



**FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**Empleo de enzimas en la síntesis de  
prebióticos**

Autor: Jonás Ferrer Caponi

Tutor: María José Hernáiz Gómez-Degano

Convocatoria: Junio 2018

# Índice

<b>Resumen.....</b>	<b>3</b>
<b>Introducción y antecedentes.....</b>	<b>3</b>
Prebióticos .....	3
Hidratos de carbono .....	4
Oligosacáridos no digeribles.....	6
Fructooligosacáridos .....	7
<b>Objetivos.....</b>	<b>10</b>
<b>Metodología.....</b>	<b>10</b>
<b>Resultados y discusión.....</b>	<b>10</b>
a) Producción de FOS por <i>Aspergillus</i> sp. N74 .....	11
b) Producción de FOS por <i>Aureobasidium pullulans</i> .....	13
c) Producción de FOS por <i>Aureobasidium pullulans</i> DSM 2404 .....	15
<b>Conclusiones.....</b>	<b>17</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>18</b>

## Resumen

Las bacterias que habitan en el intestino humano juegan un papel importante en la regulación metabólica y estructural del huésped. Esta microbiota intestinal fermenta aquellos componentes alimenticios que el cuerpo humano no es capaz de digerir, los cuales denominamos prebióticos. Los prebióticos son compuestos estables que sirven de sustrato para los microorganismos, fomentando su crecimiento y actividad. Además, al utilizarlos, la microbiota sintetiza compuestos beneficiosos, incrementa la viabilidad de minerales, inhibe el crecimiento de microbios patógenos y previene ciertas enfermedades. Por todo esto, es recomendable tener una adecuada ingesta de prebióticos que regulen la flora intestinal. Los prebióticos con estructura de carbohidrato son mayoritarios y se emplean como aditivos alimenticios, principalmente los oligosacáridos y polisacáridos. En este trabajo bibliográfico se describen los conceptos básicos necesarios para su comprensión, se profundiza en las características de los fructooligosacáridos (FOS) y se analizan algunos de los estudios que están llevándose a cabo para optimizar la síntesis de este tipo de prebióticos.

## Introducción y antecedentes

### 1. Prebióticos

Desde hace más de 30 años, los prebióticos han despertado un gran interés por parte de los investigadores de diversos ámbitos, tales como la nutrición, la biomedicina, la industria alimentaria y la administración. Los primeros estudios se remontan a los años 80 cuando un grupo de científicos demostró que unos oligosacáridos (fundamentalmente fructooligosacáridos) eran fermentados por grupos selectivos de bifidobacterias y estimulaban su crecimiento. Desde entonces, varios investigadores como Gibson GR. o Roberfroid MB., además de organismos internacionales tales como la *Food and Agriculture Organization* (FAO) y la *International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics* han ido definiendo el concepto de “prebiótico”. Hoy en día, podemos entender los prebióticos como componentes alimenticios incapaces de ser digeridos por el aparato digestivo humano y que sirven de sustrato para los microorganismos, estimulando el crecimiento y/o actividad de especies específicas residentes en el colon. Cuando consumen los prebióticos originan energía, metabolitos y micronutrientes beneficiosos para el huésped y reducen la población de bacterias patógenas. Esto último

se debe a que, al fomentar el crecimiento de las demás bacterias, las dañinas son inhibidas (1-5).

Por tanto, denominamos prebióticos a aquellos compuestos que cumplen las siguientes características:

- I. No son hidrolizados ni absorbidos en los tramos iniciales del intestino.
- II. Sirven de sustrato para un número reducido y específico de bacterias beneficiosas para el huésped.
- III. Estimulan el crecimiento bacteriano y/o son bio-transformados para volverse metabólicamente activos.
- IV. Tienen la capacidad de modificar la microflora intestinal favoreciendo que su composición sea la adecuada.

En el intestino humano, principalmente en el colon, reside un conjunto de microorganismos que conviven con el huésped, denominado microflora o microbiota intestinal. Existen muchos factores que modifican la composición de esta microbiota como la edad, la susceptibilidad a infecciones, los requerimientos nutricionales, el estado de salud del huésped, el pH intestinal y las interacciones entre los diferentes microorganismos o con los residuos de fermentación. Sin embargo, de todos los factores condicionantes es probable que la cantidad y tipo de sustrato presente en el medio intestinal sea lo que más influye sobre la composición de la microbiota (1,6).

Los principales sustratos que son fermentados por estos microorganismos son compuestos tipo hidratos de carbono (oligo- y polisacáridos) que el huésped no puede digerir por sí mismo, tales como la fibra dietética, almidón resistente a la hidrólisis, algunos oligosacáridos, edulcorantes y otros azúcares que no pueden absorberse. Sin embargo, algunas proteínas y lípidos que llegan al colon también son fermentados, aunque la contribución es mínima en comparación con los azúcares (1,2,7).

Como se ha mencionado anteriormente, existen muchos compuestos que presentan un comportamiento prebiótico pero este trabajo se centra en el grupo de los hidratos de carbono (1).

## **2. Hidratos de carbono**

Los carbohidratos o sacáridos son biomoléculas simples presentes en todos los seres vivos que participan en diversas funciones vitales y en el ciclo energético de la biosfera. Se componen fundamentalmente de átomos de carbono, hidrógeno y uno de oxígeno y

responden a la fórmula estequiométrica  $(CH_2O)_n$ , aunque también pueden ser modificados añadiendo otros grupos como fosfato, amino o sulfato.

Estos compuestos se pueden clasificar, según su tamaño o grado de polimerización, en:

- **Monosacáridos:** son las unidades monoméricas de los hidratos de carbono, los azúcares más simples. En la Figura 1 se muestran algunos monosacáridos.
- **Oligosacáridos:** son azúcares compuestos por varias unidades de monosacáridos unidos mediante enlaces tipo O-glucosídico. El término *oligo* viene del griego y significa “poco”. En este caso, los oligosacáridos están compuestos por “pocos” monosacáridos, de 2 a 10 unidades. En la figura 2 aparece la estructura de algunos de los oligosacáridos que se tratarán en este trabajo.
- **Polisacáridos:** son azúcares compuestos por muchas unidades de monosacáridos unidos mediante enlaces tipo O-glucosídico. El término *poli* viene del griego y significa “mucho”. Los polisacáridos están compuestos por más de 10 monosacáridos. En la figura 3 se muestra la estructura del almidón (8,9).

