

EFFECTO DEL PH Y DE LA RELACIÓN SUSTRATO ENZIMA SOBRE LA SÍNTESIS DE FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS CON UNA β -FRUCTOFURANOSIDASA PURIFICADA DE *Torulaspota delbrueckii*

Raymundo Trujillo^a, Enrique Ordaz^a, Jorge Rodríguez^a, Lorena Amaya^a, Javier Arrizon^{a*}.

^aCentro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C., Avenida Normalistas #800, Col. Colinas de la Normal, 44270 Guadalajara, Jalisco, México.

*Correo electrónico de autor de contacto: jparrizon@ciatej.mx, jparrizon@hotmail.com

Resumen

Un diseño experimental superficie de respuesta fue utilizado para observar el efecto que presentan dos factores, el pH y la relación sustrato enzima (S/E) en la síntesis de Fructooligosacáridos de cadena corta (FOS) usando una β -fructofuranosidasa purificada de *Torulaspota delbrueckii*. Esta enzima presenta mayor actividad fructosiltransferasa a una concentración de sacarosa inicial de 700 g/l y temperatura de 45°C. El modelo ($p < 0.05$) se ajustó en un 95.3 %, el cual nos muestra que ambos factores (pH y S/E) presentan efecto significativo en la síntesis de FOS, dando como resultado un pH óptimo de 5.9 y la relación S/E de 0.95 (g sacarosa / UmL⁻¹) con una producción de FOS de 30 gL⁻¹.

1. Introducción

El término Fructooligosacáridos (FOS) es usado hoy en día para oligómeros de fructosa, que contienen una unidad de glucosa y de 2 a 4 unidades de fructosa unidas por un enlace glicosídico β -2,1 [1]. Estos FOS constituyen una importante clase de carbohidratos debido a la β -configuración del C2 anomérico en sus monómeros de fructosa, la inulina y la oligofructosa son resistentes a la hidrólisis por enzimas digestivas humanas, debido a esto, los fructooligosacáridos son clasificados como oligosacáridos no digeribles lo que los hace que actúen como prebióticos [2, 3]. De las principales características prebióticas que presentan es que no son cariogénicos, brindan resistencia a infecciones, son de bajo dulzor y brindan una baja energía calórica, mejoran la absorción de minerales en el tracto gastrointestinal, no son digeribles lo que ayuda a estimular el crecimiento y desarrollo de la microflora gastrointestinal también llamada probiótica [4].

Los FOS de grado alimenticio comercialmente pueden ser obtenidos de diversas fuentes o procesos industriales [5]: En primer caso tenemos que se encuentran naturalmente en distintos alimentos de consumo humano como pueden ser: Fructanos (inulina), Oligosacáridos de la Soya como Rafinosa y estequiosa por extracción directa del concentrado de Soya. De igual manera existe la hidrólisis o síntesis química y enzimática de oligosacáridos.

La hidrólisis y síntesis enzimática de FOS es llevada a cabo por enzimas fructosiltransferasas, también conocidas como β -fructofuranosidasas debido a una actividad secundaria obtenida a altas concentraciones de sacarosa. Estas enzimas han sido reportadas principalmente de hongos del género *Aspergillus* y *Aureobasidium* [6]. En bacterias incluyen estudios en *Bacillus macerans*, *Zymomonas mobilis*, *Lactobacillus reuteri*, a pesar del conocimiento que se tiene sobre la producción de invertasas, poco se puede encontrar de levaduras productoras de enzima capaces de producir FOS [7, 8]. De las levaduras reportadas para la producción de enzimas capaces de sintetizar FOS son del género *Kluyveromyces*, *Rhodotorula sp*, *Candida*, *Saccharomyce* [6].

Arizon et al (2012) reportó por primera vez que *Candida apícola* y *Torulaspota delbrueckii* son levaduras con potencial para la producción de enzimas capaces de sintetizar FOS.

El mecanismo de acción de las fructosiltransferasas depende de la fuente de extracción, por ejemplo en vegetales que contienen pequeñas cantidades de FOS tales como la cebolla, la alcachofa de Jerusalén, el ajo, espárragos, plátanos, centeno, trigo y tomates, para llevar a cabo esta reacción se necesita de una serie de enzimas que actúan de manera secuencial, casi siempre una enzima realiza la síntesis del precursor mientras que otra realiza la elongación de la polimerización. En el caso de los microorganismos una sola enzima realiza esta reacción, esta actúa sobre la sacarosa en una reacción no-proporcional, en donde una molécula de sacarosa sirve como donador y otra como aceptor [9, 10].

