

Panorámica sobre la síntesis enzimática de fructooligosacáridos, a partir de materias primas azucaradas

Elianne Bell-Anaya^{1*}, Julio César Dustet-Mendoza², Liney González Martínez¹, Odalys Capote-Peña¹

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

Vía Blanca, No. 804 y Carretera Central, San Miguel del Padrón. La Habana, Cuba

2. Universidad Tecnológica de La Habana José Antonio Echeverría (CUJAE)

Ave 114, No. 11901 e/ 119 y 127, Marianao. La Habana, Cuba

*eliannebell20@gmail.com

RESUMEN

Introducción. Los fructooligosacáridos son fructanos de bajo peso molecular que se encuentran en varios vegetales, pueden aplicarse como prebiótico, fibra dietética y edulcorante. Se realizó una búsqueda bibliográfica sobre las tecnologías para su obtención, a partir de azúcar refino, azúcar crudo, meladura, miel A y miel final. Las tecnologías presentadas posibilitan obtener los fructooligosacáridos y disminuir sus costos de producción.

Objetivo. Presentar una panorámica de los fructooligosacáridos, sus aplicaciones, tecnologías y los principales resultados obtenidos en la evaluación de varias materias primas azucaradas.

Conclusiones. Se pueden producir fructooligosacáridos a partir de otras materias primas azucaradas, aunque con rendimientos menores o similares a los reportados con azúcar refino y deberá evaluarse si son económicamente factibles para llevar a escalas superiores.

Palabras clave: fructooligosacáridos, síntesis enzimática, materias primas azucaradas.

ABSTRACT

Introduction: Fructooligosaccharides are low molecular weight fructans and can be found in various vegetables. Its properties lead it to be applied as a prebiotic, dietary fiber and sweetener. In the search for a decrease in their production costs, other sugary raw materials such as raw sugar, concentrated juices and intermediate and final molasses have been studied.

Objective. To present an overview of fructooligosaccharides, their applications, technologies and the main results obtained in the evaluation of several sugar raw materials.

Conclusions. The research indicated that fructooligosaccharides can be produced from other sugar raw materials, although with lower or similar yields to those reported with refined sugar and that they should be evaluated if they are economically feasible to take to higher scales.

Keywords: fructooligosaccharides, enzymatic synthesis, sugar raw materials.

INTRODUCCIÓN

Los fructooligosacáridos son considerados oligosacáridos no digeribles, presentan como fórmula general GF_n, que indica la presencia de varias unidades de fructosa unidas a una glucosa terminal o FF_n que contiene unidades de fructosa unidas entre sí, por enlaces glicosídicos β-(2→1) o β-(2→6). Los más comunes en la naturaleza son el trisacárido 1-kestosa (GF₂), el tetrasacárido nistosa (GF₃)

y el pentasacárido fructosilnístosa (GF₄) (1, 2); el GF₂ es el de mayor interés comercial por su doble efecto de edulcorante hipocalórico y prebiótico, así como su posible uso como azúcar para diabéticos (3).

Los efectos beneficiosos de los FOS, como prebióticos, son atribuidos a un incremento de la flora, principalmente, bifidogénica (4), estos se producen bajo condiciones de control, con el empleo de enzimas con actividad fructosiltransferasa y sacarosa como sustrato. La producción industrial de FOS, mediante transfructosilación de la sacarosa, emplea como materia prima fundamental el azúcar refino tanto de caña de azúcar como de remolacha. A partir de la selectividad de las enzimas empleadas por la sacarosa se ha estudiado, a escala de laboratorio, el empleo de otras materias primas azucaradas, como azúcar crudo, jugos concentrados (meladura), mieles intermedias y mieles finales. El presente trabajo muestra una panorámica de los FOS, sus aplicaciones, tecnologías y los principales resultados obtenidos en la evaluación de varias materias primas azucaradas con diversos microorganismos y enzimas.

Propiedades biofuncionales y aplicaciones de los fructooligosacáridos

Los efectos beneficiosos de los FOS como prebióticos son atribuidos a un incremento de la flora, principalmente bifidogénica y se dividen en tres acciones: inmunoprotectora, metabólica y nutricional, ya que favorecen la síntesis de algunas vitaminas como B6, B12, biotina, ácido fólico, ácido pantoténico y la síntesis de aminoácidos (4).

