

7. Santos, A.M.P., *Síntesis de oligosacáridos a partir de sacarosa por inulinasa de Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus*. 2003, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Faculdade de Engenharia de Alimentos.
8. Hernalsteens, S. and F. Maugeri, *Synthesis of Fructooligosaccharides Using Extracellular Enzymes From Rhodotorula sp.* Journal of Food Biochemistry, 2010.
9. Rodríguez, M.A., O.F. Sánchez, and C.J. Alméciga-Díaz, *Gene cloning and enzyme structure modeling of the Aspergillus oryzae N74 fructosyltransferase*. Molecular Biology Reports, 2010. **38**(2): p. 1151-1161.
10. Maiorano, A., et al., *Microbial production of fructosyltransferases for synthesis of pre-biotics*. Biotechnology Letters, 2008. **30**(11): p. 1867-1877.
11. Mutanda, T., B.S. Wilhelmi, and C.G. Whiteley, *Response surface methodology: Synthesis of inulooligosaccharides with an endoinulinase from Aspergillus niger*. Enzyme and Microbial Technology, 2008. **43**(4-5): p. 362-368.
12. Baş, D. and İ.H. Boyacı, *Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology*. Journal of Food Engineering, 2007. **78**(3): p. 836-845.
13. Arrizon, J., et al., *Purification and substrate specificities of a fructanase from Kluyveromyces marxianus isolated from the fermentation process of Mezcal*. Bioresource Technology, 2011. **102**(3): p. 3298-3303.
14. Trujillo, R., et al., *Purification and biochemical characterization of a fructanase isolated from Torulaspora delbrueckii*. 7th International congress on biocatalysis, 2014. **P1-0**: p. 30.
15. Nemukula, A., et al., *Response surface methodology: Synthesis of short chain fructooligosaccharides with a fructosyltransferase from Aspergillus aculeatus*. Bioresource Technology, 2009. **100**(6): p. 2040-2045.
16. Álvaro-Benito, M., et al., *Characterization of a β -fructofuranosidase from Schwanniomyces occidentalis with transfructosylating activity yielding the prebiotic 6-kestose*. Journal of Biotechnology, 2007. **132**(1): p. 75-81.
17. Andjelković, U., S. Pićurić, and Z. Vujčić, *Purification and characterisation of Saccharomyces cerevisiae external invertase isoforms*. Food Chemistry, 2010. **120**(3): p. 799-804.
18. Hernalsteens, S. and F. Maugeri, *Properties of thermostable extracellular FOS-producing fructofuranosidase from Cryptococcus sp.* European Food Research and Technology, 2008. **228**(2): p. 213-221.
19. Gutiérrez-Alonso, P., et al., *Biochemical characterization of a β -fructofuranosidase from Rhodotorula dairenensis with transfructosylating activity*. FEMS Yeast Research, 2009. **9**(5): p. 768-773.

ESTUDIO DE LA INDUCCIÓN DE β -FRUCTOFURANOSIDASAS PARA LA SÍNTESIS DE PREBIÓTICOS CON LA LEVADURA *Candida apicola*.

Enrique Ordaz^a, Yesica Muñiz^a, Carmen Martí^b, Lorena Amaya-Delgado^a, Jorge Rodríguez^a, Javier Arrizon^a.

^a Biotecnología Industrial, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C., Normalistas No. 800, Guadalajara, Jalisco, C.P. 44270, México. jparrizon@ciatej.mx

^b Instituto Tecnológico de Tepic, Av. Tecnológico 2595 Fracc. Lagos del Country, Tepic, Nayarit, México

Resumen

Recientemente se han encontrado nuevas fuentes productoras de β -fructofuranosidasa con actividad fructosiltransferasa en levaduras aisladas de la fermentación del mezcal, entre ellas la levadura *Candida apicola*, [1]. En pruebas preliminares de síntesis de FOS con esta levadura utilizando de 0.005 a 0.08 UmL⁻¹ de actividad fructofuranosidasa y con una concentración de sustrato de 300 gL⁻¹ de sacarosa, se obtuvo 70 % en masa de fructooligosacáridos en producto final. Sin embargo, el crecimiento y la inducción de la enzima son poco eficientes, razón por la cual se estudiaron más a fondo estos factores variando la temperatura, el pH y la concentración de sustrato; obteniéndose un máximo de 5.16x10⁹ cel/ml. Posteriormente se estudió la inducción de la enzima usando fructanos de agave como inductor, variando la fuente de nitrógeno y la temperatura, obteniendo un máximo de actividad β -fructofuranosidasa de 0.149 UmL⁻¹.

