

Determinación indirecta de la pureza de las amiloglucosidasas comerciales usando electroforesis capilar

Vicente F., Scollo D.; *Giraud M.; Mora V.; Sánchez Tuero H.

Laboratorio de Fermentaciones Industriales - Carrera de Ciencia y Tecnología de los Alimentos
Departamento de Desarrollo Productivo y Tecnológico - Universidad Nacional de Lanús. Lanús, Buenos Aires, República Argentina - *mgiraud@unla.edu.ar; laboratoriofi@unla.edu.ar

Resumen

El proceso tecnológico actual para producir la enzima amiloglucosidasa, utilizada luego para obtener glucosa a escala industrial, origina la presencia conjunta de otras enzimas en el producto final, siendo una de ellas la glucosiltransferasa. A partir de glucosa, esta enzima produce isomaltosa -un isómero de maltosa- reduciendo el rendimiento productivo. Es por ello que el objetivo de esta investigación se centró en determinar la pureza de las enzimas comerciales usando electroforesis capilar de zona para cuantificar glucosa, maltosa e isomaltosa en el producto de reacción de las enzimas amiloglucosidasas comerciales. Para comparar se utilizaron enzimas preparadas en nuestro laboratorio a partir de cepas similares a las industriales. Se encontraron valores aumentados de isomaltosa en las dos enzimas industriales, lo que permite deducir que las mismas no fueron purificadas adecuadamente. Las industrias proveedoras de estas enzimas deberían informar en sus protocolos el contenido de glucosiltransferasa, o en su defecto los rindes de glucosa.

Palabras clave: Glucosa, maltosa, isomaltosa, amiloglucosidasa, glucosiltransferasa, electroforesis capilar de zona.

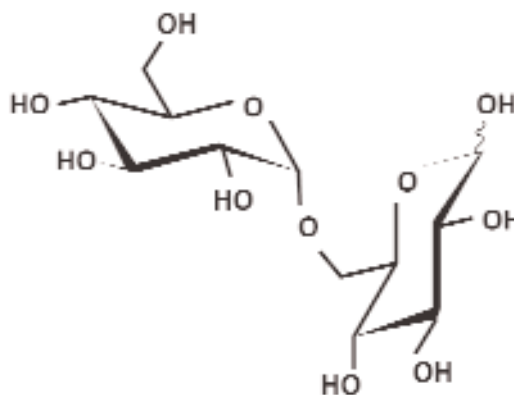
Introducción

El proceso tecnológico actual para producir la enzima amiloglucosidasa, utilizada luego para obtener glucosa a escala industrial, origina la presencia conjunta de otras enzimas en el producto final, siendo una de ellas la glucosiltransferasa. La misma, partiendo de glucosa, produce isomaltosa (Figura 1), un isómero de maltosa, reduciendo por lo tanto el rendimiento en la producción de la misma.

Existen en la producción de amiloglucosidasa dos procedimientos comúnmente usados para evitar la presencia de glucosiltransferasa y otras transferasas en la amiloglucosidasa comercial⁽¹⁻¹¹⁾, ellos son :

a) Seleccionar cepas de hongos y/o especies con baja producción de transferasas.

Figura 1 - Estructura desarrollada de la isomaltosa



b) Usar tratamientos fisicoquímicos adecuados (uso de ácidos, fraccionamiento por precipitación en medio alcohólico, etc.) para purificarla.

Con el fin de verificar la pureza de las enzimas comerciales disponibles en la Argentina se realizó una comparación entre dichos productos y una amiloglucosidasa obtenida en nuestro laboratorio, usando metodologías desarrolladas en el mismo (Vicente *et al.*, 2005). Determinamos que *Aspergillus oryzae* produce menos cantidad de glucosiltransferasa que *Aspergillus awamori* (datos no publicados); dichos cultivos son los usados en los prácticos de la Carrera de Alimentos, Cátedra de Fermentaciones Industriales. Se analizaron los azúcares isomaltosa, glucosa y maltosa por electroforesis capilar de zona. Para ello fueron diseñados dos experimentos que a continuación se detallan:

Experimento 1 - Se partió de hidrolizados de harina de maíz que contenían 10% de malta para que las proteasas presentes en la misma rompan las vacuolas proteicas que rodean a los gránulos de almidón. A dichos hidrolizados se les agregó a continuación las enzimas comerciales y se incubó 48 horas a 60°C, se filtró y concentró y finalmente se determinaron los azúcares presentes. Se utilizó como referencia un cultivo de

Aspergillus oryzae desarrollado en nuestros laboratorios, cultivado en medio sólido, sabiendo por trabajos anteriores que tiene una baja producción de glucosiltransferasa con relación a otros hongos ensayados.

Experimento 2 - a) Preparación del cultivo de los hongos en medio sólido.

b) Incubación de las enzimas comerciales en dextrosa industrial con el fin de que actúen las enzimas transferasas. Se realiza también un blanco de dextrosa comercial.

