Contenido en carbohidratos (% sobre total de carbohidratos analizados) en las mezclas de reacción de pectina hidrolizada (1% y 5%, Viscozyme 15 U/mL, 24 h) en presencia de lactosa (10%) y lactosa sola (10%) con el preparado Biolactasa (0,7 U/mL) tras 1 y 24 h de reacción.

OBTENCIÓN DE PECTOOLIGOSACÁRIDOS DERIVADOS DE PECTINAS DE CÍTRICOS Y DE MANZANA UTILIZANDO EXTRACTOS ENZIMÁTICOS COMERCIALES

II Jornadas de Estudiantes de Máster en Química Agrícola y Nuevos Alimentos

Ferreira Lazarte, A.; Montilla, A.; Corzo, N.
Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación, CIAL (CSIC-UAM), CEI (UAM-CSIC)
C/ Nicolás Cabrera 9, Campus de la Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, España

INTRODUCCIÓN

Uno de los problemas de la industria transformadora de vegetales es la gestión y tratamiento los subproductos generados. Los subproductos pueden ser aprovechados para la obtención de ingredientes funcionales tales como las pectinas. Estos polisacáridos estructurales, presentes en la pared celular, son heteropolímeros constituidos por una cadena de ácido galacturónico (AGal) (homogalacturonano, HG), interrumpida por regiones ramificadas formadas por azúcares neutros, Ramnogalacturonano I y II (RG-I y RG-II). A partir de las pectinas pueden obtenerse pectooligosacáridos, POS, que pueden presentar propiedades funcionales que van a depender, en gran medida de sus características estructurales, es decir, grado de polimerización, grado de esterificación y composición en monosacáridos. Los POS pueden obtenerse por métodos físicos, químicos o enzimáticos, siendo estos últimos los mas utilizados.

OBJETIVO

El objetivo de este trabajo ha sido la optimización de un proceso de obtención de POS mediante la hidrólisis y/o transglicosilación de pectinas de cítricos y manzana, utilizando extractos enzimáticos comerciales

MATERIALES Y MÉTODOS

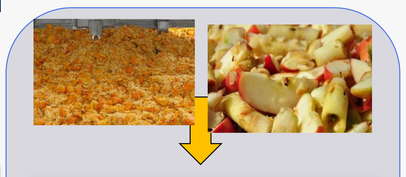
Composición monomérica [1]

Hidrólisis ácida:

- ✓ *Pectina 2%*
- ✓ *TFA 2M*
- ✓ *110 ˚C*
- ✓ *1, 2, 3, 4 y 18h*

Hidrólisis enzimática
Viscozyme
Mannozyme
Glucanex

- ✓ *Pectina 1%*
- ✓ *pH 4,5*
- ✓ *50 ˚C*
- ✓ *1, 3 y 24h*



Pectinas comerciales de cítricos y manzana

Obtención de Pectooligosacáridos, POS [2]

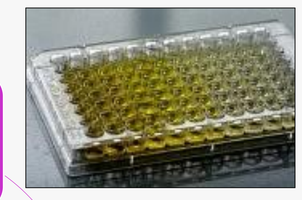
POS:

- ✓ *Pectina manzana y cítricos (1%)*
- ✓ *Viscozyme, Glucanex*
- ✓ *pH 4,5*
- ✓ *50 ˚C*
- ✓ *1 y 24h*

POS Modificados:

- ✓ *Hidrólisis y transglicosilación simultanea*
  P. Manzana 1%, Lactosa 10%
  Viscozyme (1, 24h)
- ✓ *Hidrólisis y transglicosilación secuencial*
  1º P. Manzana, Viscozyme (24h)
  2º Adición lactosa 1-10% y
  Biolactasa (β-galactosidasa) al hidrolizado

Técnicas analíticas



Técnicas Espectrofotométricas (método DNS, BCA y *o*-NPG)

Cromatografía de líquidos de exclusión molecular (HPLC-SEC)

Cromatografía de Gases (GC)

Columnas:
TSK G5000 PWXL (788 – 1,32 kDa)
TSK G2500 PWXL (1,32 – 0,342 kDa)

Derivados: Trimetilsilil oximas (TMSO)
Columnas capilares de sílica:
DB-17 (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm)
DB-5HT (15 m × 0,32 mm × 0,10 µm)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1 Composición monomérica de pectinas

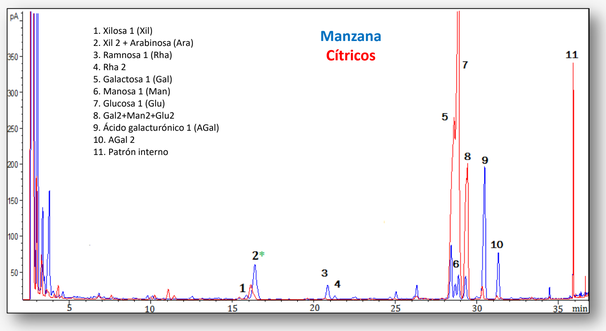


Figura 1. Perfil cromatográfico (GC) obtenido del hidrolizado ácido de pectina, TFA 2M 110 ˚C tras 3 h de hidrólisis.