Introducción

La sociedad se muestra cada vez más interesada en el mejoramiento de la salud mediante mejores dietas como el uso de productos naturales y alimentos funcionales. Debido a esto, actualmente se ha mostrado un interés creciente en ingredientes o aditivos alimentarios que afecten positivamente la microbiota intestinal y por tanto mejorando la salud del consumidor. Esto ha provocado que se preste especial atención a probióticos y prebióticos principalmente [3]. Un prebiótico es un alimento no digerible que estimula el crecimiento selectivo de ciertos microorganismos en el colon que mejoran la salud del consumidor, el cual no es digerido en la parte superior del tracto intestinal, estimula o activa un grupo selectivo de bacterias benéficas en el colon [2]. Existe una variedad de carbohidratos que han sido considerados como prebióticos puesto que no son digeridos en el tracto intestinal. Los FOS cumplen con todos los requisitos necesarios, por lo que actualmente son reconocidos y usados como ingrediente prebiótico [2]. Los FOS comerciales son β -D fructanos de cadena corta formados principalmente por 1-kestosa, nistosa y 1-fructofuranosil nistosa y algunos otros con un grado de polimerización menor a 10, en el que las unidades fructosil están unidas mediante enlaces β (2-1). Algunas de estas cadenas inician con una molécula de glucosa debido a que su síntesis empieza por la transferencia de fructosa entre dos moléculas de sacarosa [12]. Los FOS se pueden obtener a partir de hidrólisis de inulina o mediante la síntesis enzimática a partir de sacarosa. Siendo la hidrólisis enzimática más eficiente que la hidrólisis química ya que no se generan productos indeseables [11]. Los FOS se producen actualmente de manera comercial usando enzimas provenientes de hongos principalmente. Existen relativamente pocos estudios sobre la producción de FOS a partir de enzimas de levaduras y la mayoría de estos presentan rendimientos bajos de producción [5]. Las levaduras del género *Candida* tienen una importante capacidad para usar diferentes tipos de sustratos como fuentes de carbono, por lo que diferentes cepas de esta levadura han sido estudiadas a lo largo de los años para su uso en diferentes áreas como la biodegradación de desechos o subproductos industriales y agrícolas [5].

Estudios recientes han reportado actividad fructanasa y fructosiltransferasa en *Candida apicola*, presentando mayor actividad hidrolítica sobre inulina y fructanos de agave que otros microorganismos estudiados, lo cual indica que se podría tratar de cepas productoras de enzimas con diferente afinidad por sustrato [1]. Es por esto que el estudio de nuevas enzimas para la producción de FOS es de gran importancia por lo que en este trabajo se estudió la inducción de una enzima β -fructofuranosidasa con actividad fructosiltransferasa producida por la levadura *C. apicola* para la síntesis de prebióticos.

Metodología

1.- Crecimiento de la levadura

Para encontrar las condiciones de crecimiento adecuadas para la levadura se realizó un diseño experimental 2^k en el que se variaron cuatro factores. Puesto que el objetivo del experimento no se trataba de encontrar las condiciones óptimas, si no investigar que influye más estadísticamente en el crecimiento de la levadura, se realizaron variaciones relativamente amplias en los niveles de algunos de los factores.

En el diseño factorial utilizado (Tabla 1) se varió la temperatura, pH, volumen de matraz (aireación) y concentración de sustrato, midiendo como variable de respuesta la población (cel mL^{-1}) máxima obtenida en una fermentación de 72 horas, usando glucosa como fuente de carbono.