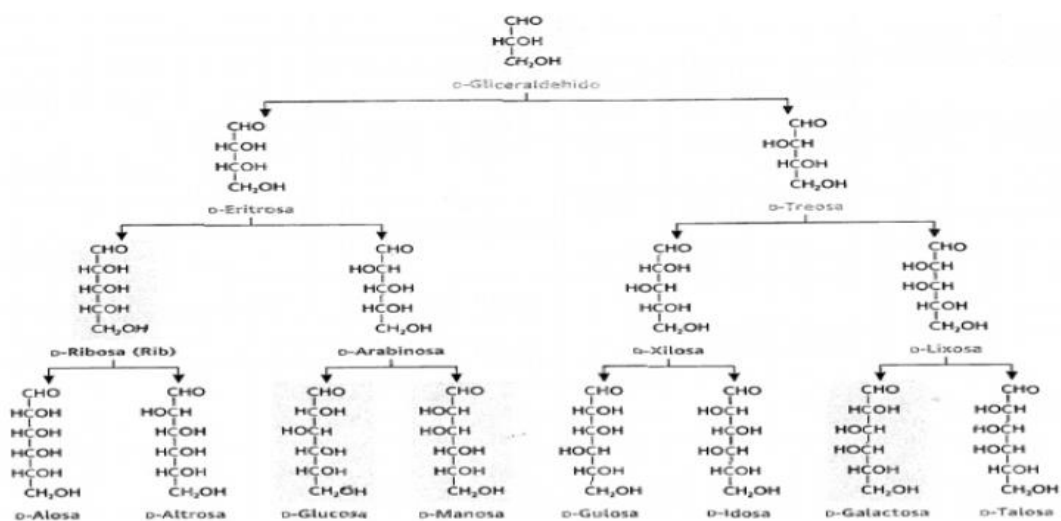


Figura 1. Estructura de Fischer de los monosacáridos compuestos por 3, 4, 5 y 6 carbonos. Algunos monosacáridos pueden ciclar la cadena, aquellos con suficiente longitud. Esta imagen proviene del libro *Bioquímica: conceptos esenciales* de la Editorial Médica Panamericana, página 25.

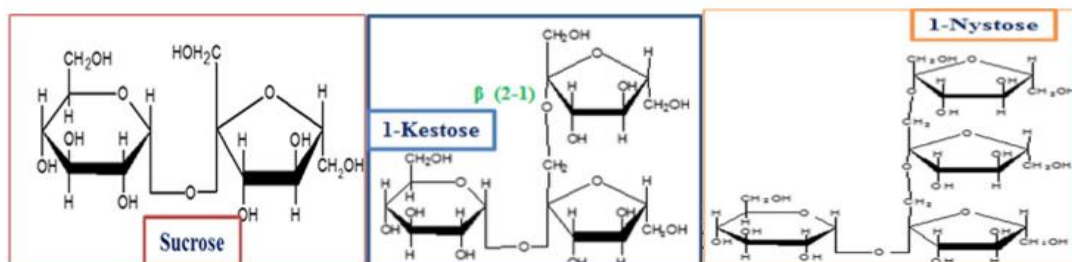


Figura 2. Oligosacáridos formados por un número variable de monosacáridos ciclados. Esta imagen proviene de *Appl Biochem Biotechnology* (2017) 183:613-635.

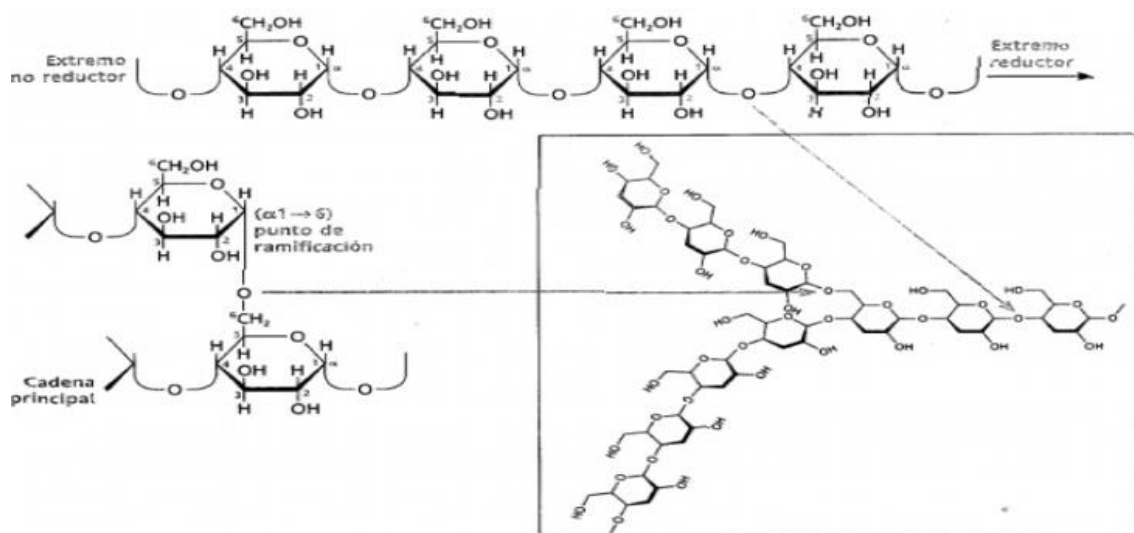


Figura 3. Estructura del Almidón, un polisacárido compuesto por unidades de Glucosa en cadenas ramificadas. Esta imagen proviene del libro *Bioquímica: conceptos esenciales* de la Editorial Médica Panamericana, página 33.

### 3. Oligosacáridos no digeribles

Los oligosacáridos existen de forma natural en alimentos como leche, miel, hortalizas, verduras, frutas, cereales, legumbres y frutos secos. Se pueden extraer de estos últimos u obtenerlos mediante procesos físicos, químicos o enzimáticos (2,10,11). Pueden clasificarse a su vez en digeribles y no-digeribles (NDOs). La razón por la que el ser humano no puede digerir algunos de estos oligosacáridos es la presencia de unos enlaces glucosídicos resistentes a la hidrólisis por parte de las enzimas del tracto intestinal. Sin embargo, algunos de los microorganismos que habitan en el intestino (microflora intestinal) poseen enzimas capaces de degradar este tipo de enlaces. Los NDOs se clasifican como prebióticos porque muestran ciertos efectos positivos para la salud humana al ser fermentados por las bacterias del colon y estimular el crecimiento de las especies beneficiosas, principalmente lactobacilos o bífido-bacterias. Además, se ha descubierto que participan en la regulación del sistema inmune, protegen contra ciertos tipos de cáncer como el de colon y previenen enfermedades cardiovasculares y metabólicas (2,10–13).

Dentro de los NDOs encontramos diferentes grupos según las moléculas que los componen: fructooligosacáridos, galactooligosacáridos, xilooligosacáridos y mananooligosacáridos (10,12).