Los FOS no se degradan ni se absorben en el tracto gastrointestinal superior, de tal forma que llegan intactos al colon, donde son metabolizados por la microbiota intestinal. La configuración β en posición (2→1) y (2→6) del carbono anomérico de la fructosa los hace resistentes a la hidrólisis por las enzimas digestivas humanas (5). Al llegar al intestino grueso son utilizados como fuente de carbono, de manera selectiva, por bifidobacterias y lactobacilos que conduce, por exclusión competitiva, a una disminución de las poblaciones de los microorganismos patógenos *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* y *Salmonella sp.*, lo que permite reducir la necesidad del empleo de antibióticos (6, 7).

La fermentación de los FOS produce ácidos grasos de cadena corta (AGCC), estos son absorbidos y modifican la composición lipídica de la sangre, lo que contribuye a la reducción de sus niveles de colesterol (2). La presencia de estos ácidos grasos disminuye el pH del medio intestinal, esto favorece la absorción de Fe, Mg y Ca. El incremento en la absorción de minerales, especialmente el calcio, permite un aumento de la mineralización de los huesos. Este efecto es importante en la prevención de enfermedades como la osteoporosis (8).

El aporte energético de los FOS que alcanzan el colon está entre 1 – 2.5 cal/g, hecho que depende del grado de fermentabilidad del tipo de GFs, ya que no todas las fibras producen la misma cantidad de AGCC. Por otro lado, algunos estudios realizados en animales de experimentación demostraron que el consumo de grandes cantidades de FOS disminuye la actividad glucuronidasa beta, enzima del intestino que puede convertir los procarcinógenos en carcinógenos (1). Al ser una fibra dietética, los FOS permiten el alivio de enfermedades como el estreñimiento.

Por sus propiedades como edulcorantes de bajo aporte calórico, los FOS ayudan en la prevención de diferentes enfermedades cardiovasculares e hipertrigliceridemia, asociadas a dietas hipercalóricas. Al mismo tiempo, al no aportar calorías disminuye el riesgo a desarrollar enfermedades como la obesidad y diabetes tipo II (9).

El reconocimiento de los FOS, como ingredientes GRAS en Estados Unidos y como FOSHU en Japón ha permitido que actualmente se utilicen sin restricciones en un gran número de alimentos, como: yogures, bebidas, galletas, cereales, productos de bollería y que formen parte de alimentos simbióticos y en la industria farmacéutica (5).

Tecnologías para la obtención de fructooligosacáridos

En la naturaleza las principales familias de especies vegetales que incluyen a los fructanos en su composición son las *Liliaceae*, *Gramineae*, *Poaceae* y *Solanaceae*, por ello es que podemos encontrar FOS en alimentos como el trigo. Las gramíneas contienen entre 0.38 g/100g y 0.96 g/100g de oligofructanos (10). Además, encontramos una significativa cantidad de fructanos en: ajo (*Allium sativum* L.), cebolla (*Allium cepa* L.), cebada (*Hordeum distichum*, *Hordeum tetrastichum*), maní (*Arachis hypogaea* L.), espárrago (*Asparagus officinalis* L.) y banana (*Musa sp.*). En estos vegetales los fructanos presentan entre 1 y 1.5 kcal/g. Sin embargo, se encuentran mayores concentraciones de FOS en diversos vegetales como achicoria (*Cichoriu mintybus*), alcachofa (*Cynaras colymus*), alcachofa de Jerusalén (*Helianthus tuberosus*), alcachofa globo (*Cynara cardunculus*) y yacón (*Smallanthus sonchifolius*), entre otros (1). La extracción de los oligosacáridos a partir de plantas o la utilización de sus enzimas no resulta rentable, debido a que se dependen de su ciclo estacional; además, se extraen pocas enzimas y el rendimiento de las síntesis es bajo (11).

Los FOS también pueden ser producidos por hidrólisis enzimática de polímeros de fructosa, como la inulina (12) o por reacciones de transfructosilación, a partir de la sacarosa, por enzimas con actividad fructosiltransferasa (FTFs). Ambas tecnologías dan lugar a una mezcla de FOS, que varía su grado de polimerización (GP) de 2 a 10, cuyos principales componentes son: 1-kestosa (GF₂), nistosa (GF₃), fructosilnistosa (GF₄), bifurcosa (GF₃), inulobiosa (F₂), inulotriosa (F₃) e inulotetraosa (F₄) (7).

