

Obtención y caracterización de nuevos oligosacáridos bioactivos a partir de permeados de suero de quesería

Moreno FJ, Villamiel M, Díez-Municio M, Corzo-Martínez M, Olano A, Corzo N., Montilla A

1. Introducción

En los últimos años ha surgido un creciente interés por el consumo de alimentos funcionales, que, además de cubrir las necesidades básicas en energía, macronutrientes y micronutrientes, provoquen efectos fisiológicos beneficiosos en el consumidor. Esta cualidad puede ser inherente al alimento o introducida por la adición de ingredientes tales como los carbohidratos prebióticos que ejercen un efecto beneficioso sobre la microbiota gastrointestinal modificando selectiva y positivamente su composición y/o actividad. Los efectos beneficiosos de la incorporación de prebióticos en la dieta han sido ampliamente demostrados en humanos (1).

Dos de los tipos de prebióticos científicamente reconocidos (2), los galactooligosacáridos (GOS) y la lactulosa, derivados de la lactosa, pueden obtenerse a partir del permeado de suero de quesería. El permeado constituye uno de los subproductos más abundantes y contaminantes de la industria alimentaria, ya que su aprovechamiento sigue siendo hoy día insuficiente y una gran parte de este subproducto es vertido junto a las aguas residuales industriales. Por tanto, desde un punto de vista económico y medio ambiental, es muy importante, ampliar su uso de forma eficiente (3).

Hoy en día, una de las aplicaciones más prometedoras del permeado es la síntesis de oligosacáridos, obtenidos mediante transglicosilación de la lactosa. Es, por tanto, de gran interés el desarrollo de nuevas estrategias para la síntesis de nuevos oligosacáridos con propiedades funcionales utilizando el permeado como sustrato. Dado que el permeado es una solución acuosa cuyos componentes principales son lactosa y sales minerales, en proporción variable, y esta composición salina puede afectar a la actividad del enzima (4), es necesario estudiar dicho efecto en cada caso concreto. Una de las líneas de investigación de nuestro grupo se centra en la obtención de oligosacáridos mediante procesos, simples o combinados, de transglicosilación enzimática e isomerización química del permeado. Dependiendo del enzima utilizado, de los sustratos (permeados o mezclas con otros carbohidratos que pueden actuar bien como aceptores o como donantes en las reacciones de transglicosilación) y de la combinación de reacciones se puede obtener una amplia variedad de oligosacáridos potencialmente prebióticos. En este capítulo nos centraremos en el estudio de la obtención de dos tipos de oligosacáridos. (i) Gluco-oligosacáridos, utilizando la dextranasa (EC 2.4.1.5) B-512F de *Leuconostoc mesenteroides* con sacarosa y permeado como sustratos (5), (ii) GOS (derivados de la lactosa y lactulosa) obtenidos

mediante un proceso combinado de isomerización del permeado y posterior transgalactosilación con la β -galactosidasa (EC 3.2.1.23) de *Bacillus circulans*.

2. Síntesis de gluco-oligosacáridos prebióticos mediante transglucosilación de permeado de suero de quesería utilizando la dextransacarasa B-512F de *Leuconostoc mesenteroides*

La dextransacarasa B-512F de *L. mesenteroides* es una glucosiltransferasa comercial utilizada para la síntesis de gluco-oligosacáridos a partir de la sacarosa que actúa como donante de la unidad de glucosa que se transfiere a otros carbohidratos (aceptores) como la maltosa. La lactosa se ha probado también como posible aceptor, pero, por los motivos indicados anteriormente, resulta de mayor interés práctico el uso del permeado como sustrato. En primer lugar, se estudió el efecto de la relación donante:aceptor y la cantidad de enzima empleada, sobre la formación del trisacárido mayoritario. Para ello, se utilizaron soluciones modelo con sacarosa y lactosa a pH 5.2 (tampón acetato sódico 20 mM + 0.34 mM CaCl₂) y temperatura 30°C, valores óptimos para la actividad del enzima, según la bibliografía (6). En las condiciones óptimas se llegó a obtener un rendimiento del trisacárido de un 47% (en peso con respecto a la lactosa inicial) transcurridas 24 h de reacción, cuando se utilizaba una relación sacarosa:lactosa 1:1, una concentración del 30% para cada carbohidrato y 0.8 U/mL de enzima. Posteriormente, el trisacárido mayoritario se aisló por LC-IR semipreparativa y se determinó su estructura por NMR, concluyéndose que se trataba del trisacárido 2- α -D-glucopiranosil-lactosa (Figura 1).