Este trabajo se centra en el grupo de los fructooligosacáridos (FOS), en sus características, fuentes, métodos de producción a nivel industrial y algunos estudios que se han realizado para mejorar algún aspecto de su obtención (10).

#### 4. Fructooligosacáridos (FOS)

Los FOS son uno de los grupos de prebióticos más examinados (4,12,14). Se añaden a muchos alimentos como galletas, yogur, leches infantiles y postres debido a sus beneficios potenciales (14). Están formados principalmente por moléculas de fructosa y una molécula de glucosa terminal. Estas fructosas pueden unirse entre sí mediante enlaces glucosídicos  $\beta$  (2-1) o  $\beta$  (2-6), ambos resistentes a las enzimas intestinales (4,12,14). Los FOS más simples con enlaces  $\beta$  (2-1) son la 1-kestosa (Glucosa-Fructosa-Fructosa), la nistosa (Glucosa-Fructosa-Fructosa-Fructosa) y 1- $\beta$ -fructoranosil nistosa (Glucosa-Fructosa-Fructosa-Fructosa-Fructosa). Las estructuras de las dos primeras moléculas están representadas en la Figura 2 (15–19).

Como prebióticos promueven el crecimiento y/o la actividad de ciertas especies y cepas de la flora intestinal a nivel de colon. Además, se ha demostrado que participan en la activación del sistema inmune, inhiben el crecimiento de microorganismos dañinos, intervienen en la síntesis de vitaminas tipo B, reducen el colesterol sérico, regulan la absorción de algunos minerales y previenen la aparición del cáncer de colon (10,12,20–22).

Existen muchas especies que presentan enzimas que producen la reacción de transfructosilación, como las que figuran en las Tablas 1, 2 y 3 más adelante.

La producción de los FOS está más centrada en los microorganismos, ya que la extracción de estos oligosacáridos a partir de plantas o la utilización de sus enzimas no resulta rentable debido a que está ligada al ciclo estacional de las mismas, se extraen pocas enzimas y el rendimiento de las síntesis es bajo (12).

En la biosíntesis de FOS a nivel industrial se utiliza sacarosa como sustrato (10–12,23,24). La sacarosa es un disacárido compuesto por una molécula de glucosa unida por un enlace glucosídico  $\alpha$  (1-2) a otra molécula de fructosa.

La reacción enzimática para la síntesis del FOS se divide en dos fases:

1. Partiendo de la molécula de sacarosa, la enzima rompe el enlace glucosídico para obtener la molécula de fructosa aislada, como se ve en la Figura 4.
2. Se transfiere la fructosa liberada a una molécula aceptora (sacarosa o un FOS), mediante una reacción de transglucosidación, como se ve en la figura 5 (12,25,26).

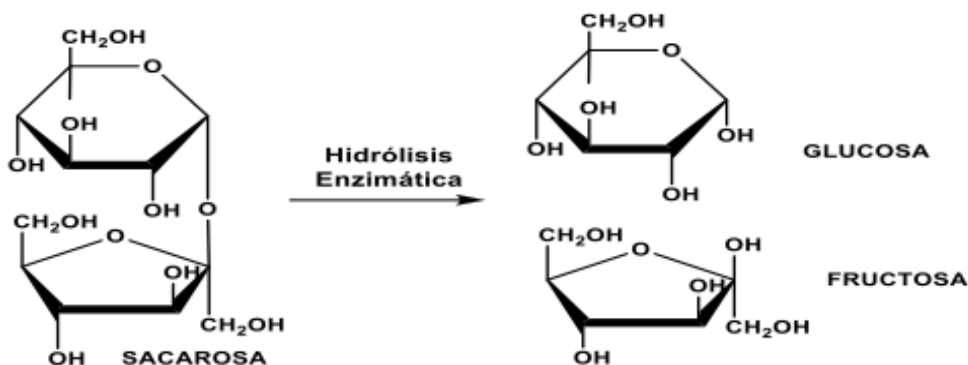


Figura 4. Hidrólisis de una molécula de Sacarosa por acción enzimática que genera Glucosa y Fructosa. La imagen ha sido generada mediante el programa ChemDraw en el laboratorio de Química Farmacéutica de la Universidad Complutense de Madrid.

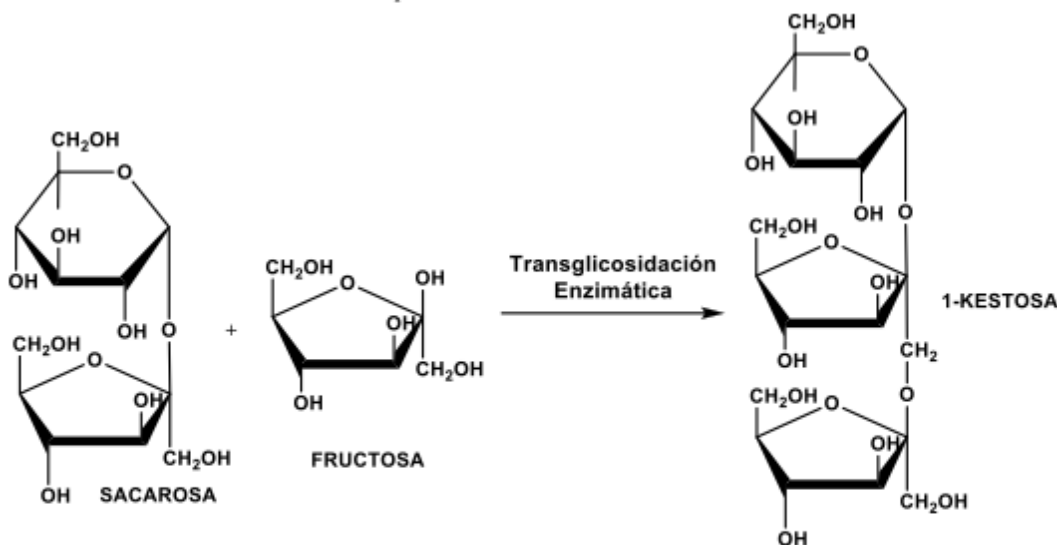


Figura 5. Transglucosidación de una molécula de Fructosa libre por acción enzimática a una Sacarosa, la cual actúa como molécula aceptora. La imagen ha sido generada mediante el programa ChemDraw en el laboratorio de Química Farmacéutica de la Universidad Complutense de Madrid.

Según como se lleva a cabo el proceso, las enzimas se han dividido en 2 categorías:

- $\beta$ -D-fructofuranosidasas: Solo llevan a cabo la reacción de transfructosilación.
- Fructosiltransferasas (FTasas): Realizan tanto la transfructosilación como la hidrólisis previa (14,26,27).