Material y métodos

Glucosa, maltosa e isomaltosa (98% TLC) son marca Sigma.

Solución de dextrosa comercial con un contenido medio de sólidos solubles totales del 50%.

Enzima amilogucosidasa de dos proveedores diferentes (A y B).

Una muestra de amilogucosidasa obtenida en nuestro laboratorio y rotulada como "desarrollado de *A. oryzae*". Y otra de la misma calidad rotulada como "desarrollado de *A. awamori*".

Agua grado HPLC.

Acido Piridin-dicarboxílico p.a.

CTAB (Bromuro de Cetil Trimetilamonio) p.a.

NaOH p.a.

Instrumento de electroforesis capilar de zona marca Agilent Technologies modelo HPG 1600 AX.

Filtros para jeringa tipo Millex SLCR13NS Millipore de Biopore SA.

Arroz de calidad comercial.

Preparación de las muestras

Experiencia I: las muestras se prepararon hidrolizando parcialmente (dextrinas) harina de maíz con 10% de malta con el objetivo de que las proteasas presentes en la malta rompan las vacuolas proteicas donde está almacenado el almidón. A estos hidrolizados se les agregó a continuación las enzimas comerciales A y B. Se dejó 48 hs a 60°C. Se filtró y concentró. Se determinaron los azúcares presentes por electroforesis capilar de zona. Se utilizó como referencia un cultivo de *Aspergillus oryzae* de baja producción de glucosiltransferasa, obtenido en nuestros laboratorios.

Experiencia II: a) Para preparar el cultivo de los hongos para obtener la enzima amilogucosidasa se partió de 10 g de medio sólido (arroz) con los crecimientos de los hongos *A. oryzae* y *A. awamori*. Estos cultivos se agregaron separadamente a 100 g de dextrosa comercial.
b) Se partió de 10 g de amilogucosidasas comerciales A y B, que se agregaron separadamente a 100g de dextrosa comercial.

El blanco preparado a partir de 100 g de dextrosa comercial fue usado para verificar la presencia/ausencia de isomaltosa.

Todas las muestras citadas se colocaron en la estufa durante 48 horas a 60°C, se filtraron y concentraron convenientemente con la finalidad de asegurar la existencia de los productos de reacción de glucosa. Se obtuvieron los electroferogramas correspondientes.

Condiciones de la electroforesis capilar^(12,13)

Capilar de sílice desnudo de 50 µm de diámetro interno y 80 cm de largo.

Potencial aplicado = 25kV (polaridad negativa) para que los azúcares migren al cátodo.

pH buffer = 12,3 (de baja conductividad, necesaria para mantener una fuerza electroosmótica alta y una baja generación de calor).

Composición del buffer = 1,6 mL de colorante PDC (Acido Piridin-Dicarboxílico); 0,25 mL de CTAB (Bromuro de Cetil Trimetilamonio); 0,65 mL de H₂O HPLC y 100 µL de NaOH 1N.

Presión de inyección = 50 mBares.

Detector por arreglo de diodos.

Longitud de onda usada: la señal está fijada en 450 nm y la referencia en 210 nm (UV indirecta).

Estación procesadora de datos Agilent CHEM32 / Medida de Áreas.

Electroferogramas

Los Tiempos de Retención identifican los analitos. Ellos son: 9,40 min para glucosa; 9,66 min para maltosa y 9,85 min para isomaltosa .

Validación del método

Especificidad: la electroforesis capilar de zona fue realizada inyectando blancos y comprobando que en los tiempos de retención donde aparecían los analitos de interés no había señal o interferencias.

Sensibilidad: el límite de detección para isomaltosa se estableció en 0,1% y para maltosa y glucosa en 0,2%.

Precisión: con relación a la repetibilidad para los estándares y las muestras se obtuvieron valores del CV menores al 5% (los primeros) y un rango de 5-10% para los segundos. En el caso de la reproducibilidad (inyecciones en diferentes días) para estándares y muestras, los valores fueron similares a los anteriores.

Exactitud: se realizaron ensayos de recuperabilidad abarcando el rango de 90-110%.

Linealidad y rango: los estándares de uso diario para ECZ fueron extemporáneos y realizados para isomaltosa y maltosa en concentraciones que cubrieron 0,1-10% y para glucosa 30-80%.

Resultados y discusión

Experiencia I: en la tabla 1 se muestran los datos obtenidos. Se observa claramente que la amiloglicosidasa del proveedor B presenta un contenido de isomaltosa mayor que el del proveedor A y el de la referencia.

	Glucosa	Maltosa	Isomaltosa
Proveedor A	45,1 ± 0,5	8,0 ± 0,1	3,0 ± 0,1
Proveedor B	45,7 ± 0,7	5,0 ± 0,1	7,0 ± 0,1
Lisado <i>A. oryzae</i>	45,0 ± 0,2	2,0	2,2 ± 0,1

Experiencia II: los resultados obtenidos se muestran en la tabla 2. Se observa que la dextrosa comercial contiene isomaltosa. *Aspergillus awamori* presenta mayor cantidad de glucosiltransferasa que *A. oryzae*, corroborando nuestras experiencias al respecto.

