

Análisis del empleo de diferentes materias primas azucaradas en la producción de fructo-oligosacáridos

Odalys Capote-Peña^{1*}, Enrique R. Pérez-Cruz², Raúl Sabadí-Díaz¹, Juana M. Chanfón-Curbelo¹, Dunieski Martínez-García² y Alina Sobrino-Legón²

1 Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA)

Vía Blanca # 804 y Carretera Central. San Miguel del Padrón. La Habana, Cuba

2 Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Sancti Spíritus (CIGB SS),

Circunvalante Norte S/N, Olivos 3. Apartado Postal 83, Sancti Spíritus, 60200, Cuba.

*odalys.capote@icidca.azcuba.cu

RESUMEN

La tecnología para la producción de fructo-oligosacáridos con la enzima 1-SST y azúcar refino como sustrato ha sido estudiada en Cuba y están definidos los parámetros de operación para alcanzar rendimientos de 55 %. La industria azucarera dispone de corrientes del proceso ricas en contenido de sacarosa, como son la meladura, las mieles, el azúcar crudo, así como el licor de refinería, que pudieran también emplearse para la producción de los fructo-oligosacáridos. En el presente trabajo se estudia el comportamiento de la reacción de síntesis de los fructo-oligosacáridos, a partir de azúcar crudo y licor decolorado, bajo los mismos parámetros de operación ya definidos para la tecnología a partir de azúcar refino y se demuestra que se puede producir FOS con los mismos rendimientos (55 %) y similares niveles de kestosa. Se analiza la variación en color de cada jarabe obtenido.

Palabras clave: fructo- oligosacáridos, materias primas azucaradas, rendimiento, color.

ABSTRACT

The fructo-oligosaccharides technology using the a 1-SST enzyme and refined sugar as substrate has been studied in Cuba and the operation parameters are defined to reach yields of 55 %. The sugar industry has process streams rich in sucrose content such as syrup, molasses, raw sugar, as well as refinery liquor that could also be used for the production of fructo-oligosaccharides. In the present work, the behavior of the synthesis reaction of fructo-oligosaccharides from raw sugar and decolorized liquor is studied under the same operating parameters already defined for the technology from refined sugar, demonstrating that FOS can be produced with the same yields (55 %) and similar levels of kestose. The variation in color of each syrup obtained is analyzed.

Key words: fructo-oligosaccharides, sugar cane raw materials, yield, color.

INTRODUCCIÓN

Los fructo-oligosacáridos (FOS) son fructanos de bajo peso molecular, con un grado de polimerización de 2 a 10; tienen propiedades de una típica fibra dietética y se pueden encontrar en varios vegetales. Sus efectos fisiológicos intestinales, descubiertos en años recientes, han renovado su significación para la salud humana (1). Los FOS se producen bajo condiciones de control, con empleo de enzimas con actividad fructosiltransferasas y sacarosa como sustrato.

Comercialmente, se produce FOS a partir del azúcar refino. En aras de disminuir los costos de producción, se ha estado investigando el empleo de otras fuentes de sacarosa, por ejemplo, con

jugos concentrados, mieles, aunque los resultados no son superiores al empleo del azúcar como sustrato.

Se reporta el empleo de mieles finales diluidas, a concentraciones de sacarosa de 230 g/L, con el empleo de células *Aureobasidium pullulans* FRR 5284 con enzimas trans-fructosiladoras que lograron concentraciones de FOS totales del orden del 43 % (2); también, 166 g/l de FOS se produjeron a partir de 360 g/L de sacarosa, equivalente a mieles de caña con pH 5.5 y 24 horas de incubación con *Aureobasidium pullulans* KCCM 12017 (3); por otra parte, se obtuvo FOS de mieles también con el empleo de un gen represor de glucosa en *Aureobasidium melanogenum* 33 y se logró 0.58 g de FOS /g de miel, a partir de concentraciones de 350 g/L de sustrato en 4 h (4). Adicionalmente, se ha obtenido FOS de meladura y mieles de remolacha con el empleo de Pectinex Ultra SP-L (batch No. KRN05401), que dio como resultado concentraciones de FOS totales de 49 %, a partir de meladura y 42 % a partir de mieles (5).