Se ha demostrado que la concentración de sacarosa inicial influye activamente en la actividad enzimática, especialmente de las Fructosiltransferasas (12,18,28,29). La síntesis comienza a partir de dos moléculas de sacarosa, una se hidroliza para obtener la molécula de fructosa y la otra hace de aceptora. Esto explica la razón por la que los FOS presentan una molécula de glucosa terminal. Además, este proceso de síntesis también está relacionado con el hecho de que sea preferible el uso de hongos y bacterias al de plantas, ya que existe una diferencia fundamental entre sus enzimas. Las enzimas de los microorganismos no solo transfieren la fructosa a la molécula aceptora, sino que también



presentan actividad hidrolítica pudiendo realizar todo el proceso de síntesis ellas solas. Sin embargo, las enzimas de las plantas necesitan otra enzima diferente que lleve a cabo la hidrólisis para obtener las unidades de fructosa libres. Desde el punto de vista industrial es mejor tener una única enzima que realice ambas actividades porque solo hay que preocuparse de que las condiciones del proceso sean las óptimas para esa única enzima y solo se necesita un compartimento, mientras que al tener dos diferentes habría que separar ambos procesos en compartimentos distintos y gastar más recursos en conseguir las condiciones óptimas para cada de ellas (12,24,25,27,30).

	Organism	Source of enzyme
<i>Agave americana</i> (agave)	<i>Aureobasidium</i> sp. P6	Intracellular
<i>Agave tequilana</i> Weber Blue variety	<i>Aspergillus aculeatus</i>	Extracellular
<i>Agave Vera cruze</i> (agave)	<i>Aspergillus flavus</i>	Extracellular
<i>Allium cepa</i> (onion bulbs)	<i>Aspergillus foetidus</i>	Extracellular
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Aspergillus japonicus</i>	Intra- and/or extracellular
<i>Asparagus officinalis</i> (asparagus root)	<i>Aspergillus niger</i>	Extracellular
<i>Hordeum vulgare</i> (barley)	<i>Aspergillus oryzae</i>	Extracellular
<i>Cichorium intybus</i> (chicory)	<i>Aspergillus phoenicis</i>	Intracellular
<i>Helianthus tuberosus</i> (Jerusalem artichoke)	<i>Aspergillus sydowi</i>	Intracellular
<i>Lactuca sativa</i> L. (lettuce)	<i>Aspergillus terreus</i>	Extracellular
<i>Lolium perenne</i> L.	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Intra- and extracellular
<i>Lycoris radiata</i>	<i>Penicillium citrinum</i>	Intra- and/or extracellular enzyme
<i>Phleum pratense</i>	<i>Penicillium islandicum</i>	Extracellular
	<i>Penicillium purpurogenum</i>	Intra- and extracellular enzyme
	<i>Penicillium rugulosum</i>	Extracellular
	<i>Rhodotorula</i> sp.	Extracellular
	<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	Extracellular

Tabla 1. Esta es una lista de especies vegetales que poseen enzimas con actividad Fructosiltransferasa (FTasa). La tabla se ha obtenido de Appl Biochem Biotechnology (2017) 183:613-635

Tabla 2. Ésta es una lista de especies fúngicas que poseen enzimas con actividad Fructosiltransferasa (FTasa). La tabla se ha obtenido de Appl Biochem Biotechnology (2017) 183:613-635.

Organism	Source of enzyme
<i>Actinomyces naeslundii</i>	Intracellular
<i>Actinomyces viscosus</i>	Extracellular
<i>Arthrobacter</i> K-1	Extracellular/intracellular
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Intra- and extracellular FTase
<i>Bacillus macerans</i>	Extracellular
<i>Bacillus megaterium</i>	Intracellular
<i>Bacillus methylotrophicus</i> SK 21.002	Extracellular
<i>Bacillus subtilis</i>	Intracellular
<i>Bacillus subtilis</i> BB04,	Extracellular
<i>Bacillus subtilis</i> NRC 33a	Extracellular
<i>Brenneria goodwinii</i>	Intracellular
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Intracellular
<i>Clostridium arbusti</i> SL206	Intracellular
<i>Erwinia amylovora</i>	Extracellular
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	Intra- and extracellular FTase
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> TMW 1.392	Intracellular
<i>L. sanfranciscensis</i> LTH 2590	Extracellular
<i>Lactobacillus panis</i>	Intracellular
<i>Lactobacillus reuteri</i>	Intra- and/or extracellular FTase
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	Intracellular
<i>Leuconostoc citreum</i> Strain BD1707	Extracellular
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Intracellular
<i>Paenibacillus bovis</i> sp. nov BD3526	Extracellular
<i>Pediococcus acidilactici</i>	Extracellular
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	Extracellular
<i>Rahnella aquatilis</i>	Intracellular
<i>Streptococcus mutans</i>	Extracellular
<i>Streptococcus salivarius</i>	Extracellular/intracellular
<i>Zymomonas mobilis</i>	Extracellular

Tabla 3. Ésta es una lista de especies bacterianas que poseen enzimas con actividad Fructosiltransferasa (FTasa). La tabla se ha obtenido de Appl Biochem Biotechnology (2017) 183:613-635.

La demanda de estos alimentos con compuestos prebióticos por parte de la población se ha incrementado en las últimas décadas, por lo que se están realizando muchos estudios para buscar nuevas técnicas y métodos que optimicen su producción desde distintos puntos de vista: velocidad de producción, rendimiento, coste o reducción del impacto medioambiental en lo posible (2,10,14,23).

## **Objetivos**

El objetivo de este trabajo es realizar una revisión bibliográfica con el fin de estudiar la síntesis de prebióticos, el proceso y buscar la forma de optimizar los métodos de síntesis. Con esto se pretende aumentar la producción para satisfacer el aumento de la demanda de prebióticos desde distintos puntos de vista.

## **Metodología**

Se ha procedido a realizar una búsqueda bibliográfica de publicaciones científicas relacionadas con la síntesis de prebióticos ya que su estudio es el objeto principal de este trabajo. Se han seleccionado aquellos artículos en los que se describen las características y propiedades de los prebióticos tipo fructooligosacárido, así como en los diferentes estudios innovadores que se están realizando. Las herramientas empleadas han sido PubMed, NCBI, ScienceDirect, Google Academy y más buscadores de artículos online. Primero se ha estudiado todo lo concerniente a la composición de los fructooligosacáridos y su capacidad como prebióticos, después se ha centrado en el desarrollo de nuevas formas de síntesis.

## **Resultados y discusión**

Se han llevado a cabo muchos estudios para buscar nuevas formas de mejorar el proceso de obtención de prebióticos. En este trabajo se han seleccionado 4 estudios diferentes en los que se analizan algunos de los aspectos relacionados con la obtención de prebióticos tipo FOS para buscar la forma de mejorar la producción a nivel industrial. Los factores observados en los distintos experimentos son:

- a) Concentración de biomasa inicial y tiempo de reacción.
- b) Purificación del producto.
- c) Actividades de distintos tipos de FTasas y el uso combinado con una Glucosa isomerasa.

