

PRODUCCIÓN DE FRUCTANHIDROLASAS FÚNGICAS CON ESPECIFICIDAD SOBRE FRUCTANOS DE AGAVE

Genaro Velázquez-Coronado^a, Juan Carlos Mateos-Díaz^a, Jose Luis Flores^b, Rosa María Camacho^{a*}

^a Unidad de Biotecnología Industrial, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. Av. Normalistas 800, Col. Colinas de la Normal, CP 44270, Guadalajara, Jal., México.

^b Unidad de Tecnología Alimentaria, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. Av. Normalistas 800, Col. Colinas de la Normal, CP 44270, Guadalajara, Jal., México.

* rcamacho@ciatej.net.mx

Resumen.- La hidrólisis enzimática de fructanos de agave para la obtención de jarabes de fructosa y fructooligosacaridos (FOS) es de gran interés en la industria de alimentos y suplementos alimenticios, por lo que la búsqueda de enzimas con preferencia por hidrolizar este tipo de fructanos ha sido relevante en los últimos años. El hongo filamentoso F1 fue estudiado por su capacidad para producir fructanhidrolasas con mayor especificidad sobre fructanos de agave. Se evaluó el efecto sinérgico de las endoinulinasas del coctel comercial Fructozym 960® con las exofructanhidrolasas producidas por el hongo F1. Los perfiles de hidrólisis analizados por HPLC mostraron un porcentaje mayor de hidrólisis por el uso combinado de ambos extractos, tal como se había reportado para la inulina. A su vez, se comprobó que la estructura de los fructanos que son utilizados como fuente de carbono durante la fermentación tiene influencia en el perfil de producción de las fructanhidrolasas.

Introducción

Los fructanos son polisacáridos que consisten mayormente de unidades de fructosa con generalmente una glucosa terminal. Se clasifican de acuerdo al tipo de enlaces que presentan y por su grado de ramificación en [1] inulinas (estructura lineal con enlaces β -2,1), levanos (estructura lineal con enlaces β -2,6), fructanos mixtos (estructura ramificada con enlaces β -2,6 y β -2,1) y fructooligosacáridos (fructanos oligoméricos lineales o ramificados con presencia de enlaces β -2,6 y/o β -2,1).

Todos estos polisacáridos son la principal forma de almacenamiento de carbohidratos, además protegen a las plantas de la sequía y la deshidratación causada por bajas temperaturas [2]. Los fructanos se encuentran presentes en algunas especies de plantas que florecen, que incluyen un gran número de cultivos de importancia económica [3], dentro de las cuales encontramos a las plantas del género *Agave*. En el caso del *Agave tequilana* Weber var. azul, esta planta acumula durante su crecimiento, cantidades crecientes de fructanos mixtos [3, 4], los cuales poseen un grado de polimerización de entre 3 y 29 unidades [5].

El mercado de los fructanos y sus derivados tiene un potencial muy grande, ya que se insertan dentro de las materias primas y productos conocidos como prebióticos [10], ya que al no ser hidrolizados prácticamente durante la digestión, generan un número mínimo de calorías, es decir, es una materia prima hipocalórica y contribuye a la prevención de enfermedades (ej. cáncer de colon y osteoporosis). Además, sirven de sustrato para las bacterias del colón, lo que inhibe competitivamente el crecimiento de otros microorganismos que pueden ser patógenos y aumenta la formación de metabolitos benéficos para el ser humano (lactatos, butiratos, propionatos, acetatos) [11, 12]. Particularmente, los fructooligosacáridos (FOS) tienen una gran demanda en el mercado, debido a su poder edulcorante. Para obtenerlos se requiere la hidrólisis parcial de las cadenas de fructanos originales [13]. La creciente lista de productos en

los que se incorporan actualmente los fructanos incluye: leche, yogurt, refrescos, helados, pasteles, embutidos, pan, bombones, dulces, etc.

Al llevar a cabo la hidrólisis total de estos fructanos, ya sea por hidrólisis ácido-térmica o por hidrólisis enzimática, se obtienen jarabes de fructosa, los cuales poseen poder edulcorante, por lo que son ampliamente usados en la industria de los refrescos y en confitería [14].