En la hidrólisis enzimática de la inulina se emplean endoinulinasas que actúan de forma aleatoria e hidrolizan los enlaces β-2.1 de la inulina para producir FOS, que contienen una mezcla de β-D fructosa (2→1)-[β-D-Fru-(2→1)-]n, donde n=1-9, y α-D-Glu-(1→2)-[β-D-Fru-(2→1)-]n, donde n=2-9. Estos últimos tienen la misma estructura que los obtenidos mediante transfructosilación de la sacarosa mediante FTFs. Sin embargo, la longitud de la cadena de los FOS es más larga cuando se forman por hidrólisis con la inulinasas que cuando se producen por el proceso de transfructosilación (13).

La reacción de transfructosilación a partir de la sacarosa se divide en dos fases.

- Fase 1. Se Parte de la molécula de sacarosa, la enzima rompe el enlace glucosídico para obtener la molécula de fructosa aislada, como se muestra en la figura 1.
- Fase 2. Se transfiere la fructosa liberada a una molécula aceptora (sacarosa o un FOS), mediante una reacción de transglucosidación, reflejado en la figura 2.

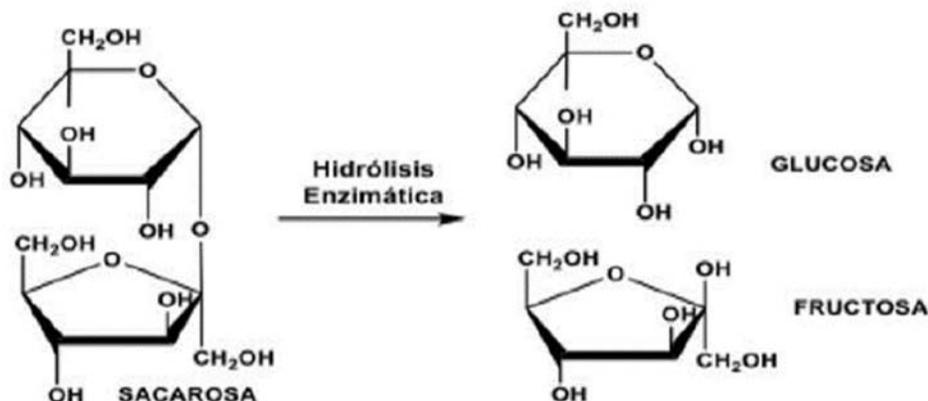


Figura 1. Hidrólisis de la sacarosa por acción enzimática (14).