A continuación, se presenta la información más relevante obtenida de los distintos estudios:

**a) Producción de FOS por *Aspergillus* sp. N74 en un reactor con un mecanismo de agitación por aire.**

Para analizar la actividad de las enzimas de *Aspergillus* sp. N74 y la influencia de la biomasa empleada en la producción de FOS se elaboró un experimento en las siguientes condiciones:

- Se utilizan 6 y 9,5 gL<sup>-1</sup> de extracto seco de *Aspergillus* sp. N74.
- La concentración de sacarosa inicial es del 70% (p/v), pH 5.5, 60 °C, 350 rpm, y con una tasa de aireación superficial de 0.012 ms<sup>-1</sup>.
- Se observa la reacción durante 26 h.

El estudio reveló que la cantidad de biomasa empleada y el tiempo de reacción influían sobre el rendimiento y la producción de FOS. Los resultados obtenidos a lo largo de las 26 horas fueron:

- Al usar 6 gL<sup>-1</sup> el rendimiento a las 26h fue del 69% y se obtuvo: 43% 1-kestosa and 26% nistosa. Sin embargo, el punto máximo de biotransformación se alcanzó a las 24 h:
  - Rendimiento de 69%. Coinciden porque transcurre poco tiempo entre el punto máximo y el final del experimento.
  - El 86,5% de la sacarosa inicial fue consumida.
  - 13,5% de sacarosa y 5,5% de fructosa.
- Al usar 9,5 gL<sup>-1</sup> el rendimiento a las 26 h fue del 57% y se obtuvo: 18% 1-kestosa, 33% nistosa and 6% 1-β-fructorianosil nistosa. Sin embargo, el punto máximo de biotransformación fue a las 4 h:
  - Rendimiento del 70%
  - 43% 1-kestosa, 25% nistosa y 2% 1-β-fructorianosil nistosa.
  - El 94% de la sacarosa inicial fue consumida.
  - 6% de sacarosa y 10% de fructosa.

A partir de todos estos datos obtenidos al finalizar el experimento se puede extrapolar la siguiente información:

- La cantidad de FOS se reduce tras alcanzar el máximo de producción, aumentando de nuevo la cantidad de sacarosa. Esto se aprecia en el experimento con 9,5 gL<sup>-1</sup> de biomasa inicial, lo que indica que la reacción

revierte y confirma que las FTasas presentan un mecanismo enzimático tipo Ping-Pong.

- Cuando se utilizan  $9,5 \text{ gL}^{-1}$  de extracto seco de *Aspergillus* sp. N74, se obtiene 1- $\beta$ -fructoranosil nistosa, mientras que al usar solo  $6 \text{ gL}^{-1}$  no aparece.
- El rendimiento se reduce tras alcanzar su máximo valor en el experimento con  $9,5 \text{ gL}^{-1}$  de biomasa inicial. Es posible que esté relacionado con el aumento de la concentración de glucosa, ya que la presencia de glucosa en el medio inhibe la acción FTasa y promueve la hidrólisis de FOS.
- La actividad de la FTasa demuestra estar relacionada con el tiempo de reacción y con la concentración de biomasa inicial empleada.
- El uso de *Aspergillus* sp. N74 es una alternativa válida para la obtención de FOS a nivel industrial (24).

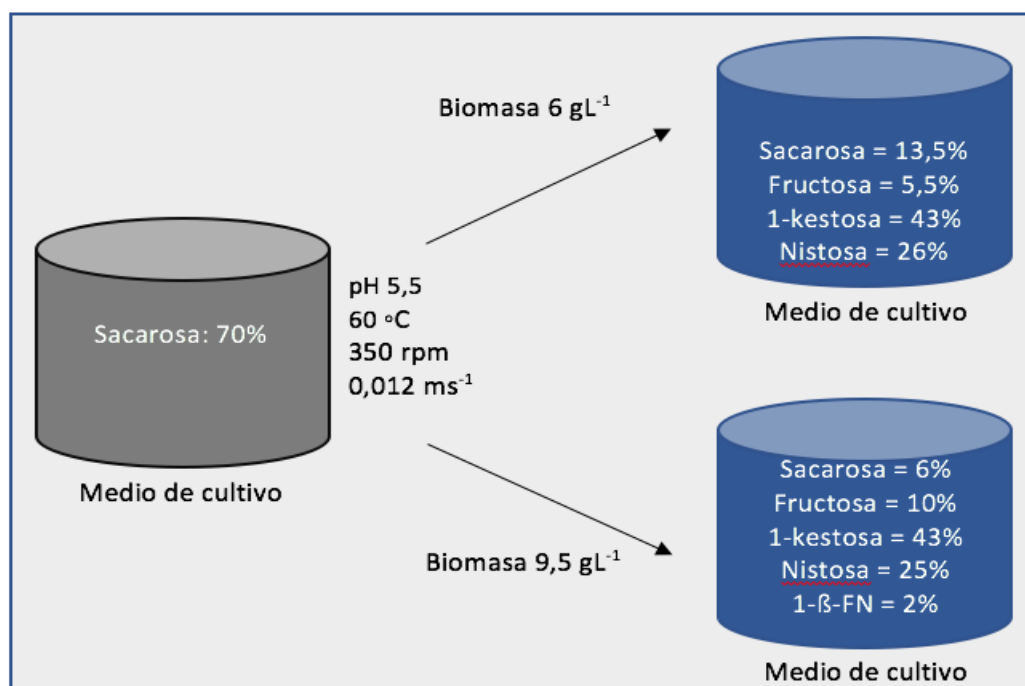


Figura 6. Representación gráfica del proceso experimental que se realiza en este estudio. Las figuras cilíndricas representan reactores que contienen el medio de cultivo donde se realiza la síntesis y el sistema de agitación por aire. El de color gris representa el estado inicial del experimento sin añadir la biomasa de microorganismo. Los azules representan el resultado de la síntesis enzimática de FOS, cada uno con una cantidad de biomasa diferente tal y como se explica en el experimento. Esta imagen se ha generado por medio del programa WORD.

**b) Producción de FOS por *Aureobasidium pullulans* y purificación del producto final con *Saccharomyces cerevisiae*.**

La purificación de FOS resulta complicada dada la similitud físico-química entre los distintos azúcares. Es por ello que se han realizado muchas investigaciones buscando nuevos métodos para eliminar los residuos de pequeños azúcares resultantes en la síntesis de FOS, como el uso de la ultra y nano-filtración, separación por cromatografía o el tratamiento con otros microorganismos.