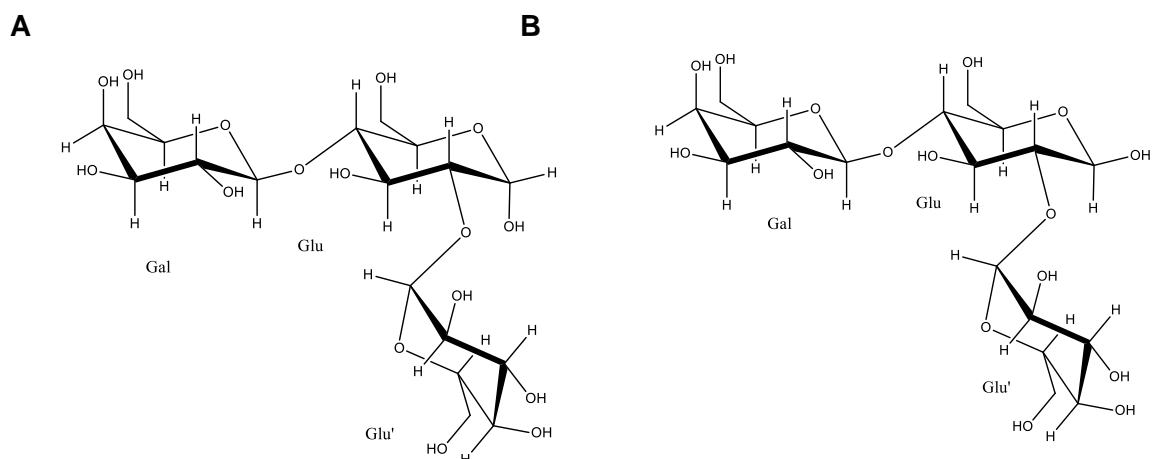


Figura 1: Estructura elucidada por NMR del compuesto 2- α -D-glucopiranosil-lactosa, **A:** anómero α ; **B:** anómero β

En las condiciones óptimas previamente determinadas para la lactosa, se ensayaron dos permeados en polvo (PS) de origen industrial que presentaban una notable diferencia en el contenido total de minerales (PS1: 24.6 mg/g de materia seca (MS) y PS2: 47.0 mg/g MS), debido principalmente a los niveles de sodio, fósforo y potasio, mucho más altos en el PS2.

Por otro lado, estos permeados presentaban diferente pH, lo que podía sugerir el empleo de distintas tecnologías queseras en su obtención. Bajo las condiciones de reacción descritas anteriormente, los resultados obtenidos, utilizando estos permeados como sustrato, eran similares a los obtenidos con el sistema modelo e incluso, con el PS2, se mejoraban, al obtenerse un rendimiento máximo de glucosil-lactosa del 42 y 52% (en peso respecto al contenido inicial de lactosa) con los permeados PS1 y PS2, respectivamente (Figura 2). Estos datos indican un posible efecto de los minerales sobre la actividad del enzima, así como la posibilidad de utilizar distintos permeados para obtener un buen rendimiento del trisacárido 2- α -D-glucopiranosil-lactosa.