Existen reportes sobre la producción de FOS y jarabe de fructosa a partir de inulina de chicoria por vía enzimática [15, 16]. Las inulinasas son las enzimas que hidrolizan los enlaces β (2,1) de la inulina y constituyen una importante clase de enzimas para la producción de fructosa y FOS. Dependiendo del sitio de acción de las inulinasas, se les clasifica en exoinulinasas y endoinulinasas. Las exoinulinasas (β -D-fructanfructohidrolasa, EC 3.2.1.80) pueden hidrolizar la fructosa terminal de la inulina, por lo que se utilizan en la elaboración de jarabes de fructosa en sinergia con invertasas, enzimas que hidrolizan el enlace glucosídico de la sacarosa y endoinulinasas (2,1- β -D-fructanfructanhidrolasa, EC 3.2.1.7) que actúan en los enlaces internos de la cadena de la inulina [17]. Estas últimas también han sido utilizadas exitosamente en la hidrólisis parcial de inulina, teniendo como producto principal a los FOS. Reportes en la literatura, han utilizado la relación entre las actividades sobre sacarosa e inulina (S/I) para distinguir preliminarmente entre las fructanhidrolasas con actividad endo y exo, teniendo valores mayores a 100 para el caso de las invertasas, de entre 10 y 50 para las exoinulinasas, y menores a 2 para las endoinulinasas [18]. Se han reportado varios microorganismos para la producción de este tipo de enzimas, pero hasta el momento se ha demostrado que las más versátiles provienen de levaduras y hongos filamentosos de los géneros *Kluyveromyces* y *Aspergillus*, respectivamente [19]. Sin embargo, hasta ahora no se han reportado enzimas provenientes de hongos filamentosos con especificidad para hidrolizar fructanos provenientes del *Agave tequilana* Weber var. azul, por lo que resulta interesante la producción de enzimas fructanhidrolasas con especificidad sobre fructanos mixtos a partir de este tipo de microorganismos. En estudios previos se encontró que el extracto enzimático producido por el hongo filamentoso F1 (*Aspergillus sp.*) mostró una mayor especificidad sobre fructanos de agave al compararlos con las enzimas producidas por otros hongos estudiados y algunos otros microorganismos reportados en la literatura, por lo que fue seleccionado para estudios posteriores de sus fructanhidrolasas.

Sección Experimental

Producción de fructanhidrolasas y determinación de la actividad enzimática.

Las enzimas se produjeron por fermentación sólida utilizando fructanos como fuente de carbono y bagazo de agave como soporte con un pH inicial de 6.5. Las fermentaciones se realizaron en un reactor de columnas sumergidas en un baño a 30°C y se tomaron muestras cada 24 horas durante 5 días [20]. Los extractos enzimáticos se obtuvieron al pasar buffer de fosfatos (pH 7.0) por las columnas y se determinaron los perfiles de producción de fructanhidrolasas al medir las actividades sobre fructanos de agave (FA), inulina de chicoria (I) y sacarosa (S), los azúcares reductores generados durante la hidrólisis de dichos sustratos se cuantificaron por el método de Miller [21]. Para comprobar la especificidad sobre FA se evaluó la relación de actividades FA/S, como similarmente se usa este criterio para diferenciar entre las endo y exoinulinasas [18].

Hidrólisis de fructanos de agave. Para comprobar la especificidad de nuestro extracto crudo se llevó a cabo una hidrólisis de FA con diferentes grados de polimerización promedio (DP) mayor a 10 y menor a 10, utilizando el coctel comercial Fructozym 960® como control positivo. Además, se estudió el efecto sinérgico de las endoinulinasas y exofruktanhidrolasas en la hidrólisis de FA al mezclar el coctel Fructozym 960® con nuestro extracto crudo en una relación 1:1 en actividad enzimática. Los productos fueron analizados por cromatografía en capa fina de alto rendimiento (HPTLC) y cuantificados por HPLC.

Inducción de fructanhidrolasas específicas. Se realizaron fermentaciones utilizando diferentes tipos de fructanos: inulina de chicoria, fructanos de agave con DP mayor a 10, fructanos de agave con DP menor a 10 o FOS y fructanos de agave con DP entre 3 y 26; para conocer el efecto del tipo y tamaño de los fructanos en la producción de las fructanhidrolasas.