En este experimento se sintetizaron FOS a partir de sacarosa con *Aureobasidium pullulans* y se utilizó *Saccharomyces cerevisiae* para purificar el producto, por su capacidad para remover los monosacáridos y disacáridos del medio con enzimas que los fermentan de forma selectiva.

El proceso se realizó siguiendo dos estrategias distintas, tanto en matraz (estudio en laboratorio) como en biorreactor (producción a nivel industrial), para ver cuál era la más eficaz. Una estrategia consistía en fermentar los azúcares en un único paso, cultivando ambas cepas a la vez en el mismo matraz/biorreactor. La otra estrategia se llevó a cabo en dos pasos distintos, separando los microorganismos en dos tanques distintos.

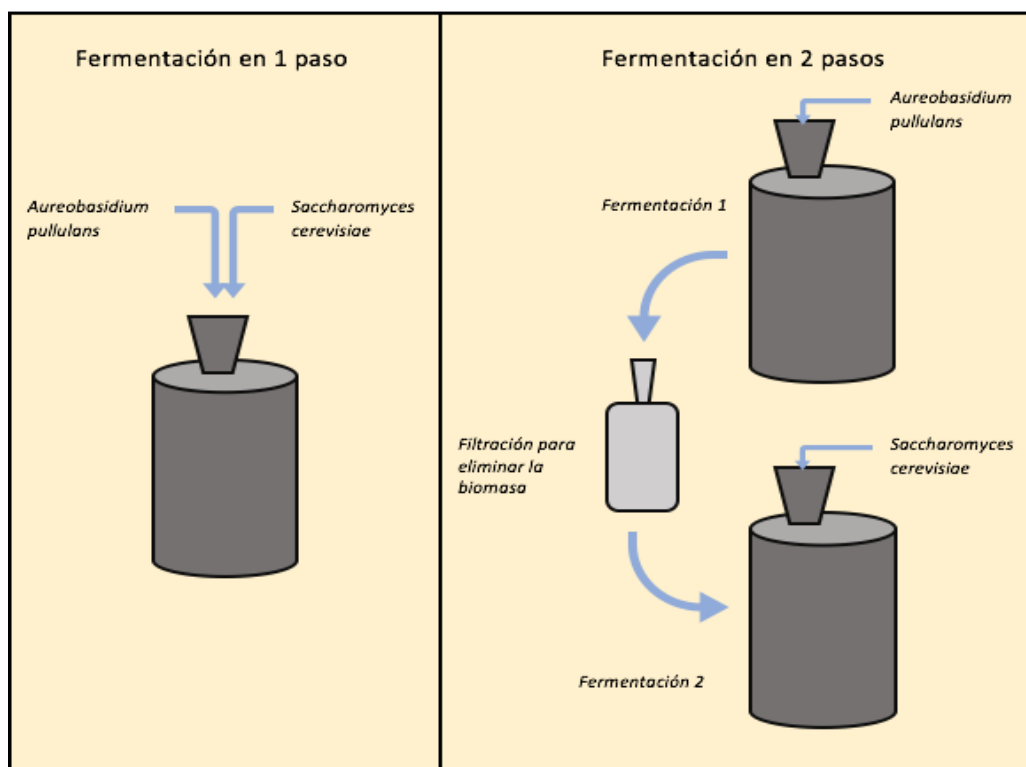


Figura 7. Representación de las dos estrategias que se llevaron a cabo para la síntesis y purificación de FOS. Esta imagen se ha construido por medio del programa WORD tomando como modelo un esquema proveniente de Carbohydrate Polymers 2015 136:274–81.

Ambos procesos se realizaron tanto en matraz como en biorreactor y se realizaron de la siguiente forma:

- Para la fermentación en un paso se inocularon ambas cepas de *Aureobasidium pullulans* y *Saccharomyces cerevisiae* en el mismo matraz/biorreactor, produciéndose simultáneamente la síntesis y purificación de FOS.
- La fermentación en dos pasos se desarrolla en dos matraces/biorreactores separados. En el primero se inocula *Aureobasidium pullulans* para que se lleve a cabo la síntesis de FOS. Cuando se alcanza el momento de máxima biotransformación de sacarosa en FOS se extrae la biomasa resultante para filtrarla usando filtros de celulosa. El producto se transfiere al otro matraz/biorreactor y se inocula *Saccharomyces cerevisiae* para que efectúe la purificación.

El estudio reveló que *Saccharomyces cerevisiae* puede ser utilizado perfectamente para purificar el producto de la síntesis de FOS, ya que sus enzimas no pueden hidrolizar sus enlaces tipo  $\beta$ . Se pudo comparar las dos estrategias diferentes y se obtuvieron muchos datos relevantes:

- Respecto a la síntesis de los FOS, la cantidad producida es mayor cuando *Aureobasidium pullulans* se encontraba solo en el medio que en co-cultivo con *Saccharomyces cerevisiae*, además el rendimiento es menor. Sin embargo, el grado de purificación es similar en ambas situaciones.
- El perfil de FOS de las distintas estrategias es diferente. Mientras que la concentración de 1-kestosa es similar en ambas, se obtiene mucha menos nistosa y 1- $\beta$ -fructoranosil nistosa cuando se utiliza el co-cultivo. Esto se debe a que la enzima invertasa de *Saccharomyces cerevisiae* también hidroliza la sacarosa y compite con *Aureobasidium pullulans*, reduciendo la cantidad de sacarosa disponible para formar FOS de mayor tamaño.
- La fermentación en dos pasos demuestra mayor eficacia a la hora de eliminar los azúcares simples, obteniendo mayor grado de purificación que cuando se usa el co-cultivo. Hay que mencionar que la cantidad de 1-kestosa disminuye mucho durante el segundo paso fermentativo pero la de nistosa aumenta y la glucosa del medio se consume casi por completo, por lo que la pureza incrementa desde un 51,7% hasta 81,6% (23).

### c) Producción de FOS por *Aureobasidium pullulans* DSM 2404

En este estudio se utilizan las distintas enzimas de una cepa de *Aureobasidium pullulans* con actividad FTasa para la producción de FOS a partir de sacarosa.