- ➢ Pectina de cítricos y manzana, distinta composición
- ➢ Pectina manzana mayor contenido en ácido galacturónico.
- ➢ Pectina de cítricos mayor contenido en azúcares neutros (galactosa, manosa y glucosa).

2 Hidrólisis ácida de pectinas

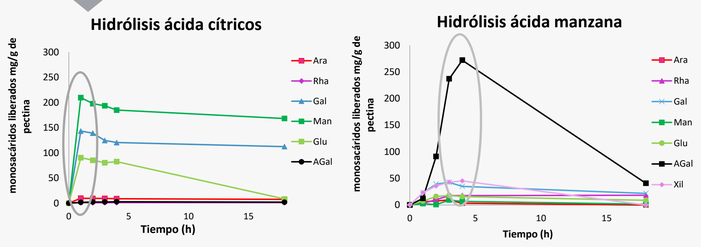


Figura 2. Monosacáridos liberados (mg/g pectina) durante la hidrólisis ácida de las dos pectinas estudiadas a distintos tiempos de reacción.

- ➢ Pectina Cítricos: liberación total de azúcares neutros 1h de hidrólisis y en mayor proporción.
- ➢ Pectina de Manzana : liberación total azúcares neutros y del ácido galacturónico a las 4 h de hidrólisis

Hidrólisis ácida mezcla de carbohidratos patrones

Tabla 1. Porcentaje degradación mezcla de carbohidratos patrón

	% degradación patrones	
Tiempo (h)	Az_neutros	AGal
1	15	22
4	35	61

- ➢ Pectina de cítricos, liberación completa de ácido galacturónico a las 3 h. Liberación más lenta de azúcares neutros (se completa a las 24 h)
- ➢ Pectina de manzana, mayor liberación de ácido galacturónico (1 h) con Viscozyme y Mannozyme. Menor liberación de azúcares neutros

3 Hidrólisis enzimática

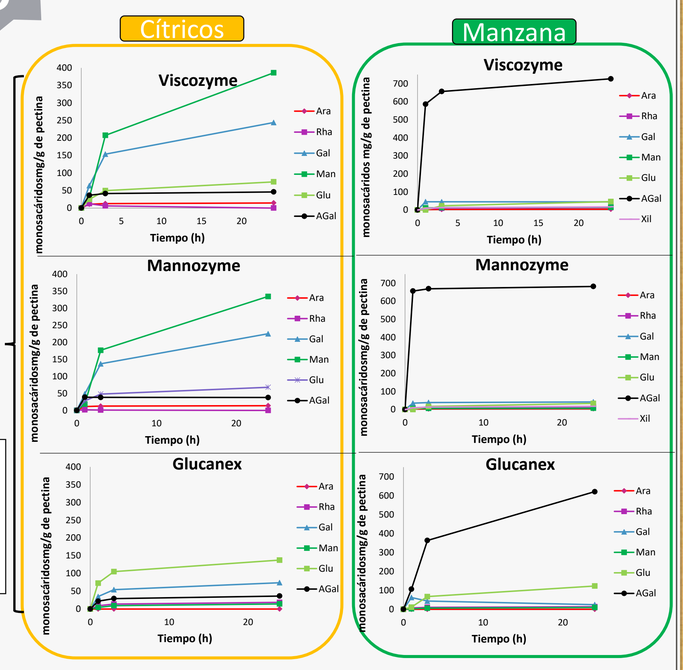


Figura 3. Monosacáridos liberados (mg/g pectina) durante la hidrólisis enzimática de las pectinas utilizando los 3 preparados enzimáticos seleccionados