Se reportan pocos trabajos con el empleo de azúcar crudo en lugar de refino; entre ellos, el estudio de la producción de fructo-oligosacáridos bajo técnicas de ultrasonido y microburbujeo, a concentraciones de 700 g/L y la enzima Pectinex Ultra SP-L, a temperatura de 55 °C, en 4 horas, se obtuvo una concentración de FOS de 0.45 g/g de sustrato para el azúcar crudo y a las 6 horas una concentración de 0.58 g/g de sustrato para el azúcar refino (6). Asimismo, se reporta un estudio con 4 materias primas diferentes: azúcar refino, azúcar crudo, miel A y mieles de refinería que compara 2 enzimas recombinantes y se analizan los tiempos de reacción hasta llegar a mezclas de 55 % de FOS y, dentro de los FOS, los porcentajes de kestosa y nistosa para cada materia prima. Este estudio reportó menores productividades para las mieles, atribuidas al pH y a su composición, con la presencia de cenizas y trazas de metales que pudieran tener un efecto inhibitorio (7).

El CIGB SS ha patentado una tecnología de producción de FOS, mezcla 55 % con la enzima 1-SST de su propia invención y con el empleo, como sustrato, del azúcar refino (Patente EP 2 899 282 A1). La enzima 1-SST es un biocatalizador no fúngico que convierte la sacarosa de forma eficiente en fructo-oligosacáridos de cadena corta, en particular 1-kestosa (GF2), es de origen vegetal y está expresada constitutivamente a niveles altos en *Pichia pastoris* (8).

El objetivo del presente trabajo es el estudio del empleo de tres materias primas azucaradas: azúcar refino, azúcar crudo y licores de refinería, para la producción de FOS, con el empleo de la enzima 1-SST y su influencia en la concentración de FOS totales y en las propiedades físico-químicas del jarabe, debido a de la síntesis enzimática.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los carbohidratos en las mezclas de reacción de 1-SST fueron analizados por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) utilizando una columna Aminex HPX-42C (0.78 × 30) cm (Bio-Rad, CA, EE.UU.) equipada con un detector de índice refractivo. Los paquetes de programa BioCrom versión 3.0 desarrollado en CIGB (La Habana, Cuba) fueron utilizados para la cuantificación de azúcares.

El licor decolorado se preparó en el laboratorio bajo las mismas condiciones de las refinerías de azúcar.

Para las mediciones físico-químicas de los jarabes obtenidos se emplearon las técnicas analíticas del Manual de técnicas para azúcar crudo y refino (9)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las reacciones de síntesis se siguieron durante 6 horas y se trabajaron bajo las mismas condiciones de temperatura, pH, concentración de sacarosa y concentración de enzima. Se procedió a

tomar muestras cada 1 hora, se comenzó por la hora 0 y se concluyó a la hora 6 de la reacción. Se leyeron por HPLC los contenidos de glucosa, sacarosa, fructosa, 1-kestosa y nistosa. Las medias de los resultados para cada tipo de materia prima se muestran en las tablas 1, 2 y 3 y el comportamiento en el tiempo en la figura 1.

Tabla 1. Composición de la muestra de FOS, con el empleo de azúcar refinado como sustrato

Sustrato: Azúcar refinado						
Tiempo (h)	Concentración de cada componente en la mezcla (g/L)					
	nistosa	kestosa	sacarosa	glucosa	fructosa	FOS
1	6.77	145.10	392.27	52.30	3.53	151.87
2	9.30	233.83	256.40	88.97	11.53	243.13
3	15.53	265.60	199.23	110.57	9.03	281.13
4	34.60	284.97	139.43	129.37	11.63	319.57
5	44.87	282.97	125.90	134.13	12.17	327.83
6	62.07	267.67	110.63	142.57	17.03	329.73

Tabla 2. Composición de la muestra de FOS, con el empleo de azúcar crudo como sustrato