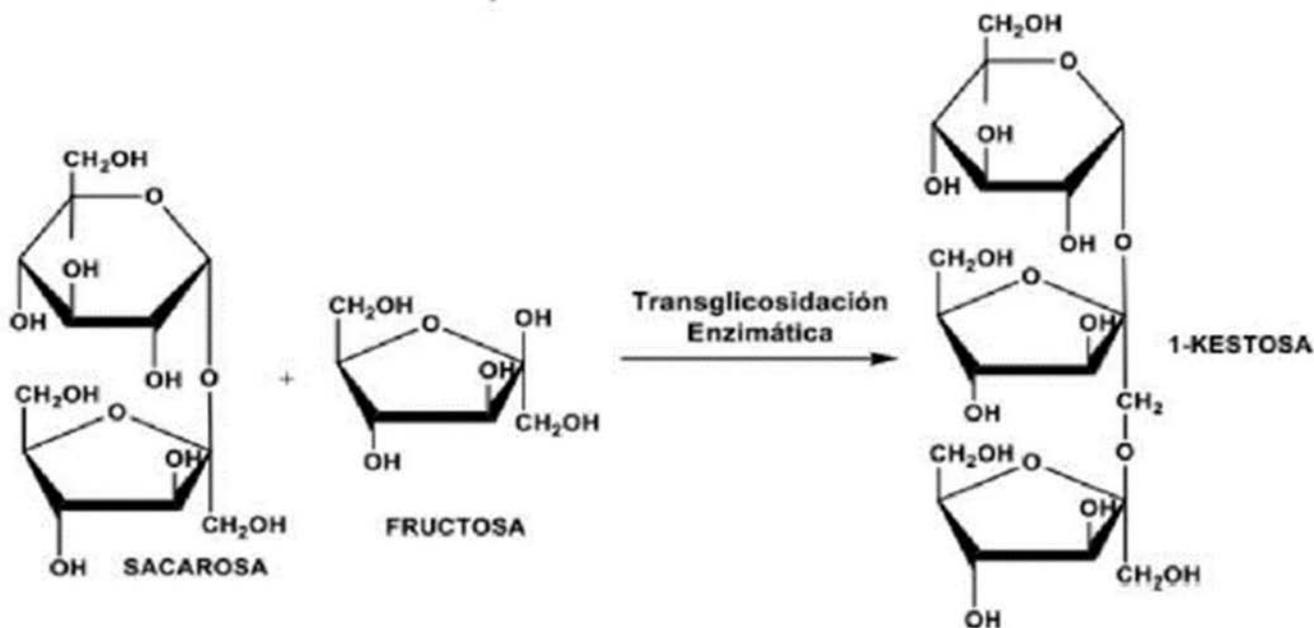


Figura 2. Transglucosidación de una molécula de fructosa libre por acción enzimática a una sacarosa que actúa como aceptor (14).

En esta tecnología de transfructosilación no se transforma toda la sacarosa en fructooligosacáridos, ya que se obtienen mezclas formadas por los fructooligosacáridos, sacarosa, glucosa y fructosa.

Síntesis enzimática de fructooligosacáridos, con el empleo de azúcar refinado como sustrato

Se estudió la actividad transfructosiladora del preparado comercial Pectinex Ultra SP-L, de *Aspergillus aculeatus*, que se mezcló con los soportes a base de polimetacrilato, Sepabeads EC-EP3 o EC-EP5, para la inmovilización covalente de la fructosiltransferasa. Para la producción de fructooligosacáridos se añadió 0.3 U/mL de biocatalizador soluble o inmovilizado a una solución que contenía 630 g/L de sacarosa en tampón de acetato sódico de 50 mM (pH=5.6). El volumen total de reacción fue de 5.0 mL. La mezcla fue incubada a 60 °C en un termomezclador a 1000 min⁻¹, de la cual se extrajeron a diferentes tiempos alícuotas de 40 µL que fueron incubadas 5 min, a 90 °C para inactivar la enzima. El progreso de la reacción fue bastante similar para ambos biocatalizadores inmovilizados, aunque fue ligeramente más rápida con Sepabeads EC-EP5, probablemente debido a que sus poros son más anchos y tienen mayor volumen, lo que mejora la difusión interna de sustratos y productos. La concentración de FOS para EC-EP5 alcanzó un valor máximo de 387 g/L, a las 36 h (240 g/L de 1-kestosa, 144 g/L de nistosa y 3 g/L de fructosilnistosa). A este tiempo de reacción el porcentaje de FOS era de 61.5 % (p/p) del total de carbohidratos en la mezcla (15).

Igualmente se desarrolló y patentó un biocatalizador no fúngico, que convierte la sacarosa de manera eficiente en fructooligosacáridos de cadena corta, específicamente la 1-kestosa. La enzima seleccionada es la sacarosa: sacarosa 1-fructosiltransferasa (1-SSTrec) de origen vegetal expresada constitutivamente a niveles altos en *Pichia pastoris*. La reacción se llevó a cabo en un reactor encaquetado tipo tanque agitado, en el que la concentración de sacarosa fue de 600-800 g/l, pH 5.5 a 25 °C. Una vez alcanzada la temperatura de 45 °C se le adicionó 1-SSTrec, a razón de 900-6000 U/L y se mantuvo la agitación controlada. Se alcanzó un rendimiento máximo entre 55 y 60 % de FOS, con la particularidad de que la concentración de 1-kestosa fue superior al 50 % de carbohidratos totales presentes en la mezcla y más del 90 % entre los FOS (3, 7).