4 Obtención Pectooligosacáridos, POS

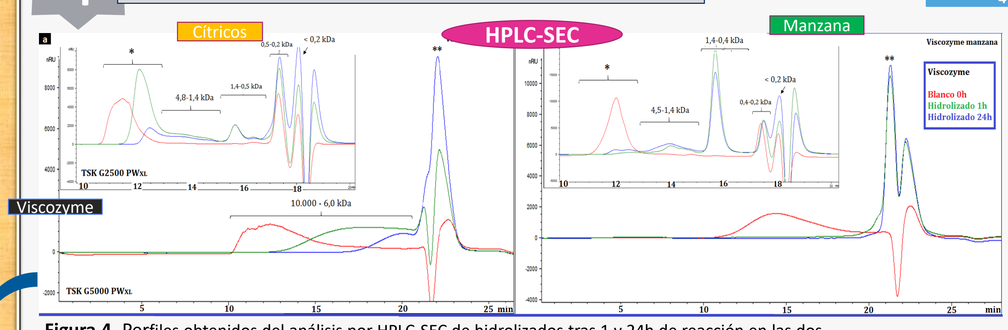


Figura 4. Perfiles obtenidos del análisis por HPLC-SEC de hidrolizados tras 1 y 24h de reacción en las dos columnas utilizadas (TSK G5000 PWXL, perfil inferior, TDK G2500 PWXL, perfil superior, recuadro).

Tabla 2. Estimación de la masa molecular de los fragmentos obtenidos tras la hidrólisis enzimática según HPLC-SEC.

	Masa molecular (kDa) pectina de Cítricos						
GLUCANEX	Control	1h	24 h	VISCOZYME	Control	1h	24 h
G5000	701,4 (94%)	327 (61%)	34 (38%)	G5000	701,4 (94%)	24 (66%)	-
	-	1,4 (3%)	3,9 (10%)		-	0,9 (16%)	0,9 (19%)
	0,3 (6%)	-	0,9 (2%)		0,3 (6%)	0,3 (17%)	0,3 (48%)
G2500	-	0,2 (36%)	0,2 (50%)	G2500	-	0,2 (2%)	0,2 (34%)
	Masa molecular (kDa) pectina de Manzana						
GLUCANEX	Control	1h	24 h	VISCOZYME	Control	1h	24 h
G5000	338 (93%)	-	-	G5000	338 (93%)	1,8 (49%)	1,4 (47%)
	-	3,7 (35%)	-		-	0,9 (45%)	0,9 (40%)
	-	2,8 (19%)	2,7 (5%)		0,3 (7%)	0,3 (5%)	0,3 (5%)
G2500	0,3 (7%)	0,9 (11%)	0,9 (64%)	G2500	-	0,2 (1%)	0,2 (8%)
	-	0,2 (35%)	0,2 (31%)				

- ➢ *Diferente comportamiento de las pectinas con cada preparado enzimático*
- ➢ *HPLC-SEC: Viscozyme hidrólisis mayor (24h) para pectina de cítricos*
  Glucanex hidrólisis mayor (24h) para la pectina de manzana
- ➢ *GC: mayor liberación POS Viscozyme a 24h y para Glucanex a 1h*

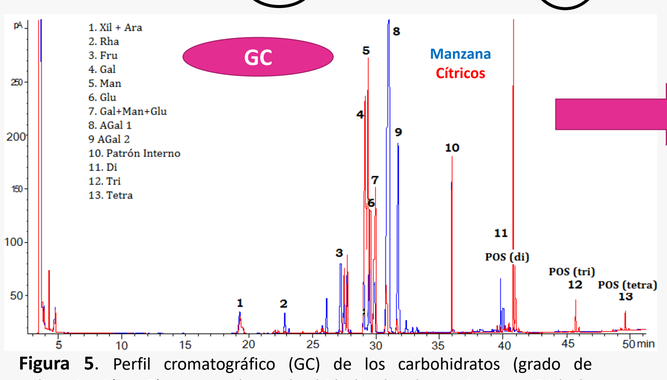


Figura 5. Perfil cromatográfico (GC) de los carbohidratos (grado de polimerización < 5) encontrados en los hidrolizados de pectinas tras 24 h de reacción. Manzana (Azul), cítricos (**Rojo**).