Resultados y Discusión

El análisis de la HPTLC de los productos de la hidrólisis de fructanos de agave utilizando el extracto enzimático obtenido por el hongo F1, reveló producción de fructosa (**Figura 1**), debido probablemente a la presencia predominante de la actividad exofruktanhidrolasa. Después de 480 minutos de reacción es posible apreciar claramente el incremento de la mancha correspondiente a la fructosa, tanto en fructanos con DP promedio menor a 10 (**Figura 1 carril 9**) como mayores a 10 (**Figura 1 carril 16**). Por otra parte, el análisis por HPLC mostró que el uso combinado del coctel comercial Fructozym 960® con el extracto propio, incrementó 1.5 veces la hidrólisis de FA, probablemente debido al efecto sinérgico de las endoinulinasas (Fructozym 960®) con las exofruktanhidrolasas (F1), como previamente se había reportado para las inulinas (**Figura 2**) [22].

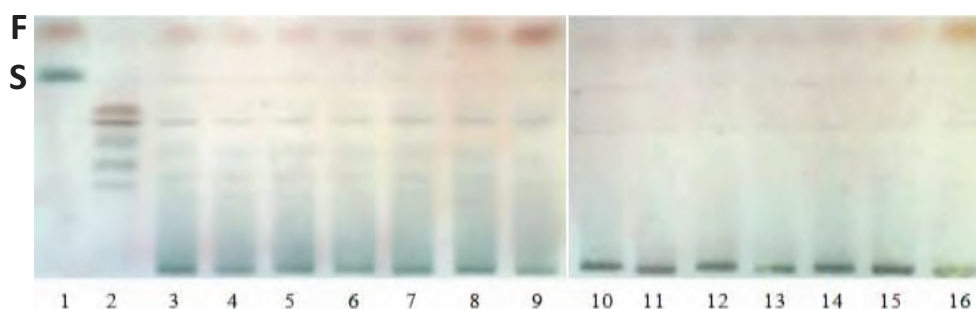


Figura 1. Productos de la hidrólisis enzimática de los fructanos de agave con DP promedio menor a 10 (3-9) y fructanos de agave con DP promedio mayor a 10 (10-16) utilizando el extracto producido por el hongo F1a los tiempos (min): 0 (3, 10); 15 (4, 11); 30 (5,12); 60 (6, 13); 120 (7, 14); 240 (8, 15); y 480 (9, 16). Se utilizaron estándares de fructosa (F) y sacarosa (S) (1) y FOS de DP entre 3 y 6 (2).

El uso de fructanos de agave con DP promedio menor a 10 como fuente de carbono, promueve la producción de fructanhidrolasas específicas para fructanos de agave, al observarse que las actividades sobre los tres sustratos son similares a las 48 horas de fermentación, siendo de 1.48 U/g para fructanos de agave, 1.79 U/g para inulina y 2.09 U/g para sacarosa (**Figura 3A**). Cuando se emplearon fructanos de inulina de chicoria como fuente de carbono, se obtuvo la máxima producción de actividad de hidrólisis utilizando inulina de chicoria como sustrato (5.2 U/g)

alcanzando una relación sacarosa/inulina (S/I) de 0.58 y sacarosa/fructanos de agave (S/FA) de 10.3, lo que puede indicar la producción de una actividad endoinulinasa que no tiene preferencia por FA [19] (**Figura 3B**). Por otra parte, al utilizar fructanos de agave con DP promedio mayor a 10 como se obtuvieron extractos enzimáticos con preferencia por hidrolizar sacarosa (**Figura 3C y 3D**).

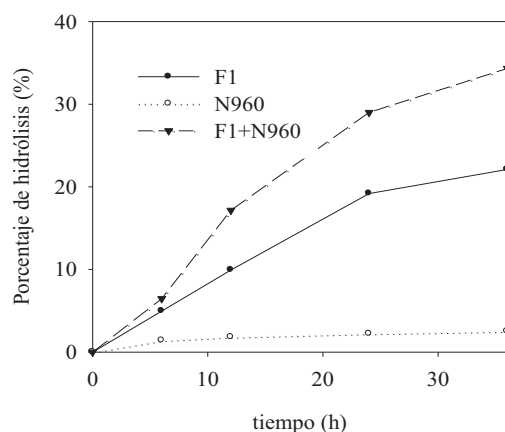


Figura 2. Porcentaje de hidrólisis de FA, empleando Fructozym 960® (N960) y el extracto enzimático producido por FMS (F1), por separado y en mezcla. Los resultados mostrados son el promedio de al menos tres réplicas con una desviación estándar menor al 5%.

