secretadas al medio se recuperaron por centrifugación, se concentraron con la metodología diálisis-congelación-centrifugación de Virgen *et al.* (2012).

La actividad de β -fructosidasa se identificó mediante SDS-PAGE al 10% (Laemmli, 1970) y en geles de poliacrilamida al 8% co-polimerizado con inulina de achicoria al 2% (p/v). Los extractos se disolvieron en buffer de muestra en condiciones no reductoras, y se sometieron a electroforesis a 60 V.

El SDS-PAGE fue teñido con azul de Coomassie, mientras que el gel co-polimerizado con inulina fue teñido con el sistema ácido periódico-Schiff (PAS-Sigma Aldrich). Como control positivo se usó inulinasa comercial *Frucozyme L* (Sigma) de *Aspergillus niger*.

Resultados y discusión

Aislamiento, selección y determinación fenotípica y bioquímica

Se formó un banco total de seis cepas aisladas sobre medio MRS, a partir de aguamiel tanto en condiciones aerobias como anaerobias. Las cepas tuvieron características del género *Lactobacillus*, según su morfología celular en forma bacilar, su tinción Gram positiva, su capacidad de crecer en ausencia de O_2 , y carencia de endosporas.

Determinación de la actividad de β -fructosidasa

La fermentación de los carbohidratos ensayados produjo la formación de productos ácidos, revelado por el vire de color violeta a amarillo del indicador de pH contenido en el medio. De las seis cepas, la cepa Am3 fermentó glucosa (como se esperaba), fructanos de agave y fructanos de inulina. Este perfil fermentativo Am3 coincide con los resultados de Makras *et al.* (2005), donde *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* fermentó FOS e inulina a ácido láctico y otros metabolitos.

La cepa Am3 al fermentar dichos carbohidratos generó un cambio de color visible en el medio, lo que sugiere que la cepa Am3 asimila fructanos

de agave e inulina a través de la producción de enzimas con actividad β -fructosidasa. *Determinación molecular.* El alineamiento de la secuencia obtenida correspondiente al gen 16S del DNAr, demostró que la cepa Am3 presentó un 100% de identidad con la secuencia del gen 16S del DNAr de *Lactobacillus casei*.



Figura 1. Fermentación de glucosa (G), inulina (I) y fructanos de agave (FA) de la cepa Am3. Control (C).

Identificación de la actividad β -fructosidasa

El extracto de proteínas extracelular inducido con fructanos de agave generó un halo de digestión (figura 2B, carril 2). No obstante, los extractos extracelulares inducidos por glucosa o inulina no exhibieron actividad enzimática sobre el gel co-polimerizado con inulina (figura 2B).

El patrón electroforético del extracto de proteínas extracelular inducido con fructanos de agave (figura 2A, carril 2) mostró dos bandas diferenciales (indicadas con flechas), observadas en el SDS-PAGE, que corresponden justo donde se percibe el halo de actividad de β -fructosidasa (flecha en la figura. 2B, carril 2). Las bandas corresponden a un peso estimado de 105 y 116 kDa. Por lo anterior puede establecerse que halla dos o más bandas de proteína o isoformas con actividad β -fructosidasa.

Aunque *L. casei* fue capaz de crecer en medio con inulina, el extracto enzimático extracelular no mostró actividad enzimática. Contrario a ese resultado, Kuzuwa *et al.* (2012) encontraron que el extracto de proteínas extracelulares de *L. casei* IAM1045 degradan inulina cuando se creció en presencia de ésta.

En otro estudio se obtuvo una β -fructofuranosidasa intracelular en *L. plantarum* cuando se creció en FOS de cadena corta (Saulnier, 2007), lo que señala que las propiedades de las enzimas dependen del sustrato que se usa para inducir las. Esto sugiere la posibilidad de que la inulina induzca en *L. casei* una enzima fructanhidrolasa de pared celular o citoplasmática.

Por su parte, no se notó actividad β -fructosidasa cuando *L. casei* creció en presencia de glucosa. Goh *et al.* (2007) encontraron que *L. casei* 1195 cuando se creció en FOS en presencia limitada de glucosa, la síntesis de β -fructosidasa para la utilización de FOS está sujeta a represión catabólica por glucosa.