Sustrato: Azúcar crudo						
Tiempo (h)	Concentración de cada componente en la mezcla (g/L)					
	nistosa	kestosa	sacarosa	glucosa	fructosa	FOS
1	3.23	166.53	354.97	65.53	9.77	169.77
2	11.10	232.93	257.63	91.80	6.57	244.03
3	22.07	271.33	181.67	114.93	10.03	293.40
4	38.20	278.10	143.97	126.20	13.50	316.30
5	51.47	263.87	125.63	141.23	17.80	315.33
6	73.87	255.33	107.20	146.77	16.87	329.20

Tabla 3. Composición de la muestra de FOS, con el empleo de licor decolorado como sustrato

Sustrato: Licor decolorado						
Tiempo (h)	Concentración de cada componente en la mezcla (g/L)					
	nistosa	kestosa	sacarosa	glucosa	fructosa	FOS
1	5.67	146.27	370.33	70.47	7.23	151.93
2	7.73	226.27	273.37	85.60	7.00	234.00
3	14.83	270.00	198.30	106.77	10.10	284.83
4	26.20	283.33	157.03	121.57	11.93	309.53
5	37.97	280.30	131.27	136.57	13.93	318.27
6	50.97	276.07	117.57	140.50	14.90	327.03

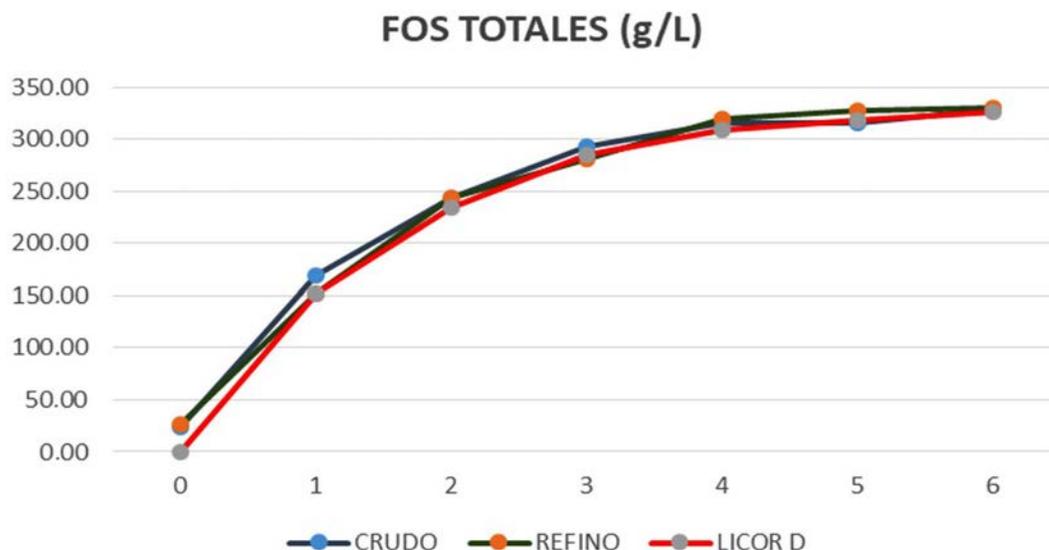


Figura 1. Comportamiento de la concentración de FOS en el tiempo, para cada materia prima empleada.

Las reacciones de síntesis tanto para refinado crudo como licor decolorado lograron producir fructo-oligosacáridos (1 kestosa y nistosa) con comportamientos similares y lograr, a las 6 horas, una media concentración de 328.65 g/L, para un rendimiento de 54.77 %.

El consumo de sacarosa varió por hora y se notó un mayor consumo en las tres primeras horas. El consumo total de sacarosa fue, como media, de 81.36 % de la sacarosa inicial, de los cuales el 68 % fue consumido en las tres primeras horas y el 13.36 restante en las últimas tres horas.

Específicamente, el comportamiento de la kestosa puede verse en la figura 2, en la que se muestra que los máximos se obtuvieron a las 4 horas y en la que se representa, en la mezcla, una media de 282 g/L, equivalente a un 47 %.