Conclusiones

- Se detecta la presencia de isomaltosa en la dextrosa comercial. Su uso en producción de postres y confituras no se ve afectado por estos valores. Los valores de isomaltosa encontrados en todos los experimentos muestran que las enzimas industriales y las producidas en nuestro laboratorio contienen glucosiltransferasa que afectará el rendimiento final de la producción enzimática de glucosa.

- El nivel de glucosiltransferasa es distinto según sea el proveedor comercial.

Los fabricantes de la enzima amiloglicosidasa deberían informar en los protocolos de las enzimas amilolíticas sobre la presencia de otras enzimas, o en su defecto, sobre los rendimientos en glucosa y otros azúcares.

Bibliografía

- (1) N. Kato, S. Suyama, M. Shirokane, M. Kato, T. Kobayashi and N. Tsukagoshi (2000), Novel alpha-glucosidase from *Aspergillus nidulans* with strong transglycosylation activity, *Appl Environ Microbiol.* 68, 1250-1255.
 (2) Kobayashi I., Tozuda M., Hashimoto H., Konda T., Nakano H., Kitahata S. (2003), Purification and characterization of a new

type of alpha-glucosidase from *Paecilomyces lilacinus* that has transglucosylation activity to produce alpha -1,3- and alpha-1,2- linked oligosaccharides, *Biosc. Biotechnol. and Biochem.* 67, 29-35.

(3) Kato N., Murakoshi Y., Kato M., Kobayashi T., Tsukagoshi N., (2002), *Current Genetics* 42, 43-50.

(4) Campa C., Vetere A., Gamini A., Donati I., Paoletti S. (2002), Enzymatic synthesis and characterization of oligosaccharides structurally related to the repeating unit of pullulan, *Biochem. Biophysical Res. Comm.* 297, 382-389.

(5) Vetere A., Gamini A., Campa C., Paoletti S. (2001), Regiospecific transglycolytic synthesis and structural characterization of 6-O-alpha -glucopyranosyl-glucopyranose (isomaltosa), *Biochem. Biophysical Res. Comm.* 274, 99-104.

(6) Volc J., Leitner C., Sedmera P., Halada P. Haltrich D. (1999), Enzymatic formation of dicarbonyl sugar: C-2 oxidation of 1-6 disaccharides gentiobiose, isomaltosa and melibiose by pyranose 2-oxidase from *Trametes multicolor*, *J. Carbohydr. Chem.* 18, 999-1007.

(7) Tibbot B., Henson C., Skadsen R. (1998), Expression of enzymatically active, recombinant barley alpha-glucosidase in yeast and immunological detection of alpha-glucosidase from seed tissue, *Plant Molecular Biology* 38, 379-391.

(8) Hayashi S., Hinotani T., Takasaki Y., Imada K. (1994), The enzymatic reaction for the production of panose and isomaltose by glucosyltransferase from *Aureobasidium*, *Letters in Appl. Microbiol.* 19, 247-248.

(9) Hayashi S., Hayashi T., Takasaki Y., Imada K., (1994), Purification and properties of glucosyltransferase from *Aureobasidium*, *J. Ind. Microbiol.* 13, 5-9

(10) Cantarella L., Nikolov Z., Reilly P. (1994), Disaccharide production by glucoamylase in aqueous ether mixtures, *Enzyme and Microbial Technol.* 16, 383-387.

(11) Monsan P., Paul F., Remaud M., López A., (1989), Novel enzymatic synthesis of oligosaccharides, *Food Biotech.* 3, 11-29.

(12) Altria K. (1990), *Capillary Electrophoresis*, Ed. Humana Press, New York, EE.UU.

(13) Dabrio M. (2000), *Cromatografía y electroforesis en columna*, Ed. Springer-Verlag- Ibérica Cap. 4 pag.91 y Cap. 8, pag. 146.

(14) Vicente F., Scollo D. (2005), Obtención de amiloglicosidasa por fermentación fúngica. Trabajo inédito, Laboratorio de Fermentaciones Industriales, Carrera de Alimentos, Universidad Nacional de Lanús.

	Blanco	Glucosa + <i>A. oryzae</i>	Glucosa + <i>A. awamori</i>	Glucosa + enzima Proveedor A	Glucosa + enzima Proveedor B
Glucosa	40,5 ± 0,3	37,5 ± 0,3	35,1 ± 0,2	39,3 ± 0,3	38,3 ± 0,4
Maltosa	11,0 ± 0,2	10,5 ± 0,2	12,0 ± 0,3	11,3 ± 0,1	10,9 ± 0,2
Isomaltosa	4,5 ± 0,1	6,4 ± 0,2	11,2 ± 0,2	5,8 ± 0,2	7,0 ± 0,2
Relación isomaltosa/glucosa	11,1	17,0	31,9	14,7	18,3