Síntesis enzimática de fructooligosacáridos, con el empleo de azúcar crudo como sustrato

Se reportan pocos trabajos que empleen azúcar crudo, entre ellos el estudio de la producción de fructooligosacáridos bajo técnicas de ultrasonidos combinados con microburbujas y demostró que podía aumentar la actividad enzimática en un 366 % y disminuir el tiempo de reacción en un 60 %. El azúcar crudo se disolvió en un tampón de acetato sódico 0.1 M (pH 6.5), con una concentración final de 70 % (p/v), la solución de 98 mL se incubó a 55 °C, durante 1-2 h y luego se añadió la enzima Pectinex Ultra SP-L con un volumen final de 100 mL. Se aplicaron los ultrasonidos y las microburbujas y se detuvo la reacción por incubación en agua hirviendo, a lo cual se le determinó el contenido de FOS por HPLC. En un tiempo de 4 h se obtuvo una concentración de FOS de 0.45 g/g de sustrato para el azúcar crudo y a las 6 h una concentración de 0.58 g/g de sustrato para el azúcar refinado. A pesar de que el azúcar crudo tuvo el más bajo rendimiento de FOS se logró la reacción en un tiempo más corto (16).

Síntesis enzimática de fructooligosacáridos, con el empleo de meladura como sustrato

Se reportan en la literatura estudios en los que se utiliza jugo de caña concentrado a 70 °Bx como sustrato, con el empleo de células permeabilizadas de levadura *Cándida apícola*. Las condiciones a nivel de laboratorio, para un volumen de operación de 5 L, fueron: 60 °C, 7 U/g de concentración de enzima para un tiempo de reacción de 12 h y 150 min⁻¹ de agitación.

A partir de los datos de laboratorio se hizo un escalado de las reacciones de síntesis de FOS a nivel piloto, utilizando un modelo empírico híbrido. Se conservaron ciertos parámetros de similitud para mantener una relación entre el reactor modelo y el reactor a escala. Estos parámetros fueron de similitud mecánica, ya que se mantuvo una relación de potencia volumétrica; de similitud térmica, debido a que se conservó la misma temperatura para las reacciones de síntesis; y de similitud química, por lo que se mantuvo una relación estable de enzima-sustrato, con 7 U de actividad enzimática por gramos de sacarosa. Estas células se adicionaron al reactor con una capacidad de 150 L y un volumen de operación de 100 L, que contenía el sustrato de jugo de caña de azúcar concentrado. Las reacciones tuvieron una duración de 10 h y se realizaron dos reacciones de síntesis con diferentes revoluciones o velocidades de agitación: 70 y 85 min⁻¹. De acuerdo con el muestreo realizado durante la reacción y al final de esta, se determinó la cinética de la síntesis de FOS y de la concentración de azúcares presentes, esto mediante análisis por HPLC (17).

Para la reacción de síntesis realizada a 70 min⁻¹ se obtuvo 25.92 g/L de FOS y en el segundo caso, a 85 min⁻¹, se obtuvo 45.53 g/L de FOS. En ambas reacciones hubo síntesis de fructooligosacáridos; sin embargo, se puede apreciar que, en la reacción de síntesis realizada a 85 min⁻¹, la concentración de FOS es superior a los 40 g/L, mientras que en la primera reacción no alcanza los 30 g/L. Esto se atribuye a que la velocidad de agitación influye directamente en la velocidad de transferencia de masa por lo que, en este caso, a mayores revoluciones y a mayor convección se da un mejor intercambio de materia que concluyo con una mayor síntesis (18); sin embargo, al aumentar las revoluciones por min en el reactor, no siempre se asegura un aumento de transferencia de masa (19), por ello se deben realizar pruebas para verificar la velocidad máxima de operación (17).

Se sintetizó FOS a partir de una meladura preparada en el laboratorio con tallos enteros de la variedad de caña de azúcar Tebu telur. A los tallos se les extrajo el zumo con el empleo de una trituradora eléctrica de dos rodillos. Este se filtró en un paño de muselina y se transfirió a un recipiente abierto para evaporar, sin adición de cal ni otros productos químicos. El proceso de concentración se controló hasta 68-75 °Brix y luego se conservó a 4 °C hasta su utilización. Para la síntesis de FOS, el pH se ajustó inicialmente a 5.5 con 1M NaOH, se añadió la enzima Viscozyme L en una mezcla de reacción total de 25 mL, a 50 °C y 100 rpm de agitación, durante 6 h. Después se procedió a inactivar la enzima a 100 °C durante 2 min. Como control se utilizó una concentración

equivalente de sacarosa al 10 % (v/v) y se obtuvo una concentración óptima de FOS de 21.28 g de FOS/100 g de sacarosa, con lo cual se alcanzó 1.80 % (v/v) de meladura y 4 % (v/v) de enzima (20).