Hace unos años se descubrió que *Aureobasidium pullulans* DSM 2404 presentaba 5 tipos de FTasas (FTasa I-V), las cuales expresaban una actividad distinta en las distintas etapas del cultivo. En las primeras 24 horas del cultivo, la producción de FOS se lleva a cabo casi exclusivamente por la acción de la FTasa I, pero después se observa actividad por parte de todas las FTasas. Además, en otros estudios se demostró, mediante purificación cromatográfica, que la FTasa I es la enzima que muestra mayor actividad entre los distintos tipos de FTasas y presenta un rendimiento del 62% en la producción de FOS, mayor que los obtenidos en otros estudios con otras cepas de *Aureobasidium* spp. Como la purificación de enzimas es un proceso que no sale rentable a nivel industrial, se prefiere usar el conjunto de enzimas directamente, pero se puede aprovechar que en las etapas tempranas del cultivo la actividad mayoritaria sea la de FTasa I. Es por ello que en este estudio se prepararon dos grupos de enzimas, uno tomado en la etapa inicial del crecimiento (Grupo 1) y el otro en una etapa más tardía (Grupo 2).

Por otro lado, también se examinó el efecto de una enzima con actividad GI con el objetivo de retirar del medio de cultivo la glucosa producida por la hidrólisis de la sacarosa. Como la glucosa inhibe la síntesis de FOS, al convertirla en fructosa mediante la acción de esta enzima se espera un aumento del rendimiento de la reacción.

El experimento se realizó de la siguiente forma:

- Para la obtención de los grupos 1 y 2 se cultivó *Aureobasidium pullulans* DSM 2404 en un medio con sacarosa durante 24 h y 72 h, respectivamente. La biomasa obtenida en cada uno se centrifugó a 5000 g/15 min, a una temperatura de 4°C y se suspendió en 50 mM Tris/HCl de solución tampón (pH 7,2). Después, se incubó a 30°C por 2 h y se volvió a centrifugar como antes, tal y como se muestra en la figura 8. Las enzimas quedaron en el sobrenadante, obteniendo así el grupo 1 y 2 (16,31).

- La producción de FOS se realizó de varias maneras: a partir de 400 gL<sup>-1</sup> de sacarosa en una solución tampón de 50 mM de acetato de sodio (pH 5) o de 50 mM Tris/HCl (pH 7,2), a 30°C, 10 U de extracto de FTasa (grupos 1 o 2) y 0-40 U de GODO AGI-S (GI derivado de *Streptomyces* sp. comercial). El esquema de los cuatro procedimientos con condiciones diferentes se muestra en la figura 9.

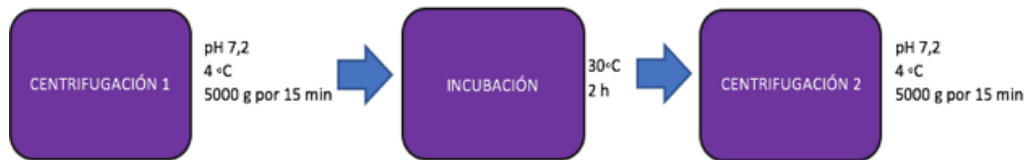


Figura 8. Representación gráfica del proceso experimental que se realiza en este estudio. Esta imagen se ha generado por medio del programa WORD.

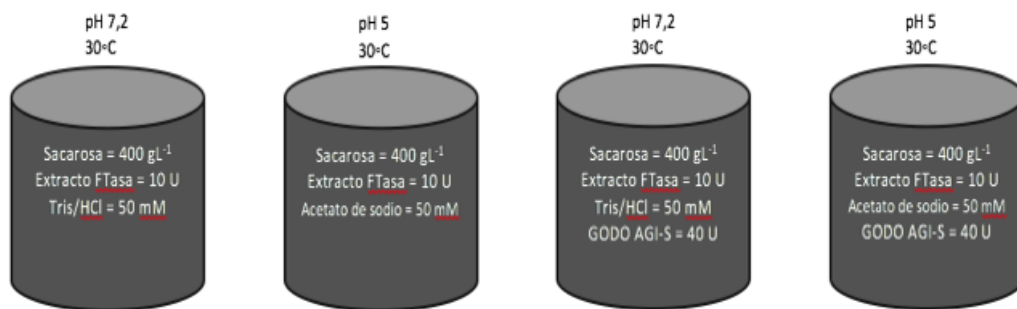


Figura 9. Representación gráfica del proceso experimental que se realiza en este estudio. Esta imagen se ha generado por medio del programa WORD.

Una vez se separaron y analizaron los productos de las distintas reacciones mediante tecnología de HPLC, los resultados obtenidos fueron los siguientes:

- La concentración de FOS obtenida, sin emplear GI, por el grupo 1 fue de 247 gL<sup>-1</sup> y de 214 gL<sup>-1</sup> por el grupo 2. Con un rendimiento del 62% y del 54%, respectivamente.
- La concentración de fructosa fue 8,6 gL<sup>-1</sup> en el experimento con el grupo 1 y 43,7 gL<sup>-1</sup> en el del grupo 2.
- Cuando se empleó la GI junto al grupo 1, la mayor concentración de FOS se obtuvo cuando se realizó a pH 7,2 (el pH óptimo de la GI), obteniéndose 276 gL<sup>-1</sup> de FOS, con un rendimiento del 69%. Además, se consiguió identificar restos de inulobiosa (Fructosa-Fructosa), otro FOS con actividad prebiótica.



Con todos estos resultados se llega a las siguientes conclusiones:

- El uso de las mezclas enzimáticas para la producción de FOS resultó exitoso y el rendimiento al usar el grupo 1 fue el mismo que el obtenido a partir de la FTasa I purificada. Esto significa que la utilización de grupos enzimáticos es efectiva sin necesidad de purificación.
- La producción de FOS es mayor al usar el grupo 1 y la producción de fructosa es mayor al usar el grupo 2, lo que implica que la FTasa I es la enzima con mayor actividad de transfructosilación y la que resulta más interesante a nivel industrial.
- El uso de la enzima GI aumenta el rendimiento de la producción desde un 62% a un 69% pero depende de que el pH del medio óptimo, el cual es diferente al pH óptimo de la FTasa que es 5 (16).

## Conclusiones

Hoy en día, la población se preocupa cada vez más por la salud. Esto puede deberse a que la información relacionada con este tema es más accesible y la gente toma conciencia de cómo cuidar su cuerpo siguiendo una dieta adecuada. Es por ello, por lo que cada vez aumenta más la demanda de prebióticos y se están buscando nuevas formas de satisfacerla. Sin embargo, no hay que perder de vista que la producción a nivel industrial puede ser contaminante, por lo que también hay que encontrar la manera de que el aumento de la producción no afecte negativamente al medio ambiente.

En este trabajo se ha hablado de algunos estudios y experimentos con los que se ha demostrado un aumento de la producción de algunos prebióticos, utilizando en todos ellos enzimas. La síntesis enzimática en lugar de la química es más limpia y resulta una alternativa factible.