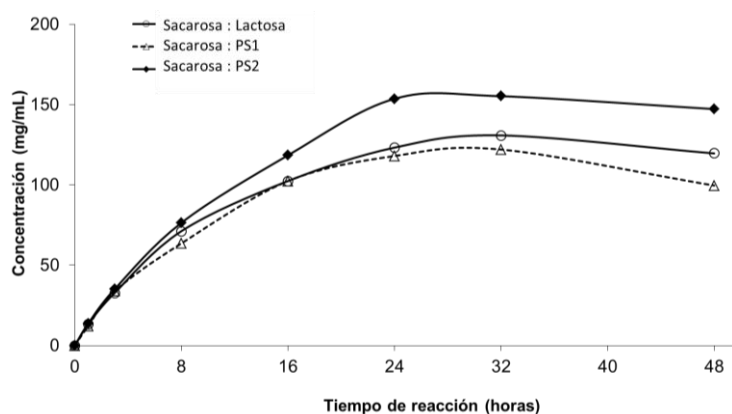


Figura 2 Concentración de 2- α -D-glucopiranosil-lactosa a lo largo de la reacción de transglucosilación realizada con sacarosa:lactosa, sacarosa:permeado (PS1) y sacarosa:permeado (PS2) con una concentración equivalente a 30% de cada azúcar, catalizada por la dextranasa B-512F de *L. mesenteroides* (0.8 U/mL), a 30 °C y pH 5.2.

El trisacárido sintetizado, 2- α -D-glucopiranosil-lactosa, puede resultar un excelente candidato como ingrediente prebiótico, ya que, según la bibliografía (7), hay claras evidencias de que el enlace α -(1 \rightarrow 2) presenta una alta resistencia a la digestión gastrointestinal, *in vitro* e *in vivo*, y, además, este trisacárido es un derivado galactosilado de la kojibiosa (2-O- α -D-glucopiranosil-D-glucosa), disacárido que presenta un gran potencial prebiótico según diversos estudios descritos en la bibliografía (6).

3. Síntesis de carbohidratos prebióticos derivados del permeado de suero mediante un proceso combinado de isomerización y transgalactosilación

Otra de las aplicaciones del permeado es su utilización en reacciones de isomerización. Así, en este apartado se describe la obtención de ingredientes con potenciales propiedades prebióticas a partir de dos subproductos de la industria alimentaria, combinando la isomerización del permeado de suero de quesería, como fuente de lactosa, y utilizando la cáscara de huevo, como catalizador de grado alimentario, y la posterior transgalactosilación

enzimática con la β -galactosidasa de *B. circulans*, evitando los pasos de purificación del permeado y la mezcla de isomerización.

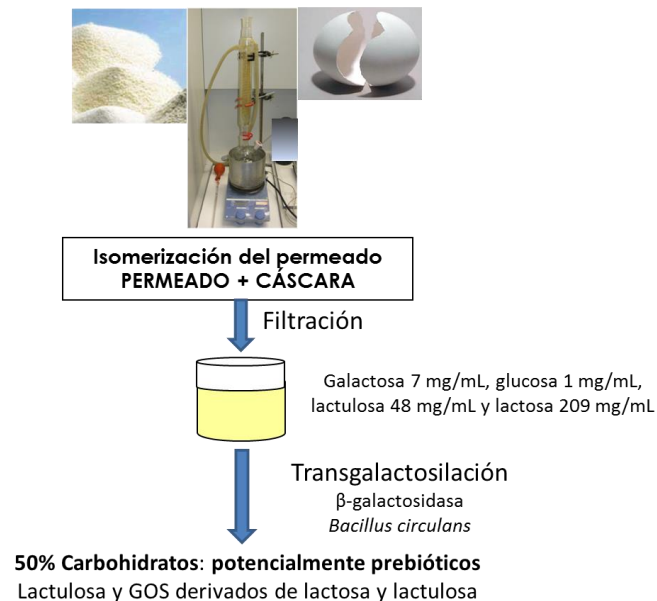


Figura 3. Esquema del proceso de obtención de carbohidratos prebióticos combinando el proceso de isomerización del permeado y su posterior transgalactosilación.