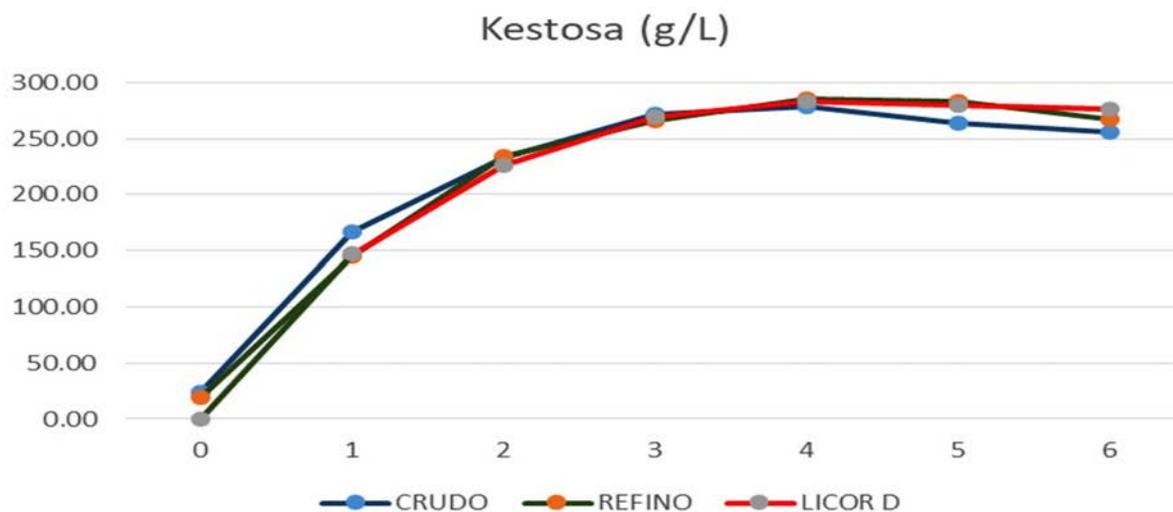


Figura 2. Comportamiento de la concentración de kestosa en el tiempo, para cada materia prima empleada.

Los perfiles por HPLC, para cada sustrato, se muestran en las figuras 3, 4 y 5.

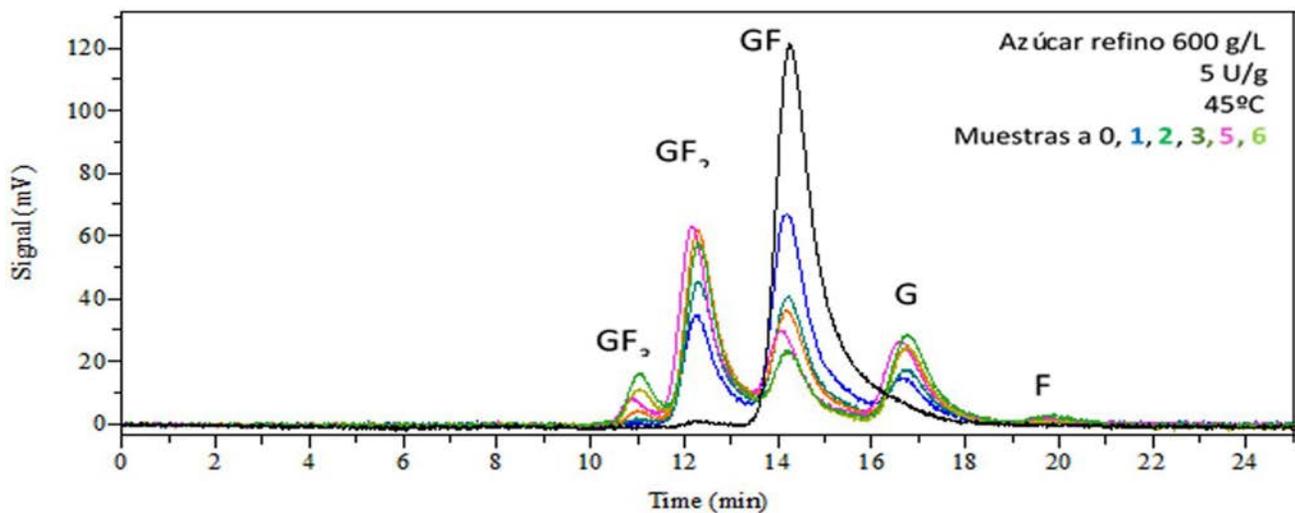


Figura 3. Curvas de las mediciones por HPLC de la síntesis, con azúcar refinado como sustrato.