Tabla 1.- Diseño experimental 2^4 , para crecimiento de población

Factor	Nivel bajo	Nivel alto
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	22	35
pH	3.5	5.5
Volumen de matraz (mL)	125	500
Concentración de sustrato (gL^{-1})	20	200

El medio de cultivo usado para los experimentos fue un medio químicamente definido cuya composición se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2.- Composición de medio de cultivo para crecimiento

Compuesto	g L^{-1}	Compuesto	g L^{-1}
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3.00	Oligoelementos	
KH_2PO_4	3.00	$\text{MgCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$	4.12E-01
Na_2HPO_4	1.49	ZnCl_2	1.92E-02
Ácido glutámico	1.00	$\text{CuCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$	6.15E-04
Vitaminas		$\text{MnCl}_2, 4\text{H}_2\text{O}$	4.45E-03
Ácido aminobenzoico	1.00E-03	$\text{CoCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$	5.00E-04
Myo-inositol	1.25E-01	CaCl_2	1.74E-02
Ácido nicotínico	5.00E-03	$\text{FeCl}_2, 4\text{H}_2\text{O}$	1.17E-02
Ácido pantoténico	5.00E-03	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}, 4\text{H}_2\text{O}$	3.60E-04
Piridoxina	5.00E-03	H_3BO_3	3.00E-03
Tiamina HCl	5.00E-03		
Biotina	1.20E-05		

2.- Inducción de la enzima

Como se muestra en la Tabla 2, se realizaron experimentos de inducción variando la temperatura y fuente de nitrógeno. La fuente de carbono e inductor fueron fructanos de agave a 50 gL^{-1} .

Tabla 2.- Diseño experimental para la inducción de la enzima

Factor	Niveles	
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	20	30
Fuente de nitrógeno	Urea	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

La actividad β -fructofuranosidasa se calculó midiendo los azúcares reductores liberados por tiempo y por cantidad de enzima; usando la metodología descrita por Arrizon y col. (2012).

3.- Síntesis de FOS

Se realizaron reacciones con el extracto enzimático de *C. apicola* y soluciones concentradas de sacarosa (300 gL^{-1}) a pH 6.5 y 40°C . Las reacciones fueron monitoreadas mediante HPLC (HPX 87C-Biorad, 87°C , 0.5 mL min^{-1}).

Resultados

Como se puede ver en la Figura 1, la temperatura y la concentración de sustrato y su respectiva interacción tuvieron un efecto significativo sobre el crecimiento, alcanzando un máximo de $5.16 \times 10^9 \text{ cel mL}^{-1}$, a 22°C y 200 gL^{-1} de sustrato. Es sabido que la mayoría de las levaduras tienen una temperatura óptima de crecimiento cercana a los 30°C . Sin embargo, en este caso se encontró que esta levadura crece mejor a 22°C siendo un tanto inusual para este tipo de microorganismos. De la misma manera, en los experimentos realizados se observó un mejor crecimiento a 200 gL^{-1} , siendo una concentración hasta 10 veces mayor a lo reportado comúnmente para estos microorganismos.

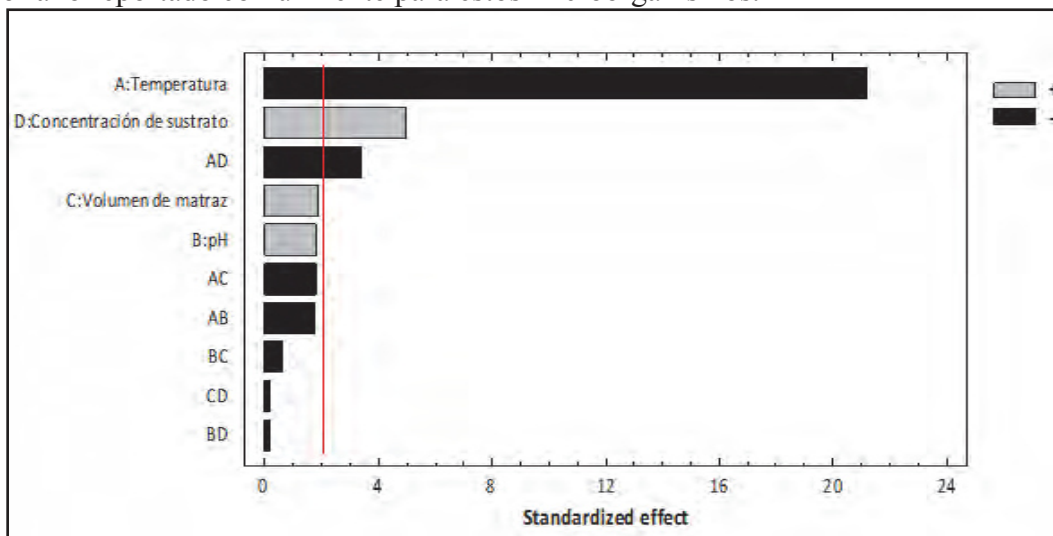


Figura 1.- Diagrama de Pareto del efecto estandarizado para población (cel mL^{-1}).