La figura 3 muestra de manera esquemática el proceso seguido. En primer lugar, en base a un estudio previo realizado por nuestro grupo sobre la obtención de lactulosa mediante la isomerización de permeado de leche con cáscara de huevo (8), se preparó una solución de permeado a una concentración de lactosa del 30%, se añadió un 3% de cáscara de huevo previamente pulverizada y se mantuvo la mezcla en reflujo durante 150 minutos. Con este proceso, y tras una simple centrifugación o filtración, se obtuvo una mezcla de carbohidratos con un 3% de galactosa, 18% de lactulosa y 79% de lactosa. Para la posterior reacción de transgalactosilación se eligió la β -galactosidasa de *B. circulans*, ya que, previamente, se había comprobado la mayor resistencia de la lactulosa a ser hidrolizada por dicha enzima. De esta forma se procedió a optimizar las condiciones de reacción tales como pH, temperatura, tiempo, y concentración de enzima y de sustrato para maximizar la formación de GOS; estas condiciones fueron pH 6.5, 50°C, 3 U/mL de enzima, 300 mg/mL de carbohidratos y tiempo de reacción 5h. En estas condiciones se obtuvieron un 25% de monosacáridos, 25% de lactosa, 11% de lactulosa, 16% de nuevos disacáridos, 20% de trisacáridos y 3% de tetrasacáridos (Figura 4). También se pudo comprobar que la lactulosa, además de no ser apenas hidrolizada por el enzima, actuaba como aceptor de unidades de galactosa, obteniéndose de esta forma una mayor variedad de oligosacáridos. Por otra parte, diversos trabajos realizados en nuestro grupo han puesto de manifiesto que los

oligosacáridos derivados de la lactulosa presentan propiedades mejoradas o complementarias con los GOS derivados de la lactosa (9, 10).

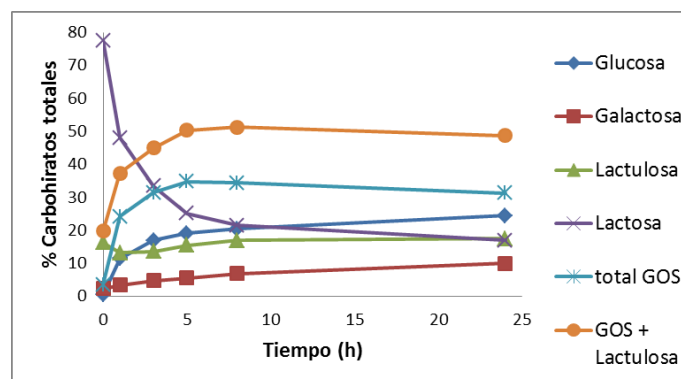


Figura 4. Evolución de los carbohidratos a lo largo de la reacción de transgalactosilación llevada a cabo con permeado isomerizado con una concentración del 30% de carbohidratos, catalizada por la β -galactosidasa de *B. circulans* (3 U/mL), a 50 °C y pH 6.5.

Como conclusión podemos decir que con el proceso de transgalactosilación del permeado isomerizado con β -galactosidasa de *B. circulans* se puede obtener una mezcla con un contenido alrededor del 50% de carbohidratos potencialmente prebióticos, incluyendo lactulosa y GOS derivados de lactosa y lactulosa.

Como se ha indicado, mediante ambas estrategias, se puede utilizar el permeado sin un paso previo de desmineralización, obteniéndose buenos rendimientos, comparables a los obtenidos con soluciones de lactosa o incluso mejores, y contribuyendo a la mejora de la producción y diversidad de oligosacáridos potencialmente bioactivos. Ambos procesos cumplen con los requerimientos actuales de la industria, son de fácil implementación, bajo coste, respetuosos con el medio ambiente y no requieren de instalaciones específicas para su desarrollo. Por tanto, estos estudios pueden contribuir a ampliar el uso de este importante subproducto para la obtención de nuevos oligosacáridos con propiedades bioactivas.

Bibliografía:

- (1) Roberfroid M et al. *Br J Nutr* 104: S1-S63, 2010.
- (2) Gibson GR et al. *Nut Res Rev* 17: 259-275, 2004.
- (3) Ganzle MG et al. *Int Dairy J* 18: 685-694, 2008.
- (4) Montilla A, Corzo N, Olano A. *Milchwissenschaft* 67: (1) 14-18, 2012.
- (5) Díez-Municio M et al. *J Agric Food Chem* 60: 1945-1953, 2012
- (6) Kim M, Day DF *Appl Biochem Biotechnol* 707-716, 2008.
- (7) Sanz ML, Gibson GR, Rastall, RA. *J Agric Food Chem* 53: 5192-5199, 2005.
- (8) Montilla A et al. *Food Chem* 90: 4: 883-890: 2005.
- (9) Cardelle-Cobas A et al. *J Food Microb* 149: 81-87, 2011.
- (10) Hernandez-Hernandez O et al. *Food Microb* 30: 2: 355-361, 2012.