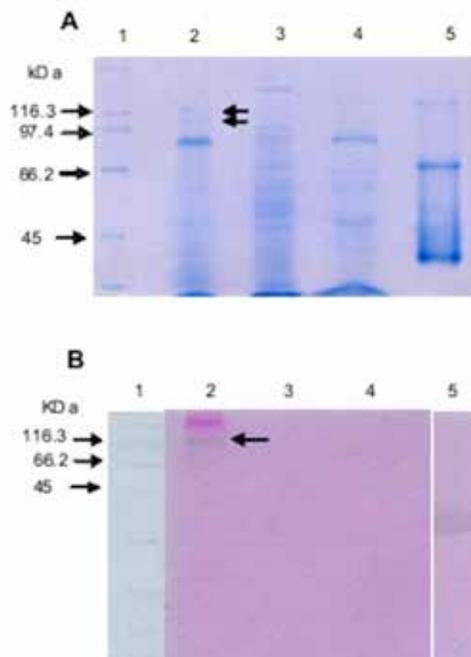


Figura 2. Perfil electroforético de las proteínas extracelulares de *L. casei* en SDS-PAGE (A) y gel de poliacrilamida 10% copolimerizado con inulina 2%, (p/v) (B). Carril 1, marcador de peso molecular Broad Range. Extracto de proteínas extracelular inducido con: fructanos de agave (carril 2), inulina (carril 3), glucosa (carril 4). Inulinasa de *Aspergillus niger* (carril 5).

Conclusiones

A partir de aguamiel se logró aislar *Lactobacillus casei* con actividad enzimática de β -fructosidasa. El extracto de proteínas extracelular de *L. casei* inducido con fructanos de agave reveló actividad enzimática sobre inulina contenida en geles de poliacrilamida.

Agradecimientos

A Lucía Delgadillo Ruiz y Perla Ivonne Gallegos Flores por su valioso apoyo y asesoría en la elaboración de este proyecto.

Referencias

- Chalmers, J., Lidgett, A., Cummings, N., Cao, Y., Forster, J., Spangenberg, G. (2005). Molecular genetics of fructan metabolism in perennial ryegrass. *Plant Biotechnology Journal*, 3(5):459-474.
- Escalante-Minakata, P., Blaschek, H.P., Barba de la Rosa, A.P., Santos, L., De León-Rodríguez, A. (2008). Identification of yeast and bacteria involved in the mezcalt fermentation of *Agave salmiana*. *Letters in Applied Microbiology*, 46(6): 626-630.
- Garrity, G.M., Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T. (2005). *Bergey's manual of systematic bacteriology* (Volumen 2 The proteobacteria). USA: Springer.
- Goh, Y.J., Lee, J.H., Hutkins, R.W. (2007). Functional analysis of the fructooligosaccharide utilization operon in *Lactobacillus paracasei* 1195. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(18):5716-5724.
- Jaramillo, G.D., Meléndez, A.P., Sánchez, M.O.F. (2010). Evaluación de la producción de bacteriocinas a partir de lactobacilos y bifidobacterias. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 1(2):193-209.
- Kuzuwa, S., Yokoi, K., Kondo, M., Kimoto, H., Yamakawa, A., Taketo, A., Kodaira, K.I. (2012). Properties of the inulinase gene levH1 of *Lactobacillus casei* IAM 1045; cloning, mutational and biochemical characterization. *Gene*, 495(2): 154-162.

- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-695.
- Liu, C., Gong, F., Li, X., Li, H., Zhang, Z., Feng, Y., Nagano, H. (2012). Natural populations of lactic acid bacteria in douchi from Yunnan Province, China. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)*, 13(4):298-306.
- MacFaddin, J.F. (2003). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana.
- Makras, L., Van Acker, G., De Vuyst, L. (2005). *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* 8700:2 degrades inulin-type fructans exhibiting different degrees of polymerization. *Applied and Environment Microbiology*, 71(11):6534-6537.
- Mancilla-Margalli, N.A., López, M.G. (2006). Water-soluble carbohydrates and fructan structure patterns from *Agave* and *Dasyliirion* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(20):7832-7839.
- Müller, M., Lier, D. (1994). Fermentation of fructans by epiphytic lactic acid bacteria. *Journal of Applied Bacteriology*, 76(4):406-411.
- Petrick, H.A.R., Ambrosio, R.E., Holzapfel, W.H. (1988). Isolation of a DNA probe for *Lactobacillus curvatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(2): 405-408.
- Saulnier, D.M., Molenaar, D., de Vos, W.M., Gibson, G.R., Kolida, S. (2007). Identification of prebiotic fructooligosaccharide metabolism in *Lactobacillus plantarum* WCFS1 through microarrays. *Applied and Environment Microbiology*, 73(6):1753-1765.
- Virgen-Ortiz, J.J., Ibarra-Junquera, V., Osuna-Castro, J.A., Escalante-Minakata, P., Mancilla-Margalli, N.A., Ornelas-Paz, J.J. (2012). Method to concentrate protein solutions based on dialysis-freezing-centrifugation: Enzyme applications. *Analytical Biochemistry*, 426(1):4-12.