



CARACTERIZACION ENZIMATICA DE FRUCTANAS

Iván Muñoz Gutiérrez, María Elena Rodríguez Alegría y Agustín López-Munguía Canales. Instituto de Biotecnología, UNAM, Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, C.P. 62210. Tel (777) 329 1609, Fax (777) 311 4903, Correo electrónico ivanmugu@ibt.unam.mx.

Palabras clave: inulina, levana, fructosilhidrolasas, inulinasas.

Introducción. La inulina y levana son fructanas solubles en agua formados por residuos fructosilo, sintetizados enzimáticamente a partir de sacarosa. Se encuentran como carbohidratos de reserva en el 15% de plantas con flores como la achicoria y los agaves. También son producidas por microorganismos como *Bacillus subtilis*, *Leuconostoc mesenteroides* y *L. citreum*. Las levanas tienen diversas aplicaciones en las industrias de cosméticos, alimentos y fármacos, mientras que las inulinas y los fructooligosacaridos son considerados nutraceuticos. En las inulinas los grupos fructosilo están unidos mediante enlaces β 2-1 en la cadena principal y pueden estar o no ramificadas mediante enlaces β 2-6. En la cadena principal de las levanas los residuos fructosilo están unidos por enlaces β 2-6 con ramificaciones en β 2-1. La identificación y caracterización química de estos polímeros por métodos químicos requiere de procedimientos largos y costosos. En particular, existen sistemas en los cuales las fructanas se encuentran formando parte de una mezcla de polisacáridos, como puede ser almidón, dextranas, etc., de los cuales es difícil su separación y caracterización. Tal es el caso de algunos productos de fermentación como el pulque y la masa madre (sourdough) en los que existen microorganismos con capacidad de producir fructanas y glucanas simultáneamente. En este trabajo se propone el uso de fructosilhidrolasas para la caracterización preliminar de fructanas con base en su susceptibilidad a la hidrólisis.

Metodología. Se realizaron cinéticas de hidrólisis empleando Fructozyme L (Novozymes) una preparación comercial que contiene una mezcla de endo y exo inulinasas. Se emplearon las inulina y levanas que se enlistan en la tabla 1. Las reacciones de hidrólisis se llevaron a cabo a diferentes concentraciones de sustrato en amortiguador de acetatos a 60°C, pH 4.5 y a diferentes concentraciones de enzima. La velocidad y la evolución de la reacción se midió mediante la aparición de azúcares reductores por el método de DNS y los productos finales se caracterizaron mediante HPLC.

Resultados y discusión. La tabla 1 muestra los pesos moleculares y la velocidad de hidrólisis de las diferentes fructanas. Se observa claramente que la velocidad de hidrólisis depende del tipo de fructana y de su peso molecular. Así, la velocidad de hidrólisis de inulina es mayor que la de levana. La velocidad de hidrólisis de las inulinas de origen vegetal (achicoria y agave) son notablemente superiores a la velocidad de hidrólisis de la

inulina de origen bacteriano (*L. citreum*). Con la inulina de achicoria se observa un comportamiento michaeliano, mientras que con el resto de los polímeros la hidrólisis muestra un comportamiento de primer orden, donde la velocidad es directamente proporcional a la concentración de sustrato.

Tabla 1. Comparación de las velocidades normalizadas al concentrado enzimático.

	PM (kDa)	V _{hid} *
INULINAS		
Achicoria Raftiline HP (Sin ramificar)	8.3	14270
<i>Agave tequilana</i> Weber var. <i>Azul</i> (ramificada)	0.53 – 4.74	7599
<i>L. citreum</i> (ramificada)	1350 – 1600	2140
LEVANAS		
Levana <i>B. subtilis</i> (ramificada)	1-100	478
Levana <i>L. mesenteroides</i> B512F (ramificada)	-----	190
Levana <i>L. mesenteroides</i> ATCC 8294 (ramificada)	-----	162

* V_{hid} = μ moles de fructosa liberados por mL de producto comercial por minuto empleando una concentración de sustrato al 5% (w/v).

Las inulinas son hidrolizadas por Fructozyme L hasta fructosa mientras que las levanas son hidrolizadas parcialmente. Esto es debido a que si bien ambos polímeros cuentan con enlaces β 2-1, la proporción de estos varía en función de su origen, siendo el enlace principal en la inulina y solo el enlace de las ramificaciones en las levanas. Así mientras que en estas últimas la velocidad observada podría considerarse como de “desramificación”, en los primeros la hidrólisis es casi completa. Esto se refleja en los parámetros de hidrólisis y en los perfiles de productos observados mediante HPLC.

Conclusiones. La velocidad de hidrólisis de las fructanas por el producto Fructozyme L depende del tipo de enlace, grado de polimerización y porcentaje de ramificación. Así las inulinas de origen vegetal (bajos GPs y porcentajes de ramificación) son hidrolizadas más rápidamente que las inulinas y levanas de origen bacteriano (altos GPs y porcentajes de ramificación). Este método permitiría distinguir la presencia de fructanos en un sistema complejo e inferir la estructura con base en la velocidad de hidrólisis.