También se han realizado estudios con meladura de remolacha, como en el caso de una meladura procedente de Azucarera Ebro, en Valladolid, España, con una presencia inicial considerable de FOS (17.1 %). Esta materia prima fue diluida con agua destilada y se empleó como biocatalizador pectinasa comercial (Pectinex Ultra SP-L, de *Aspergillus aculeatus*) caracterizada por una actividad transfructosiladora. El biocatalizador se añadió, soluble o inmovilizado, a la meladura diluida, previamente filtrada a través de un filtro de microfibra de vidrio. El volumen de reacción fue de 5 mL. Pectinex Ultra SP-L se añadió hasta una actividad final en la mezcla de 5 U/mL. Las mezclas se incubaron a 60 °C en un agitador orbital a 200 min⁻¹, durante 24 h. La producción de FOS aumentó del 30.6 al 36.4 % al pasar del pH inicial (7.5) al pH 5.5 (mediante la adición de ácido acético glacial). Para obtener una mezcla eficiente se utilizaron diluciones (1:1.2) de meladura y se alcanzó un valor máximo de 388 mg/mL (56.0 %) de FOS al cabo de 30 h y de 1-kestosa se obtuvo 228 mg/mL. Después de 140 h, la reacción se aproximaba al equilibrio, con un porcentaje de FOS de 49 % (21).

Síntesis enzimática de fructooligosacáridos, con el empleo de miel A como sustrato

También se han realizado estudios de laboratorio con mieles A y con mieles producto de la refinación del azúcar (22), en los que se comparó la enzima β -fructofuranosidasa de ingeniería, GAPfopA_V1, con la enzima nativa, GAPfopA, producidas por dos cepas recombinantes de *P. Pastoris*, para obtener FOS de cadena corta. Los sustratos se diluyeron al 60 % (p/v) de sacarosa en agua de ósmosis inversa, se equilibró a la temperatura óptima de 62 °C, durante 2 min, con un baño de agua de temperatura controlada con un agitador orbital ajustado a 120 min⁻¹. Se añadieron los sobrenadantes que contenían las enzimas con una dosis de 10 U/g de sacarosa, durante 12 h de reacción y pH 5.00-6.00. En este estudio se variaron los tiempos de reacción para llegar a una mezcla con un 55 % de FOS (37 % GF2, 53 % GF3 y 10 % GF4, con respecto al 100 % de los FOS obtenidos en la mezcla).

Ninguna de las enzimas produjo la composición de FOS requerida cuando se emplearon mieles de refinación como sustrato, lo contrario ocurrió con la miel A, que alcanzó la composición deseada. Los autores atribuyeron este resultado a un efecto del pH, pues el óptimo para las β -fructofuranosidasas oscila entre 5.00 y 6.00 (23). El pH en las mieles de refinación se mantuvo en 4.50 durante toda la reacción y en la miel A osciló entre 5.68 y 5.47, al final de la reacción; por lo tanto, es concebible que el pH más bajo de la miel de refinación fuera responsable de los peores resultados de la enzima, además de otros elementos que la pueden inhibir como las cenizas y diversas trazas de metales (Al, Cu, Fe, Mg, Mn y Zn) (24).

Síntesis enzimática de fructooligosacáridos, con el empleo de miel final como sustrato

Se reporta en el laboratorio la producción de FOS, a partir de mieles finales de caña de azúcar, mediante células *Aureobasidium pullulans* FRR 5284 con enzimas transfructosiladoras intracelulares, que diluyen la miel hasta una concentración total de azúcar de 333 g/L, equivalente de sacarosa; (255 g/L de sacarosa, 42 g/L de glucosa y 33 g/L de fructosa), aunque los FOS se podían obtener a 800 g/L de sacarosa, la miel era muy viscosa y tenía que diluirse. La reacción se llevó a cabo a una temperatura de 55 °C, 100 min⁻¹, durante 12 h en una solución de 50 ml que contenía 300 g/L de azúcares (232 g/L de sacarosa) y 5 g/L de células. Esto condujo a un 43 % de FOS en la primera hora, lo que aumentó gradualmente hasta alcanzar el valor más alto de 59 %, a las 9 h.

Con el propósito de consumir monosacáridos (glucosa y fructosa) en la mezcla obtenida se utilizó *Saccharomyces cerevisiae*, deficiente en invertasa y convirtió la glucosa en etanol y ácido acético. Con esto se logró aumentar el rendimiento de FOS entre 63 y 87 % (25).