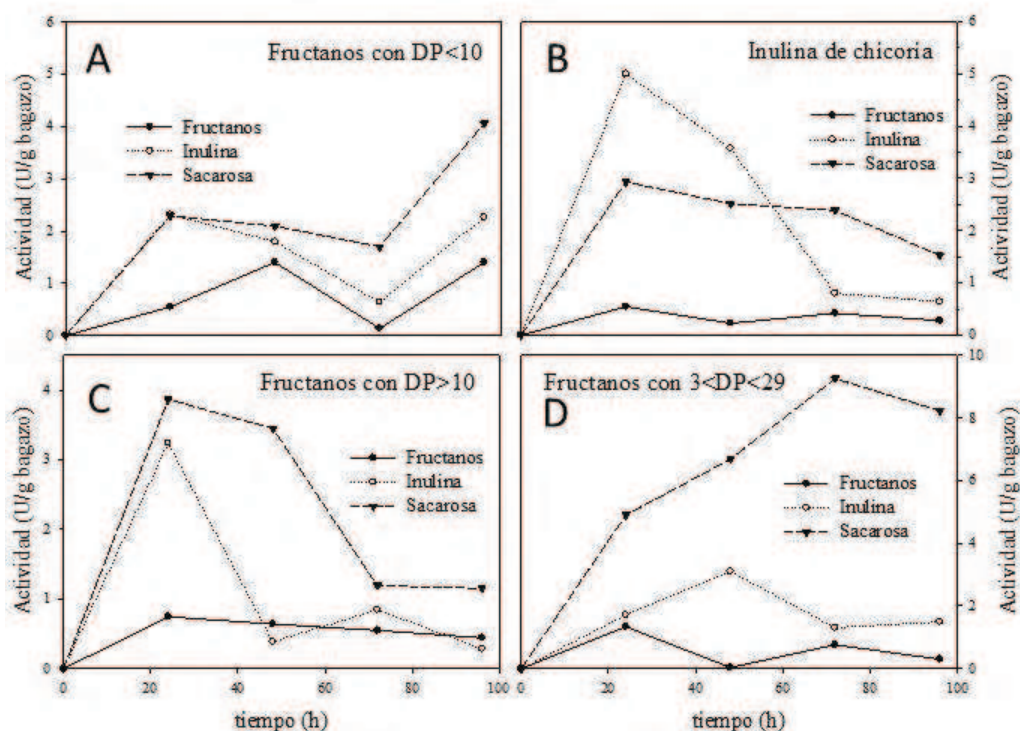


Figura 3. Cinéticas de producción de fructanhidrolasas con actividad en fructanos de agave (círculo negro, línea sólida), inulina de chicoria (círculo blanco, línea punteada) y Sacarosa (triángulo negro, línea segmentada). Las fermentaciones se realizaron utilizando diferentes tipos de fructanos como fuente de carbono **A:** fructanos de agave con grado de polimerización promedio menor a 10, **B:** inulina de chicoria, **C:** fructanos de agave con grado de polimerización promedio mayor a 10, **D:** fructanos de agave con grado de polimerización entre 3 y 29. Los resultados mostrados son el promedio de al menos tres réplicas con una desviación estándar menor al 5%.

Conclusiones

En estudios anteriores, el extracto enzimático producido por el hongo F1 mostró la mayor especificidad sobre fructanos de agave, por lo que el estudio de sus fructanhidrolasas es de interés.

La hidrólisis de fructanos de agave utilizando el extracto enzimático obtenido por el hongo F1 se dirigió principalmente a la producción de fructosa, revelando una posible actividad exofructanhidrolasa en dicho extracto.

Se pudo observar que el efecto sinérgico de las endoinulinasas (Fructozym 960®) con las exofructanhidrolasas producidas por F1 mejora la hidrólisis de FA, como previamente se había reportado para las inulinas.

En las pruebas de inducción se pudo observar que la inulina es un probable inductor de endoinulinasas y los fructanos de agave con DP promedio mayor a 10 de invertasas o probablemente exofructanhidrolasas. Sin embargo, la mayor especificidad sobre fructanos de agave se observa al utilizarse fructanos con DP bajo, sugiriendo que los FOS sean inductores de fructanhidrolasas específicas para fructanos de agave.