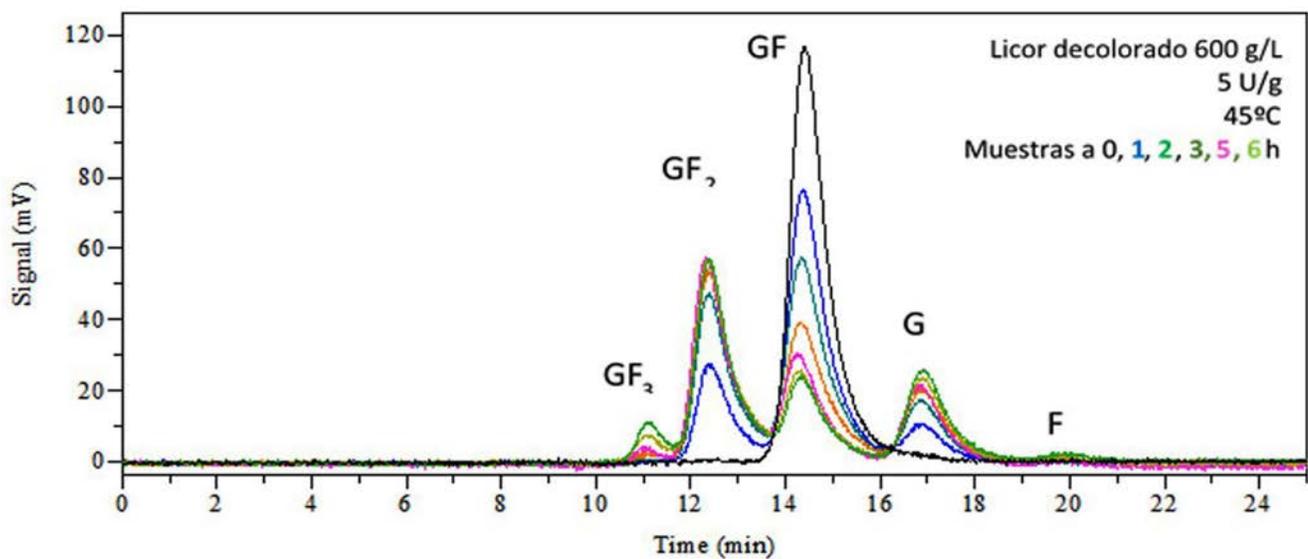


Figura 4. Curvas de las mediciones por HPLC de la síntesis, con licor decolorado como sustrato.