Tabla 3. Contenido en carbohidratos (mg/g) de las mezclas de hidrólisis de las pectinas

		Contenido carbohidratos (mg/g) en PECTINA DE CÍTRICOS					Contenido carbohidratos (mg/g) en PECTINA DE MANZANA		
Enzima		AGal	Azúcares neutros	POS	Enzima		AGal	Azúcares neutros	POS
Viscozyme	1 h	40,6	66,6	77,8	Viscozyme	1 h	616,3	82,8	25,5
	24 h	38,2	334,8	133,8		24 h	696,4	71,7	36,8
Glucanex	1 h	22,0	123,2	89,5	Glucanex	1 h	106,2	84,3	93,0
	24 h	36,5	246,5	69,6		24 h	577,3	143,7	32,0

5 Obtención POS modificados

Transglicosilación simultánea o secuencial

Tabla 3. Contenido en carbohidratos (% sobre total de carbohidratos analizados) en las mezclas de reacción de pectina hidrolizada (1% y 5%, Viscozyme, 24h) en presencia de lactosa 10% y lactosa sola (10%) con el preparado Biolactosa tras 1 y 24h de reacción

	Contenido carbohidratos (%)					
	Gal + Man + Gluc*	AGal ***	Lactosa	DI	TRI	TETRA
P. Man + Visco 24H Blanco	8,9	86,5	-	4,2*	0,4*	-
Lact 10% + Biolactasa 1h	50,3	-	25,4	18,4**	12,8**	0,9**
Lact 10% + Biolactasa 24h	36,0	-	6,4	30,8**	8,7**	-
P. Man 1% + Visco + Lact 10% + Biol 1h	43,4	3,3	29,7	15,8***	11,0***	0,7***
P. Man 1% + Visco + Lact 10% + Biol 24h	87,5	3,3	0,7	10,7***	1,1***	-
P. Man 5% + Visco + Lact 10% + Biol 1h	44,4	14,7	27,5	17,9***	10,2***	0,3***
P. Man 5% + Visco + Lact 10% + Biol 24h	86,5	13,8	0,7	11,7***	1,1***	-

*POS: Di y trisacáridos obtenidos de la hidrólisis de pectina. **GOS: Di, tri y tetrasacáridos obtenidos de la hidrólisis de la lactosa. ***GOS y trazas de POS

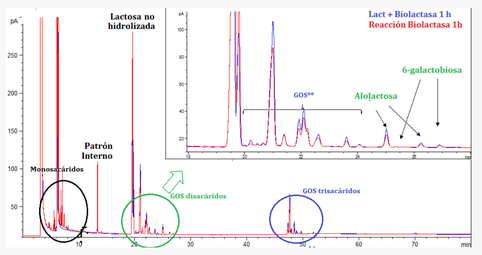


Figura 5. Perfil cromatográfico de carbohidratos obtenido del análisis por GC de la mezcla de hidrólisis de pectina manzana con Viscozyme con lactosa (**Rojo**) y lactosa sola (**Azul**) transcurrida 1h de reacción con Biolactasa.
GOS: Galactooligosacáridos sin identificar**

Se observa un comportamiento diferente, de las pectinas de cítricos y de manzana, frente a la hidrólisis ácida o enzimática, de tal forma que para determinar el ácido galacturónico habría que recurrir a la hidrólisis enzimática mientras que para la determinación de azúcares neutros se utilizaría la ácida.

- ➢ Resultados similares para las reacciones de hidrólisis y transglicosilación simultánea o secuencial.
- ➢ No hay diferencias entre blancos de lactosa con enzimas y mezclas finales de hidrólisis (lactosa y pectina).
- ➢ Diferente perfil de monosacáridos encontrados en las mezclas de hidrólisis.
- ➢ Se forman cantidades muy bajas de POS en las mezclas de hidrólisis conteniendo lactosa y pectinas.
- ➢ Se forman gactooligosacáridos (GOS), en las mezclas conteniendo lactosa.
- ➢ No se observa la formación de POS modificados en las mezclas de pectina hidrolizada y lactosa en los dos tipos de reacciones estudiadas (simultánea o secuencial).

CONCLUSIONES

- ❑Mediante la determinación del ácido galacturónico pudo establecerse la calidad de las pectinas de cítricos y manzana.
- ❑El tipo de enzima utilizado, para hidrolizar las pectinas, influyó en la composición y características de los pectooligosacáridos (POS) obtenidos.
- ❑En las condiciones ensayadas y con los métodos analíticos utilizados se ha detectado y cuantificado la formación POS mediante hidrólisis utilizando pectinasas, así como galactooligosacáridos (GOS), pero no se detectó la formación de POS modificados mediante hidrólisis y transglicosilación utilizando β-galactosidasas.

Bibliografía

[1] Garna et al. *Food Chem*. 96 (2006) 477-484. [2] Combo et al. *Food Bioprod. Process.* 90 (2012) 588-596

AGRADECIMIENTOS

La presente investigación se ha realizado con financiación de los proyectos AGL2014-53445, ALIBIRD-CM S-2013/ABI-2728 e I-COOPB20099.