Agradecimientos.

Este trabajo fue realizado en el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A. C., (CIATEJ). Al fondo sectorial SAGARPA-CONACYT por el financiamiento del proyecto: SAGARPA-2009-109799. Genaro Velazco agradece el apoyo del CONACYT por su beca de maestría.

Referencias

1. Roberfroid, M. B. (2007). "Inulin-Type Fructans: Functional Food Ingredients." *The Journal of Nutrition* 137(11): 2493S-2502S.
2. Sanchez-Marroquin, A. and P.H. Hope, Agave Juice, Fermentation and Chemical Composition Studies of Some Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1953. 1(3): p. 246-249.
3. Wang, N., Nobel, P., Phloem transport of fructans in the crassulacean acid metabolism species *Agave deserti*. *Plant Physiol.*, 1998. 116: p. 709-714.
4. Situación actual del agave. 2007 [Abril, 2010]; Available from: http://www.agave.org.mx/index.php?option=com_content&task=blogsection&id=15&Itemid=42
5. Lopez, M.G., N.A. Mancilla-Margalli, and G. Mendoza-Diaz, Molecular Structures of Fructans from *Agave tequilana* Weber var. azul. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003. 51(27): p. 7835-7840.
6. NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-006-SCFI-2005, BEBIDAS ALCOHÓLICAS-TEQUILAESPECIFICACIONES., S.d. Economía, Editor. 2005.
7. NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-070-SCFI-1994. BEBIDAS ALCOHÓLICAS.MEZCAL. ESPECIFICACIONES., S.d. Economía, Editor. 1994.
8. Declaración General de Protección de la Denominación de Origen Tequila, in 16.1.-57348, *Diario Oficial de la Federación*. 13 de Octubre de 1977.
9. Producción histórica del agave: Escenario. Situación actual del Agave 2007 Abril, 2010]; Available from:

- http://www.agave.org.mx/index.php?option=com_content&task=view&id=29&Itemid=42&limit=1&limitstart=5.
10. Cani, P.D.e.a., Oligofructose promotes satiety in healthy human: a pilot study. *European journal of clinical nutrition*, 2005(0954-3007): p. 567-72.
 11. Gibson, G.R. and M.B. Roberfroid, Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics. *J. Nutr.*, 1995. 125(6): p. 1401-1412.
 12. Verghese, M.y.c., American Society for Nutritional Sciences, 2002: p. 2809-2813.
 13. Crittenden, R.G. and M.J. Playne, Production, properties and applications of food grade oligosaccharides. *Trends in Food Science & Technology*, 1996. 7(11): p. 353-361.
 14. Partida, V. Z., A. J. M. Gomez (1997) Method for producing fructose syrup from agave plants. World Intellectual Property Organization. Patent Cooperation Treaty (PCT) WO 97/34017.
 15. Jeung Cho, Y., et al., Production of inulooligosaccharides from inulin by a dual endoinulinase system. *Enzyme and Microbial Technology*, 2001. 29(6-7): p. 428-433.
 16. Gill, P.K., R.K. Manhas, and P. Singh, Purification and properties of a heat-stable exoinulinase isoform from *Aspergillus fumigatus*. *Bioresource Technology*, 2006. 97(7): p. 894-902.
 17. BYUN, S.M. and B.H. NAHM, PRODUCTION OF FRUCTOSE FROM JERUSALEM ARTICHOKE BY ENZYMATIC HYDROLYSIS. *Journal of Food Science*, 1978. 43(6): p. 1871-1873.
 18. Ettalibi, M . y Baratti, J.C. Purification, properties and comparison of invertase, exoinulinases and endoinulinases of *Aspergillus ficuum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (1987) 26:13-20.
 19. Singh, P. and P.K. Gill., Production of inulinases: Recent advances. *Food Technol. Biotechnol.*, 2006. 44: p. 151-162.
 20. Raimbault, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation EJB Electronic. *Journal of Biotechnology* 1998; Available from: <http://www.ejb.org>.
 21. Miller, G.L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*. 1959 31 (3), 426-428.
 22. Singh, R.S. (2006) Optimization of medium and process parameters for the production of inulinase from a newly isolated *Kluyveromyces marxianus* YS-1. *Bioresource Technology*. 98: p. 2518-2525.