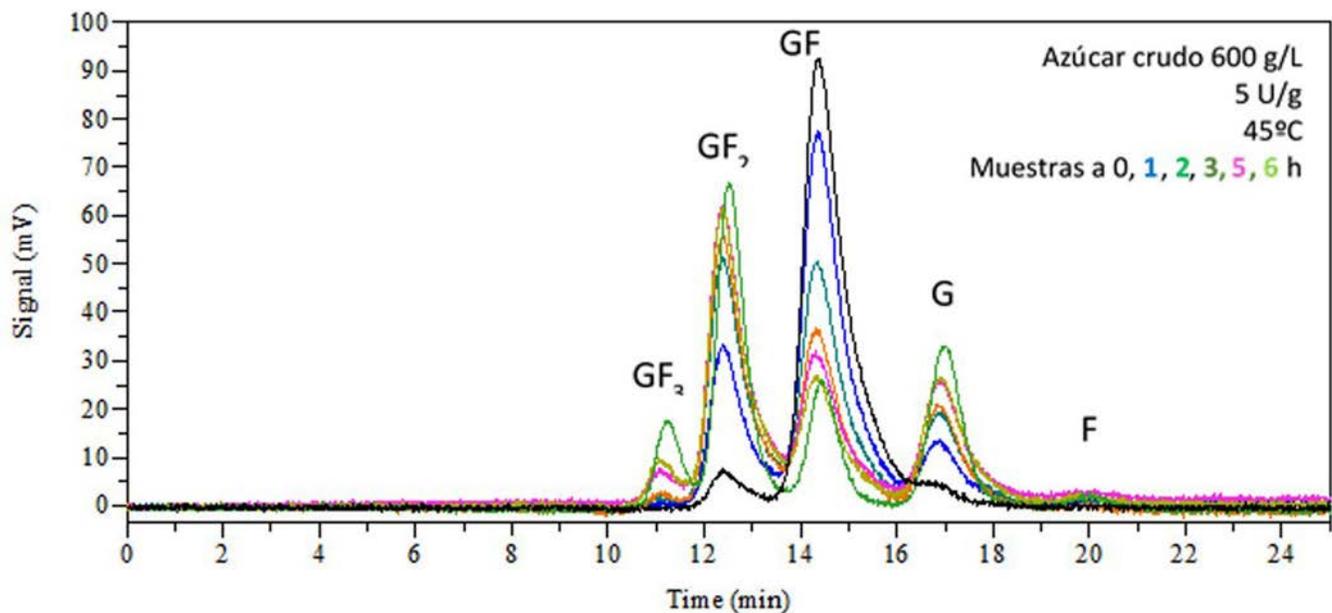


Figura 5. Curvas de las mediciones por HPLC de la síntesis, con azúcar crudo como sustrato.

Se realizó una caracterización físico-química de los jarabes resultantes de las síntesis, con cada materia prima, con el objetivo de buscar cambios significativos en alguno de ellos. La variable con un cambio significativo fue la variable Color, con mayor incidencia la del azúcar crudo, pues las materias primas tienen valores diferentes. La tabla 4 muestra los valores de color de cada una de las materias primas de partida y los colores de los jarabes resultantes.

Tabla 4. Variaciones en los colores de los licores, a partir de los colores de las materias primas empleadas

Color (UI)	Azúcar crudo	Azúcar refino	Licor decolorado
Materia prima	1210	219	242
Licor resultante	602	152	223

Los siropes FOS, al 55 % comerciales, tienen colores del orden de 50 y hasta 200 UI. Los jarabes FOS al 55 %, producto de los 3 lotes realizados en la industria, en la Planta de Sorbitol, en el año 2018 reportaron, luego de pasar por el tratamiento de carbón activado y la concentración a 75 grados Bx, valores de 57.63 y 127 UI (10). De igual forma se reporta que una muestra de jarabe de FOS, con pureza 55 %, procedente de China, de la Empresa Quantum Hitech Biotechnology, tiene valor de 194 UI de color.

Considerando estos resultados de la prueba industrial y de los siropes comerciales, el licor resultante del azúcar crudo no cumple con los requisitos, aunque debe primero estudiarse el impacto de las etapas posteriores del proceso, hasta llegar al producto final.

Si se tienen en cuenta los resultados obtenidos en los lotes de la prueba industrial realizada en el año 2018, puede estimarse que el tratamiento con carbón disminuyó el color en 3.54 veces y la concentración hasta Bx de 75 lo aumentó en 1.81 veces; por su importancia, los valores esperados de color en la industria, con el empleo de estas materias primas, se expresan en la tabla 5:

Tabla 5. Colores esperados en las diferentes etapas del proceso

Jarabes FOS diferentes materias primas	Color (UI) jarabe reacción	Color (UI) jarabe carbón activado	Color (UI) jarabe concentrado
Jarabe FOS de azúcar refino	152	43	77.7
Jarabe FOS de licor decolorado	223	63	114
Jarabe FOS de azúcar crudo	602	170	308

Por los datos que muestra la tabla 5 se infiere que los colores de los jarabes del azúcar refino y del licor cumplirían los estándares internacionales en el parámetro Color, pues este disminuye a valores en rango con el tratamiento con carbón activado, pero en el caso del jarabe procedente de la síntesis, a partir de azúcar crudo, se hace necesario estudiar, a nivel de laboratorio, la etapa de filtración con carbón activado para buscar mayores remociones de color o estudiar otros procesos que pudieran ser con membranas de osmosis inversa, nanofiltración y ozonización, como etapas adicionales al proceso.