Debido al creciente interés de la industria alimenticia por los fructooligosacáridos, se han buscado nuevas enzimas con capacidad catalítica de síntesis de FOS, así como la respectiva optimización de su aplicación en procesos enzimáticos constituye una ventaja tecnológica.

Existe un gran número de reportes que han analizado el efecto de la temperatura, el pH, y la concentración de sustrato sobre la síntesis de FOS, sin embargo se han utilizado metodologías clásicas que consumen mucho tiempo y recursos, razón por la cual se utilizó para este estudio un diseño experimental “Superficie de Respuesta”, el cual es definido como un método estadístico el cual utiliza datos cuantitativos de apropiados diseños experimentales para determinar y resolver simultáneamente ecuaciones multivariante que especifican el producto óptimo para un conjunto de factores a través de modelos matemáticos [11, 12]. En este caso particular, se utilizaron dos factores significativos para la síntesis de FOS, pH y relación sustrato/enzima (S/E) para encontrar las mejores condiciones de síntesis de FOS a partir de sacarosa utilizando una enzima purificada a partir de *Torulaspota delbrueckii*.

2. Metodología

2.1 Materiales

La β -fructofuranosidasa purificada de *Torulaspota delbrueckii*, levadura que pertenece al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología del Estado de Jalisco (Guadalajara, México). Sacarosa, ácido dinitrosalicílico (DNS) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Todos los reactivos utilizados fueron grado analítico.

2.2 Actividad enzimática

Para determinar actividad enzimática mediante la medición de la cantidad de fructosa liberada del sustrato (1 % p/v) disuelto en tampón acetato (pH 5, 100 mM). La actividad enzimática se determinó de la siguiente manera: 50 μ l de la solución de enzima fue adicionada a 50 μ l de sustrato (sacarosa), se incubaron por 15 minutos a 50 °C. La reacción fue detenida adicionando 100 μ l de DNS y llevada a ebullición por 5 minutos, una vez pasada el tiempo de reacción se colocan en hielo. La absorbancia se midió utilizando un lector de microplaca a 540 nm [13]. Una unidad enzimática fue definida como la cantidad de enzima que libera un μ mol de azúcares reductores por minuto.

2.3 Síntesis enzimática de FOS usando una metodología de superficie de respuesta

Se realizó un diseño de superficie de respuesta con dos puntos al centro, para estudiar el efecto de pH (5.5-7.5) y relación sustrato enzima (0.6-1.8) sobre la síntesis de FOS, la serie de experimentos desarrollados se muestran en la tabla 1. Los experimentos fueron realizados en un Envirogenie a 45°C y una concentración de sacarosa inicial de 700 g/l en un volumen de 5 ml. Las reacciones fueron analizadas en un HPLC Agilent 1220 con un detector de índice de refracción (IR) Agilent 1260, la columna utilizada fue Aminex (HPX-87C, 250 x 4 mm, BioRad). El diseño fue analizado utilizando Statgraphics Centurion XVI.

Tabla 1. Condiciones de pH y relación Sustrato/Enzima (S/E) para cada experimento

Experimento	pH	S/E
1	5.50	0.60
2	7.50	0.60
3	5.50	1.80
4	7.50	1.80
5	5.09	1.20
6	7.91	1.20
7	6.50	0.35
8	6.50	2.05
9	6.50	1.20
10	6.50	1.20

3. Resultados

A pesar de que en estudios previos se encontró que la enzima purificada de *Torulapora delbrueckii* tiene una alta actividad hidrolítica sobre sacarosa con una $k_{cat} = 3.9 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ [14], la enzima fue capaz de realizar reacciones de transfructosilación a alta concentración de sacarosa. De manera preliminar se encontró que esta enzima presenta mayor actividad de transfructosilación son a 45 °C y una concentración de sacarosa inicial de 700 g/l, por lo que estos factores se mantuvieron constantes. Los dos factores variados fueron pH (5.5-7.5) y relación S/E (0.6-1.8). El modelo estadístico de superficie de respuesta ($p < 0.05$, $R^2 = 0.95$), nos predijo un pH de 5.97 y una relación S/E de 0.95 (figura 1).

El diagrama de Pareto que se muestra en la figura 2, indica que ambos factores son significativos en la síntesis de FOS, el pH mostro un mayor efecto significativo, a pH mayor a 7 la enzima ya no es activa. Mientras que, en el rango de pH de 5.5. a 6.5 se observó el máximo de actividad , estas condiciones son similares a las encontradas por otros autores en la síntesis de FOS, las temperaturas de reacción van desde 40-60 °C, el rango de pH es de 5.5 a 6.5, la concentración inicial de sacarosa es de 400-600 g/l tal como lo reportan en diferentes trabajos realizados con distintas levaduras (*Schwanniomyces occidentalis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces Marxianus*, *Rhodotorula dairenensis*, *Cryptococcus sp.*) [13, 15-19].