También se cultivaron tres cepas de diferentes de *Aureobasidium pullulans* KCCM 12017, con el empleo de miel final como fuente de sacarosa. El sustrato se diluyó de 800 g/L a 360 g/L de sacarosa y la reacción se llevó a cabo bajo las condiciones: 55 °C y pH 5.5, durante 24 h en tubos de ensayo (26). El total de FOS formado al cabo de 24 h de incubación fue de 166 g/L, por lo que el total de FOS formado representaba el 46 % de la sacarosa como sustrato en la miel.

Algunos autores refieren tratamientos a la miel final. Se reporta la conversión de miel final en FOS con el empleo de células enteras del mutante D28 de *Aureobasidium melanogenum* con alta actividad β -fructofuranosidasa. Para el tratamiento, al sustrato se le añade 1 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) durante 12 h, a temperatura ambiente, con el propósito de ligar los metales pesados. Después se centrifugó a 12.000 g durante 5 h y, posteriormente, se le añadió una cantidad adecuada de carbón activado (1.5 % p/v) a los sobrenadantes obtenidos, para eliminar aún más el color en ellos (27). Las células enteras del *Aureobasidium melanogenum* se suspendieron en un buffer de acetato de sodio-ácido acético de pH 4.5 con 350 g/L de sacarosa en la miel. Las reacciones se llevaron a cabo a 50 °C y 100 min⁻¹, durante 5 h. La dosis enzimática más adecuada fue de 375 U/g de sacarosa en la miel y la concentración inicial de sacarosa en la miel fue 35 % (p/v). Finalmente, se obtuvo 0.58 g de FOS/g de sacarosa y los porcentajes de GF₂, GF₃ y GF₄ fueron: 38.7; 49.3 y 12 % respectivamente, a las 4 h de reacción.

Se han realizado estudios con mieles finales de remolacha y, como biocatalizador, pectinasa comercial (Pectinex Ultra SP-L, de *Aspergillus aculeatus*). La concentración inicial del sustrato fue de 570 mg/mL de sacarosa, bastante viscosa, por lo que se diluyeron al añadir agua destilada. El volumen de reacción fue de 5 mL. El biocatalizador se añadió hasta una actividad final en la mezcla de 5 U/mL. Las mezclas se incubaron a 60 °C en un agitador orbital, a 200 min⁻¹, durante 24 h. La producción de FOS aumentó del 3.5 al 14.8 % al bajar el pH de 8.9 a 5.5 (mediante la adición de ácido acético glacial). Para obtener una mezcla eficiente se utilizaron diluciones (1:1.2) de miel y se alcanzó un valor máximo de 235 mg/mL (49.2 %) de FOS, al cabo de 65 h y de 1-kestosa se obtuvo 62 mg/mL. Después de 140 h, la reacción se aproximaba al equilibrio, con un porcentaje de FOS de 42 % (21).

CONCLUSIONES

1. Las propiedades biofuncionales de los FOS han motivado nuevas investigaciones y producciones comerciales de estos prebióticos.
2. La tecnología establecida emplea azúcar refino como sustrato, se comercializan productos en forma de siropes y en polvo con un 55 y 95 % de pureza, respectivamente. Las investigaciones realizadas, a partir de otras materias primas azucaradas han demostrado que se pueden producir fructooligosacáridos, aunque con rendimientos menores o similares a los reportados con azúcar refino y en mayor tiempo, estos resultados deberán evaluarse para saber si son económicamente factibles llevarlos a escalas superiores.
3. La presencia de glucosa, cenizas, metales pesados y otros compuestos en las materias primas azucaradas como meladura, miel A y miel final tanto en azúcar de caña como de remolacha se han correlacionado con los bajos rendimientos, por la inhibición de la actividad transfructosiladora de las enzimas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Peña, C. *Síntesis enzimática de fructooligosacáridos a partir de los frutos de algarrobo (Prosopis pallida)* [Trabajo de diploma]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos Universidad del Perú, Decana de América, 2022.