CONCLUSIONES

- Puede producirse FOS con mezclas de diferentes materias primas azucaradas como: azúcar refino, azúcar crudo y licor decolorado de refinería.

- Se obtuvieron niveles similares de concentración de FOS en la mezcla resultante para cada materia prima, con una media de 328.65 g/L para un rendimiento medio de 54.77 %, a las 6 horas de reacción.
- Los FOS, a partir de azúcar crudo, tienen valores de color superiores a los comerciales por lo que se necesita estudiar un proceso de mayor remoción de color para esta materia prima.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rastall B, Gibson G (2006) Prebiotics: Development and application, Great Britain:Wiley Publisher/2006.
2. Khatun M. S, Hassanpour M., Mussato S I. *et al.* "Transformation of sugarcane molasses into fructooligosaccharides with enhanced prebiotic activity using whole-cell biocatalysts from *Aureobasidium pullulans* FRR 5284 and an invertase-deficient *Saccharomyces cerevisiae* 1403-7A". Bioresources and Bioprocessing Journal V 8, Article number: 85 (2021).
3. Shin H. T., Baig S., Won Lee S., Suh D. S. "Production of fructooligosaccharides from molasses by *Aureobasidium pullulans* cells" Bioresource Technology 93(1):59-62. June 2004.
4. Zhang S., Jiang H., Xue S., Ge N., Sun Y., Chi Z., Liu G., Chi Z. "Efficient Conversion of Cane Molasses into Fructooligosaccharides by a Glucose Derepression Mutant of *Aureobasidium melanogenum* with High β -Fructofuranosidase Activity". Journal of Agricultural Food Chemistry. 2019 Dec 11; 67(49)
5. Ghazi I., Fernández I., Gómez A., Alcalde M., Plou F., Ballesteros A., "Beet sugar syrup and molasses as low-cost feedstock for the enzymatic production of fructo-oligosaccharides", *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54, 8, 2964–2968.
6. Worrapat Chaisuwan, Apisit Manassa, Yuthana Phimolsiripol, Kittisak Jantanasakulwong, Thanongsak Chaiyaso, Wasu Pathom-aree , SangGuan You and Phisit Seesuriyachan. Integrated Ultrasonication and Microbubble-Assisted Enzymatic Synthesis of Fructooligosaccharides from Brown Sugar. Foods No. 9, Diciembre, 2020.
7. Gerhardt Coetzee*, Eugéne van Rensburg, Johann F. Görgens .Evaluation of the performance of an engineered β -fructofuranosidase from *Aspergillus fijiensis* to produce short-chain fructooligosaccharides from industrial sugar streams. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2020.
8. Pérez E. R; Martínez D.; Menéndez C; Alfonso D., Rodríguez I.; Trujillo L. E.; Sobrino A.; Ramírez R.; Pimentel E., Hernández L. Fructooligosaccharides production by immobilized *Pichia pastoris* cells expressing *Schedonorus arundinaceus* sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2021.
9. Pérez, S Fernando, Fernández A Francisco. "Métodos analíticos para azúcares blancos". Noviembre 2006. "Métodos analíticos para azúcar crudo". Noviembre 2006.
10. Capote O., Pérez E. R, Fonte A. Alfonso M., Caballero A., Ángel Marshall A., Delgado E., Consuegra R., Martínez Y., González G. "Estudio del escalado de la producción de fructo-oligosacáridos (FOS) a nivel industrial en la planta de sorbitol". ICIDCA sobre los derivados de la caña de azúcar 52 (2) mayo-agosto, 2018..