Con anterioridad se determinó la temperatura óptima y pH óptimos de hidrólisis de sacarosa para la enzima purificada (40 °C y pH 5.5), por lo que se puede observar que la transfructosilación requiere un pH más cercano a la neutralidad y un incremento de temperatura para desplazar el equilibrio hacia la síntesis.

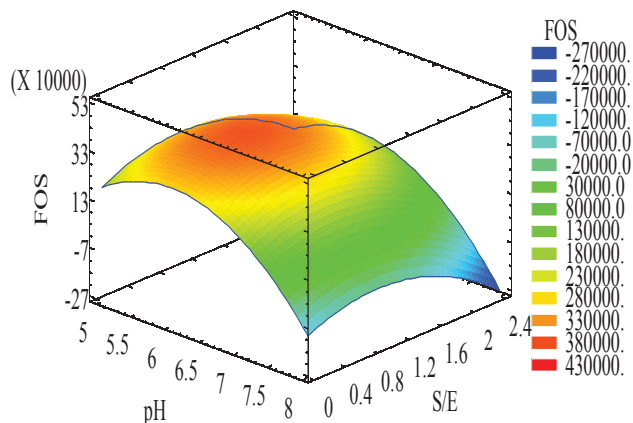


Figura 1.- Superficie de respuesta estimada en área de pico cromatográfico de FOS en función de pH y relación S/E, después de 84 horas de reacción.

$$(FOS = -3.38663E6 + 1.22171E6 * pH + 224812. * S/E - 101672. * pH^2 - 7312.5 * pH * S/E - 94990.9 * S/E^2)$$

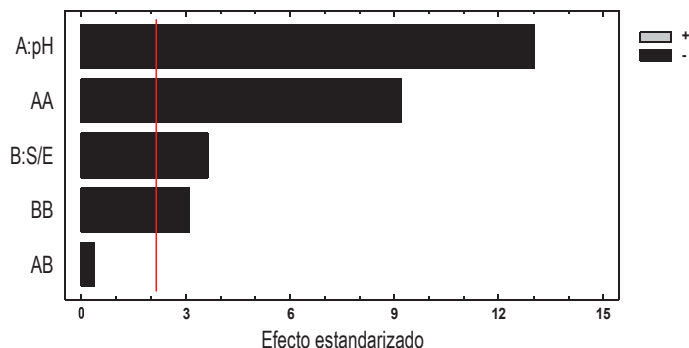


Figura 2.- Diagrama de Pareto para el efecto estandarizado

4. Conclusiones

Fue posible desplazar el equilibrio la reacción enzimática de hidrólisis hacia la transfructosilación de una β-fructofuranosidasa aislada de *Torulaspora delbrueckii* variando la proporción sustrato/ enzima y el PH. Las mejores condiciones de producción de FOS se alcanzaron con pH de 5.9 y la relación S/E de 0.95 (g sacarosa / UmL⁻¹) con una concentración máxima de FOS de 30 gL⁻¹ de FOS. Por lo tanto el producto resultante puede ser utilizado industrialmente como un edulcorante enriquecido con FOS. Para su utilización como edulcorante funcional, se requiere probar su actividad prebiótica *in vitro* o en simulador del tracto digestivo humano.

5. Bibliografía

1. Silva, M.F., et al., *Enzymatic synthesis of fructooligosaccharides by inulinases from Aspergillus niger and Kluyveromyces marxianus NRRL Y-7571 in aqueous-organic medium*. Food Chemistry, 2013. **138**(1): p. 148-153.
2. Chen, J., et al., *Biochemical characterization of an intracellular 6G-fructofuranosidase from Xanthophyllomyces dendrorhous and its use in production of neo-fructooligosaccharides (neo-FOSs)*. Bioresource Technology, 2011. **102**(2): p. 1715-1721.
3. Roberfroid, M.B., *Chicory fructooligosaccharides and the gastrointestinal tract*. Nutrition, 2000. **16**(7): p. 677-679.
4. Moore, N., et al., *Effects of fructo-oligosaccharide-supplemented infant cereal: a double-blind, randomized trial*. British Journal of Nutrition, 2003. **90**(03): p. 581-587.
5. Swennen, K., C.M. Courtin, and J.A. Delcour, *Non-digestible oligosaccharides with prebiotic properties*. Critical reviews in food science and nutrition, 2006. **46**(6): p. 459-471.
6. Hernalsteens, S. and F. Maugeri, *Purification and characterisation of a fructosyltransferase from Rhodotorula sp.* Applied Microbiology and Biotechnology, 2008. **79**(4): p. 589-596.