Estos resultados son interesantes considerando que esta cepa de *C. apicola* fue aislada de la fermentación de mezcal, en la que las temperaturas durante la fermentación pueden superar incluso los 30°C . Por otro lado, esta especie ha sido aislada con anterioridad en miel de abeja, en Canadá, en donde las condiciones de temperatura son significativamente menores y la concentración de sustrato

puede superar los 500 gL^{-1} [8–10]. Esto podría explicar los resultados observados en los experimentos que se llevaron a cabo.

Figura 2.- Cinética de crecimiento *C. apicola*, a las mejores condiciones del diseño experimental.

Los experimentos realizados mostraron que, en el rango estudiado, la temperatura no tiene un efecto en la producción de enzima. Sin embargo los niveles de producción de enzima aumentan de 0.081 a 0.135 U mL^{-1} cuando la fuente de nitrógeno cambia de sulfato de amonio a urea (Figura 4). Esto se debe a un mejor crecimiento de la levadura probablemente debido a una mejor asimilación de la urea como fuente de nitrógeno (Figura 3).

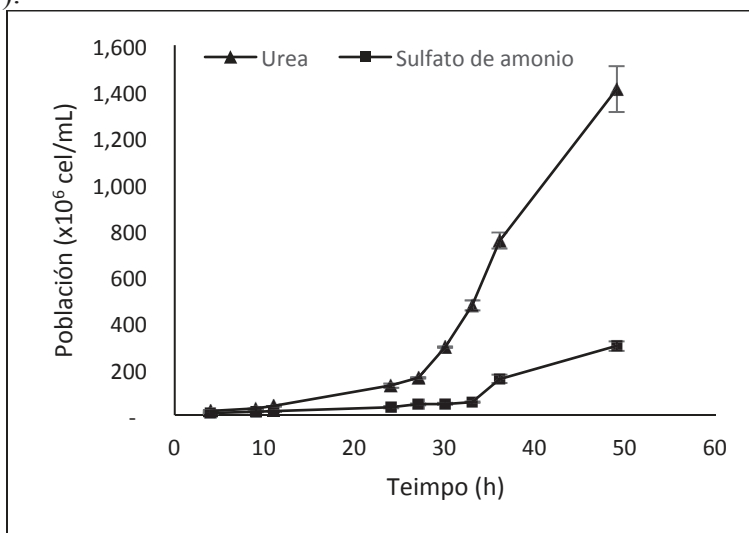


Figura 3.-Cinética de crecimiento *C. apicola* con diferentes fuentes de nitrógeno..

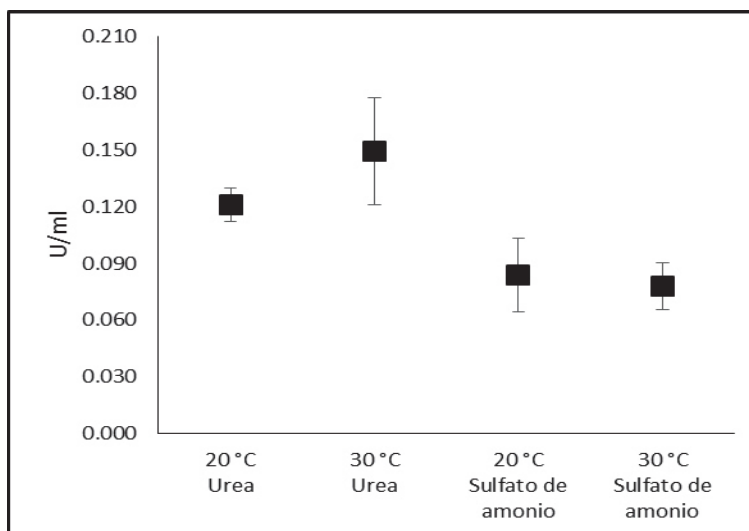


Figura 4.-Actividad máxima B-fructofuranosidasa para las diferentes condiciones de inducción.