2. Rodríguez, O.; *et al.* Influencia de un sirope con prebióticos en el crecimiento de cultivos lácticos. *Cienc. Tecnol. Alim.* 2012 ,22(2):48-53.
3. Pérez, E.; *et al.* Método de obtención de 1-kestosa. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), assignee. Cuba patent PCT /CU2013/000005. 2014.
4. Meléndez, N.; *et al.* Compuestos prebióticos: de las moléculas al ser humano. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 2011, 31 : 6-12.
5. Corzo, N.; *et al.* Prebióticos; concepto, propiedades y efectos beneficiosos. *Nutrición hospitalaria*, 2015, 31 (1) :99-118.
6. Simmering, R.; Blaut, M. Pro- and prebiotics – the tasty guardian angels? *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001, 55 (1): 19-28.
7. Pérez, E. Producción sostenible de fructooligosacáridos (FOS) a partir de sacarosa usando enzimas de origen no fungoso [Trabajo de diploma]. Universidad Central Marta Abreu de las Villas, Facultad de Química Farmacia, Departamento de Ingeniería Química. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Sancti Spíritus, Sancti Spiritus, 2015.
8. Moriano, P. Síntesis enzimática de fructooligosacáridos estimuladores de la microbiota colónica. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*; 2015.
9. Moro, G.; *et al.* A mixture of prebiotic oligosaccharides reduces the incidence of atopic dermatitis during the first six months of age. *Archives of Disease in Childhood*, 2006, 91 (10): 814-9.
10. Villalobos, A. Perspectivas agroindustriales actuales de los oligofruetosacáridos (FOS). *Agronomy Mesoamerican*, 2006: 265-86.
11. Flores-Maltos, D.; *et al.* Biotechnological production and application of fructooligosaccharides. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2016, 36 (2): 259-67.
12. Bekers, M.; *et al.* Fructooligosaccharide and levan producing activity of *Zymomonas mobilis* extracellular levansucrase. *Process Biochemistry*, 2002, 38 (5): 701-6.
13. Fragoso, L. Obtención de inulina y oligosacáridos derivados de la alcachofa [Trabajo de diploma]. Universidad Autónoma de Madrid, España, 2016.
14. Caponi, J. Empleo de enzimas en la síntesis de prebióticos: Universidad Complutense; 2018.
15. Ghazi, I.; *et al.* Immobilisation of fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus* on epoxy-activated Sepabeads EC for the synthesis of fructo-oligosaccharides. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2005, 35: 19-27.
16. Chaisuwan, W.; *et al.* Integrated Ultrasonication and Microbubble-Assisted Enzymatic Synthesis of Fructooligosaccharides from Brown Sugar. *Foods*, 2020, 9 (12):1833.
17. Muñoz, E. Escalamiento del proceso de obtención de fructooligosacáridos a partir de jugo de caña mediante síntesis enzimática con células permeabilizadas de *Candida apícola*: Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del estado de ...; 2016.
18. Treybal, R. *Operaciones de Transferencia de Masa*. 2 ed. 1980. 858 p.
19. Villadsen, J.; Nielsen, J.; Lidén, G. Bioreaction engineering principles. Third ed: Springer Science & Business Media; 2011.
20. Hajar-Azhari, S.; *et al.* Novel fructooligosaccharide conversion from sugarcane syrup using a specialised enzymatic pH-stat bioreactor. *Process Biochemistry*, 2020, 95: 55-63.
21. Ghazi, I.; *et al.* Beet Sugar Syrup and Molasses as Low-Cost Feedstock for the Enzymatic Production of Fructo-oligosaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54 (8): 2964-8.
22. Coetzee, G.; van Rensburg, E.; Görgens, J. 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, 23: 101484.

23. Hirayama, M.; Sumi, N.; Hidaka, H. Purification and Properties of a Fructooligosaccharide-producing β -Fructofuranosidase from *Aspergillus niger* ATCC 20611. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1989, 53 (3): 667-73.
24. Teclu, D.; *et al.* Determination of the elemental composition of molasses and its suitability as carbon source for growth of sulphate-reducing bacteria. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 161 (2): 1157-65.
25. Khatun, M.; *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*, 2021, 8 (1): 85.
26. Shin, H.; *et al.* Production of fructo-oligosaccharides from molasses by *Aureobasidium pullulans* cells. *Bioresource Technology*, 2004, 93 (1): 59-62.
27. Zhang, S.; *et al.* Efficient Conversion of Cane Molasses into Fructooligosaccharides by a Glucose Derepression Mutant of *Aureobasidium melanogenum* with High β -Fructofuranosidase Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67 (49): 13665-72.