Es necesario seguir investigando cómo aumentar el rendimiento de la producción enzimática a nivel industrial, ya que no solo resulta eficaz, sino que también previene el daño medioambiental. Este pensamiento podría aplicarse también a otras situaciones para mejorar los métodos de producción de diferentes industrias, solo se necesita dedicar más recursos a la investigación.

## Bibliografía

1. Collins MD, Gibson GR. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *Am J Clin Nutr.* 1999, 69(5):1052–1057.
2. Corzo N, Alonso JL, Azpiroz F, Calvo MA, Cirici M, Leis R, et al. Prebióticos; concepto, propiedades y efectos beneficiosos. *Nutr Hosp.* 2015, 31(1):99–118.
3. Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr.* 1995, 125(6):1401–12.
4. Campbell JM, Bauer LL, Fahey, GC, Hogarth AJCL, Wolf BW, Hunter DE. Selected Fructooligosaccharide (1-Kestose, Nystose, and 1<sup>F</sup>-β-Fructofuranosylnystose) Composition of Foods and Feeds. *J Agric Food Chem.* 1997, 45(8):3076–82.
5. Gibson GR, Probert HM, Loo J Van, Rastall RA, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutr Res Rev.* 2004, 17(02):259.
6. Floch MH. The Role of Prebiotics and Probiotics in Gastrointestinal Disease. *Gastroenterol Clin North Am.* 2018, 47(1):179–91.
7. Sako T, Matsumoto K, Tanaka R. Recent progress on research and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides. *Int Dairy J.* 1999, 9(1):69–80.
8. Elena Feduchi Canosa; Esther Yáñez Conde; Isabel Blasco Castiñeyra; Carlos Santiago Romero Magdalena. *Bioquímica : conceptos esenciales.* Madrid: Editorial Médica Panamericana. 2015, 24-32.
9. Prapulla SG, Subhaprada V, Karanth NG. Microbial production of oligosaccharides: A review. *Adv Appl Microbiol.* 2000, 47:299–343.
10. Mano MCR, Neri-Numa IA, da Silva JB, Paulino BN, Pessoa MG, Pastore GM. Oligosaccharide biotechnology: an approach of prebiotic revolution on the industry. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2018, 102(1):17–37.
11. Panesar PS, Kumari S, Panesar R. Biotechnological approaches for the production of prebiotics and their potential applications. *Crit Rev Biotechnol.* 2013, 33(4):345–64.
12. Singh SP, Jadaun JS, Narnoliya LK, Pandey A. Prebiotic Oligosaccharides: Special Focus on Fructooligosaccharides, Its Biosynthesis and Bioactivity. *Appl Biochem Biotechnol.* 2017, 183(2):613–35.

13. Patel S, Goyal A. The current trends and future perspectives of prebiotics research: a review. *3 Biotech*. 2012, 2(2):115–25.
14. Bali V, Panesar PS, Bera MB, Panesar R. Fructo-oligosaccharides: Production, Purification and Potential Applications. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2015, 55(11):1475–90.
15. Vega-Paulino RJ, Zúniga-Hansen ME. Potential application of commercial enzyme preparations for industrial production of short-chain fructooligosaccharides. *J Mol Catal B Enzym*. 2012, 76:44–51.
16. Yoshikawa J, Amachi S, Shinoyama H, Fujii T. Production of fructooligosaccharides by crude enzyme preparations of  $\beta$ -fructofuranosidase from *Aureobasidium pullulans*. *Biotechnol Lett*. 2008, 30(3):535–9.
17. Casci T, Rastall RA. Manufacture of Prebiotic Oligosaccharides. In: *Prebiotics: Development & Application*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2012, 29–55.
18. Chambert R, Petit-Glatron MF. Polymerase and hydrolase activities of *Bacillus subtilis* levansucrase can be separately modulated by site-directed mutagenesis. *Biochem J*. 1991, 279(1):35–41.
19. Silva MF, Rigo D, Mossi V, Golunski S, de Oliveira Kuhn G, Di Luccio M, et al. Enzymatic synthesis of fructooligosaccharides by inulinases from *Aspergillus niger* and *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 in aqueous–organic medium. *Food Chem*. 2013, 138(1):148–53.
20. Di Bartolomeo F, Startek JB, Van den Ende W. Prebiotics to Fight Diseases: Reality or Fiction? *Phyther Res*. 2013, 27(10):1423–580.
21. Bruzzese E, Volpicelli M, Squaglia M, Tartaglione A, Guarino A. Impact of prebiotics on human health. *Dig Liver Dis*. 2006, 38:S283–7.
22. Delgado GTC, Tamashiro WMSC, Pastore GM. Immunomodulatory effects of fructans. *Food Res Int*. 2010, 43(5):1231–6.
23. Nobre C, Castro CC, Hantson A-L, Teixeira JA, De Weireld G, Rodrigues LR. Strategies for the production of high-content fructo-oligosaccharides through the removal of small saccharides by co-culture or successive fermentation with yeast. *Carbohydr Polym*. 2016, 136:274–81.
24. Sánchez O, Guio F, Garcia D, ... ES and bioproducts, 2008 U. Fructooligosaccharides production by *Aspergillus* sp. N74 in a mechanically

- agitated airlift reactor. *Food Bioprod Eng.* 2008, 86:109–15.
25. Maiorano AE, Piccoli RM, da Silva ES, de Andrade Rodrigues MF. Microbial production of fructosyltransferases for synthesis of pre-biotics. *Biotechnol Lett.* 2008, 30(11):1867–77.
  26. Antosova M, Polakovič M, Antošová M, Polakovič M. Fructosyltransferases: The enzymes catalyzing production of fructooligosaccharides. *Chem Pap Acad Sci.* 2001, 55(6):350–8.
  27. Yun JW. Fructooligosaccharides—Occurrence, preparation, and application. *Enzyme Microb Technol.* 1996, 19(2):107–17.
  28. Perez Osegura MA, Guereca L, Lopez-Munguia A. Properties of levansucrase from *Bacillus circulans*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1996, 45(4):465–71.
  29. Tieking M, Kaditzky S, Valcheva R, Korakli M, Vogel RF, Ganzle MG. Extracellular homopolysaccharides and oligosaccharides from intestinal lactobacilli. *J Appl Microbiol.* 2005, 99(3):692–702.
  30. Fernandez RC, Ottoni CA, da Silva ES, Matsubara RMS, Carter JM, Magossi LR, et al. Screening of  $\beta$ -fructofuranosidase-producing microorganisms and effect of pH and temperature on enzymatic rate. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007, 75(1):87–93.
  31. Yoshikawa J, Amachi S, Shinoyama H, Fujii T. Multiple  $\beta$ -fructofuranosidases by *Aureobasidium pullulans* DSM2404 and their roles in fructooligosaccharide production. *FEMS Microbiol Lett.* 2006, 265(2):159–63.