Durante 144h de reacción, la composición del medio de reacción se monitoreó mediante HPLC. Como se muestra en la cinética de la reacción en la Figura 4, observamos una acumulación constante de FOS mientras que la sacarosa residual disminuye casi en su totalidad. Existe una pequeña acumulación de fructosa debido a reacciones de hidrólisis mientras que la glucosa se acumula en mayor cantidad. Esto es esperado puesto que las cadenas de FOS son elongadas en residuos fructosil.

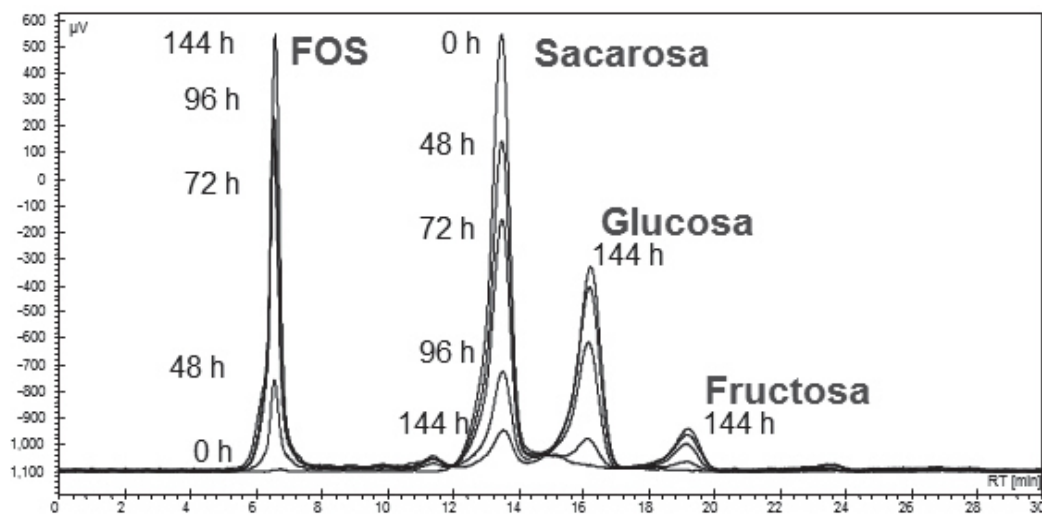


Figura 4.- Cinética de síntesis de FOS medida en HPLC utilizando extracto enzimático de la levadura *Candida apicola* (300 g/l de sacarosa (pH 6.5 y 40 °C)).

El rendimiento de producción de FOS obtenido con el extracto enzimático de la levadura *C. apicola* a partir de sacarosa es de alrededor de 200 gL^{-1} (70 % de transfructosilación). Estos resultados son similares a los ya reportados para otras levaduras (*Candida* sp., *Cryptococcus* sp., *Rhodotorula* sp.) con rendimientos de producción en rangos de $200\text{-}300 \text{ gL}^{-1}$ [4–6].

Conclusiones

Siendo *C. apicola* una levadura osmotolerante, representa una posible fuente interesante de enzimas con propiedades catalíticas de interés para la síntesis de FOS puesto que estas reacciones se llevan a cabo a concentraciones altas de sustrato a las que las enzimas comúnmente se ven inhibidas.

El extracto enzimático de la levadura *C. apicola* es capaz de realizar la síntesis de FOS a partir de sacarosa obteniéndose alrededor del 70 % de transfructosilación. Lo cual indica que la síntesis de prebióticos mediante el uso de esta enzima puede ser factible. Los tiempos de reacción son lentos en comparación a otras enzimas de levaduras que logran los mismos resultados en tiempos menores (48-72h); sin embargo en este caso se trata de una caracterización preliminar con extracto enzimático crudo. Por otro lado, se encontraron las condiciones preliminares de crecimiento e inducción de la enzima para una posterior optimización de la producción de esta. De esta forma se podrá proceder a la purificación y caracterización bioquímica de la enzima para obtener mejores resultados de producción de prebióticos.

Referencias